



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ

СОФИЯ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА ПО ДЕРМАТОЛОГИЯ И ВЕНЕРОЛОГИЯ

Д-р ИННА РУМЕНОВА ПОПОВА – СТАТЕВА

**РОЛЯ НА ХОМОЦИСТЕИНА В КОМОРБИЛИТЕТА НА
ПСОРИАЗИС**

АВТОРЕФЕРАТ

ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА
ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН „ДОКТОР”

НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ:

Проф. д-р ЛЮБКА МИТЕВА, Д.М.

НАУЧЕН КОНСУЛТАНТ:

Доц. ВАЛЕНТИН ЛОЗАНОВ, Д.М.

НАУЧНА СПЕЦИАЛНОСТ: ДЕРМАТОЛОГИЯ И ВЕНЕРОЛОГИЯ

СОФИЯ, 2022г.

Дисертационният труд е написан на 90 стандартни А4 печатни страници и е онагледен с 4 фигури и 13 таблици. Библиографията съдържа 108 заглавия, от които 6 на български и 102 на латиница, обхващащи периода от 1973 до 2018г. Библиографията съдържа 8 от български и 100 от чуждестранни автори.

Във връзка с дисертационния труд са реализирани 4 публикации и 2 участия в научни форуми.

Дисертационният труд е обсъден на заседание на научния съвет към Катедрата по дерматология и венерология към Медицински Университет – София и е насочен за официална защита пред научно жури в състав:

1. Проф. д-р Румен Павлов Николов, д.м. – Вътрешен член за МУ – София, Ръководител на Катедра по фармакология и токсикология, Медицински факултет, Медицински университет – София
2. Доц. д-р Гриша Стефанов Матеев, д.м. – Вътрешен член за МУ – София, Катедра по дерматология и венерология, Медицински факултет към МУ – София.
3. Доц. д-р Янко Манолов Попов, д.м. – Външен член за МУ – София, СПКО – УМБАЛСМ „Н.И.Пирогов“
4. Проф. д-р Георги Константинов Чернев, д.м. – Външен член за МУ – София, Началник на Клиника по дерматология, венерология и дерматологична хирургия, Университетска болница МВР – София
5. Проф. д-р Христо Петров Добрев, д.м.н. – Външен член за МУ – София, Ръководител Катедра по дерматология и венерология, МУ – Пловдив

Резервни членове:

1. Проф. д-р Снежина Георгиева Василева, д.м. – вътрешен член за МУ – София, Катедра по дерматология и венерология, Медицински факултет към МУ – София;
2. Проф. д-р Димитър Константинов Господинов, д.м.н. – външен член за МУ- София, Ръководител Катедра по дерматология, венерология и алергология, сектор дерматология и венерология, Факултет по медицина към Медицински университет – Плевен

Материалите по защитата са на разположение в деловодството на Катедрата по дерматология и венерология, Медицински факултет, Медицински университет – София, бул. “Св. Г. Софийски” 1, гр. София.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 11 май 2022г. от 12.00 ч. в аудиторията на Катедрата по дерматология и венерология, Медицински факултет, Медицински университет София, бул. “Св. Г. Софийски” 1, гр. София.

СЪДЪРЖАНИЕ

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ	5
Въведение	7
Цел и задачи	8
Материал и методи	9
Материал	9
Набиране на пациенти	9
Вземане на биопсичен материал.....	10
Вземане на кръвни проби	10
Вземане на проба от слюнка	11
Методи	11
Проби от серум и слюнка	11
Кожни проби.....	12
Дериватизационна процедура	12
LC-MS/MS анализ	12
Статистически анализ	13
Етични норми	14
Резултати и дискусия	15
Изследване на Hcy, Met, Put, Spd и Spm в серум	17
Изследване на Hcy, Met, Put, Spd и Spm в слюнка	19
Изследване на Hcy, Met, Put, Spd и Spm в лезия и нелезионална кожа	20
Корелации между нивата на изследваните метаболити	22
Корелации между отделните проби на един и същи метаболит	31
Заклучение	37
Приноси	38
Оригинални	38
Научно-теоретични	38
Публикации и участия, свързани с дисертационния труд:	39

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

ПС	псориазис
АМПи	антимикробни пептиди
ПДК	плазмоцитни дендритни клетки
IFN	интерферони
МДК	миелоидни дендритни клетки
IL	интерлевкин
TNF	тумор некрозис фактор
ПА	псориатичен артрит
NF	нуклеарен фактор
КС	кортикостероиди
Met	метионин
Hcy	хомоцистеин
Spm	спермин
Spd	спермидин
Put	путресцин
РА	полиамини
GSH	глутатион
ДНК	дезоксирибонуклеинова киселина
РНК	рибонуклеинова киселина
SAM	S-аденозилметионин

SAM-DC.....S-аденозилметионинамин
SAH.....S-аденозилхомоцистеин
CRP..... С-реактивен протеин
Ig.....имуноглобулин
CBS..... цистатион β -синтазата

ВЪВЕДЕНИЕ

Псориазисът – от гръцки “psora” – сърбеж, е заболяване на кожата известно още от древността. Прогнозата му зависи в значителна степен от клиничната форма, локализацията и тежестта на протичане. Най-често заболяването се представя от еритемо-сквамозни плаки с ламелозно залющване, разположени по лакти, колене и капилицуум. Може да се появи във всяка възраст, при двата пола и във всички географски региони, с известна предилекция в районите с по-ограничено слънцегреене. Психоемоционалният статус на пациента има важно отношение към индукцията и тригерирането на псориазиса. Социалната среда, начинът на живот, включително диетичният режим и склонността към обезитет, също корелират значително с тежестта на протичане и прогнозата на заболяването

Първите изследвания за коморбидни заболявания сред пациентите с псориазис са направени през 1897год., когато Н. Strauss описва асоциация между псориазис и диабет. През 1961год. Reed и съавтори описват висок процент на сърдечни заболявания, като тромбози и миокарден инфаркт, при дисекции на псориазици с псориазичен артрит. Впоследствие, през 1978год. McDonald и съавтори наблюдават повишена честота на венозни и артериални съдови заболявания при хоспитализирани пациенти с псориазис. Сега, много години по-късно, бързо напредващите епидемиологични данни, показват, че псориазисът, особено тежко протичащите форми, са свързани с повишена смъртност и съпътстващи заболявания, като се предполага, че една от причините е хроничното възпаление.

При биохимични изследвания се установяват отклонения в нивата на хомоцистеин при пациенти с псориазис. Повишените нива на хомоцистеина увеличават риска за развитие на атеросклероза и сърдечно – съдови заболявания. Обръща се внимание на повишени нива на метионин, прекурсор на хомоцистеина. Повишените стойности на полиамините – спермин, спермидин, путресцин от своя страна могат да дадат една различна гледна точка в лечението на псориазис.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

- Цел на настоящият труд е да се изследват нивата на хомоцистеин и негови метаболити в кожни лезии, слюнка и серум, и да се провери евентуална връзка между тях при пациенти с хронично – рецидивираща форма на псориазис вулгарис, неасоцииран с други заболявания в контекста на метаболитния синдром.

Бяха поставени следните задачи:

1. Изследване нивата на метионин, хомоцистеин, путресцин, спермидин и спермин в серум, слюнка, лезия и незасегнатата кожа при пациенти с псориазис
2. Сравняване нивата на изследваните метаболити в лезия и здрава кожа от пациенти с псориазис
3. Да се изследва възможната връзка между нивата на изследваните метаболити в кожни проби

4. Да се оцени корелацията от нивата на всеки един анализ между отделните типове проби
5. Изследване на евентуална връзка между нивата на хомоцистеин и повишения синтез на полиамини

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

МАТЕРИАЛ

НАБИРАНЕ НА ПАЦИЕНТИ

В проучването взеха участие 24 пациенти с хронично-рецидивиращ псориазис вулгарис, плакатна форма.

Критериите за включване в изследването бяха:

1. възраст > 18 години;
2. заболяемост > 1 година;
3. преустановено системно или локално лечение, включително фототерапия, минимум 2 седмици преди провеждане на изследването;
4. клинични форми на заболяването – еруптивен, хронично-рецидивиращ, еритродермичен.

Критерии за изключване:

1. обезитет /BMI>22/;
2. прием на лекарства, предизвикващи хомоцистеинемия;
3. прием на системна анти-псориазична терапия, включително метотрексат, фолиева киселина, ацитретин;
4. метаболитен синдром, бъбречна или чернодробна недостатъчност, системен лупус еритематозус, хипотиреоидизъм, централен или периферен съдов инцидент.

ВЗЕМАНЕ НА БИОПСИЧЕН МАТЕРИАЛ

При стерилни хирургични условия по предварително описан и въведен в практиката протокол бяха проведени повърхностни шейв биопсии от лезионална кожа при пациенти с псориазис. Тъканните проби бяха взети от лумбалната зона на пациентите за осигуряване на относително еднакви условия в дебелината на епидермалната компонента. Пробите от здрава кожа бяха взети от гърба на пациента, на минимум 5см разстояние от псориазичните лезии.

ВЗЕМАНЕ НА КРЪВНИ ПРОБИ

Вземат се венозни кръвни проби от всички участници на гладно и се събират в хепаринизирани епруветки.

ВЗЕМАНЕ НА ПРОБА ОТ СЛЮНКА

За събиране на проби от слюнка участниците бяха помолени да предоставят проба от 2 ml. Бяха инструктирани да събират материала в пластмасови полиетиленови контейнери.

Всички взети проби в това число кожни проби, серум и слюнка са съхранявани при -80°C до момента на провеждане на съответните анализи.

МЕТОДИ

ПРОБИ ОТ СЕРУМ И СЛЮНКА

Приблизително 0,5 ml проби от серум и слюнка се центрофугират при 13000 об / мин и 4°C в продължение на 10 минути. Към алиkvота от 50 μl супернатанта бяха добавен 20 μl TCEP.HCl (10 g / l във вода). Реакционната смес се инкубира в продължение на 20 минути при 45°C и се добавят 50 μl 0,1 M перхлорна киселина. След това, пробите се центрофугират при 13500 об / мин и 4°C в продължение на 10 минути.

КОЖНИ ПРОБИ

Кожните плаки бяха хомогенизирани в 300 μ l 1M HClO₄ с помощта на миксер (MICCRA 1, ART, Germany) при 26 000 rpm. След което пробоподготовката продължава по процедурата описана за серум и слюнка.

ДЕРИВАТИЗАЦИОННА ПРОЦЕДУРА

Към 70 μ l от супернатантата бяха добавени 20 μ l 8M акриламид и пробата беше инкубирана 20 мин. при температура 45° C, след което бяха добавени 120 μ l буфер (0.5M Na₂CO₃/NaHCO₃, 5 mM EDTA) и 200 μ l FAESC (5 mM в ACN). След инкубиране в продължение на 1 час при стайна температура пробата беше подкислена с 30 μ l HCl. Преди анализ пробата беше разредена 1:1 с ACN:H₂O (50:50).

LC-MS/MS АНАЛИЗ

Хроматографският анализ на дериватите на хомоцистеин, метионин, спермидин и спермин беше извършен на система за BETX Surveyor® Plus, която се състои от бинарна градиентна помпа, аутосемплер и PDA детектор (ThermoScientific Co, USA). Хроматографското разделяне беше извършено на колона XTerra C18 (I.D. 2.1 mm x 150 mm, 3,5 μ m размер на частиците) при поток 250 μ l/min и използване на следните подвижни фази: А- 10 mM NH₄HCO₃ във вода (pH=7.3); В - (90:10) ACN : Фаза А. Градиентът, който

беше използван е следният: 18 % В за 2 min; 18-50 % В за 3 min; 50-100 % В за 11 min; 100 % В за 2 min; 100-18 % В за 1 min и 18 % В за 3 min.

Определянето беше извършено на LTQ Orbitrap® Discovery мас спектрометър (ThermoScientific Co, USA) оборудван с модул за електро спрей йонизация IonMax® (ThermoScientific Co, USA). Пълният спектър на всяка проба беше снет в обхвата m/z 150-1500 в режим на положителна йонизация. Разделителната способност, при която беше извършен анализът на Orbitrap е 15000. Всички мас параметри на Orbitrap бяха оптимизирани за постигане на максимална чувствителност по отношение на изследваните анализи. Мас параметрите на Orbitrap бяха следните: напрежение на спрея 3.8 kV, Spray current 100 μ A, Sheath gas flow rate 40, Auxiliary gas flow rate 15, Sweep gas flow rate 2, напрежение на капилярата 36 V, температура на капилярата 280°C, и tube lens 125 V. Преходите избрани за количествено определяне бяха: Hcy m/z 490.10→ m/z 339.1139, Met m/z 433.10→ m/z 339.1139, Spd m/z 995.30→ m/z 738.2730 и Spm m/z 1335.40→ m/z 1078.3950. Колизионната енергия също беше оптимизирана и стойността и за всички деривати бе CID 35 %. Събирането и обработката на получените данни беше извършено на XCalibur® software package (ThermoScientific Co, USA). Количественото определяне беше извършено на базата на външна калибрация.

СТАТИСТИЧЕСКИ АНАЛИЗ

Статистиката се осъществяват с помощта на Sigma Plot 12.0 (Systat Software, Inc, Сан Хосе, Калифорния, САЩ). Данните са представени като средна стойност \pm SEM (стандартна грешка на средната стойност). За да се оценят разликите в средните стойности между отделните групи се използват student two tailed t-test. Разликите в нивото на $P < 0.05$ се считат за

статистически значими. Количествените зависимости между отделните променливи бяха оценени чрез корелационни коефициенти на Pearson.

Статистическа значимост на получените корелационни коефициенти:

$0 < R < 0.3$ – слаба

$0.3 < R < 0.5$ – умерена

$0.5 < R < 0.7$ – значителна

$0.7 < R < 0.9$ – висока

$0.9 < R < 1$ – много висока

Средна стойност \pm SEM.

- * индикира значителна разлика $P < 0.05$ сравнено със здравата кожа;
- ** индикира значителна разлика $P < 0.01$ сравнено със здравата кожа;
- *** индикира значителна разлика $P < 0.001$ сравнено със здравата кожа;

ЕТИЧНИ НОРМИ

Проучването, при което е взет материал от човешка кожа, е проведено след получаване на одобрение от местната етична комисия-Комисия по етика на научните изследвания в Медицински университет – София (КЕНИМУС). Всички участници получиха информация за целта на изследването и бяха включени в изследването след информирано съгласие.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

В проучването бяха включени 24 пациенти (13 мъже и 11 жени) с потвърдена клинично и хистологично диагноза псориазис вулгарис. Средно PASI е 15.5. пациентите бяха на възраст от 21 до 67 год. (средна възраст 44.1). Тежестта на заболяването се измерваше спрямо Psoriasis Area and Severity Index(PASI). Заболяване с PASI<10 се категоризира като леко, 10-20 средно-тежко, и >20 като тежък псориазис.

Бяха измерени нивата на Hcy, Met, Put, Spd и Spm в серум, слюнка, лезия и незасегнатата кожа. Всеки метаболит по отделно беше измерен във всички проби, корелацията на отделните метаболити във всяка отделна проба беше статистически оценена. Оценена е и разликата в нивата на метаболитите в лезия и незасегнатата кожа. Получените данни бяха нетипично разпределени и за оценка на разликите в определените нива бяха използвани медиани и непараметрични тестове за сравнение. Всички резултати, получени за изследваните показатели в пробите от серум, слюнка и кожа, изразени като средни стойности \pm SEM, и медиани (min & max) са дадени в таблица 4.

	Serum [μM]	Saliva [μM]	Non-affected skin [μmol/g]	Lesional skin [μmol/g]
	Specimen=24	Specimen=24	Specimen=24	Specimen=24
Homocysteine				
Mean \pm SEM	37.849 \pm 3.815	2.180 \pm 0.358	0.129 \pm 0.020	0.104 \pm 0.013
Median	42.472	1.940	0.103	0.092
Min and max	7.748-66.765	0.333-6.720	0.017-0.397	0.012-0.278
Literature data of healthy subjects	9.99 \pm 1.04	2.92 \pm 2.27	-	
Methionine				
Mean \pm SEM	23.473 \pm 1.986	2.920 \pm 0.726	0.731 \pm 0.150	1.253 \pm 0.211
Median	20.920	1.222	0.493	0.955
Min and max	8.582-48.304	0.161-13.052	0.023-2.379	0.060-3.433
Literature data of healthy subjects	25 \pm 4	8.81 \pm 5.94	-	
Putrescine				
Mean \pm SEM	0.562 \pm 0.024	243.501 \pm 38.535	0.112 \pm 0.016	0.124 \pm 0.015
Median	0.582	222.124	0.087	0.123
Min and max	0.319-0.742	30.939-548.977	0.026-0.284	0.020-0.309
Literature data of healthy subjects	0.05 \pm 0.03 0.24 \pm 0.09	136.76 \pm 111.97	0.19 \pm 0.07	

Spermidine				
Mean±SEM	0.556±0.056	5.812±0.842	0.747±0.124	0.914±0.106
Median	0.553	5.779	0.619	0.838
Min and max	0.208-1.292	0.711-14.922	0.137-2.971	0.109-1.938
Literature data of healthy subjects	0.07±0.04 0.20±0.05	3.21±6.80	0.87±0.14	
Spermine				
Mean±SEM	3.875±0.917	47.606±9.651	0.856±0.112	1.511±0.141
Median	2.491	34.436	0.732	1.358
Min and max	0.001-12.257	10.641-188.986	0.276-1.841	0.354-3.193
Literature data of healthy subjects	0.03±0.04	0.63±0.67	0.69±0.08	

Таблица 4. Изследвани нива на Hcy, Met, Put, Spd и Spm в серум, слюнка, лезия и здрава кожа от пациенти с псориазис, и нивата на тези метаболити в здрави хора от литературната справка.

ИЗСЛЕДВАНЕ НА HCY, MET, PUT, SPD И SPM В СЕРУМ

Стойностите на тоталния серумен Hcy са $37.849 \pm 3.815 \mu\text{M}$, стойности отговарящи на хиперхомоцистеинемия ($\text{Hcy} > 15 \mu\text{M}$).

В проучване от 2006год. на Malebra et al. са изследвани пациенти с псориазис без рискови фактори за покачване нивата на хомоцистеин и контролни пациенти. Изследването е установило покачване на нивата на хомоцистеина и понижаване на нивата на фолиевата киселина в серума на болните. Тези резултати се обясняват с факта, че ускорената пролиферация на кератиноцитите води до прекомерна консумация на фолива киселина, която се използва за метилирането на активно делящите се клетки. Понижените нива на фолиевата киселина водят до повишаване нивата на хомоцистеина.

В японско проучване от 2011 год. на Richetta et al. са изследвани 70 пациенти с псориазис и 30 души контролна група. Резултатите показали, че пациентите със средно тежък до тежък псориазис имат по – високи стойности на хомоцистеин от контролната група (56% от пациентите с псориазис срещу 20% от контролната група имат хиперхомоцистеинемия ($\geq 15 \text{ mol/L}$)). Установено е също така, че при пациентите с псориазис стойностите на хомоцистеин директно корелирали с тежестта на псориазиса, и в частност със стойностите на PASI (таблица 5). Контролната група са показали нормални стойности на хомоцистеина с изключение на 6/30, които са показали минимално покачване на нивата на хомоцистеин (между 15 и 20mol/L).

	PASI	MID homocysteine
Mild psoriasis	<10	8.6 $\mu\text{mol/L}$
Moderate psoriasis	10-20	17.5 $\mu\text{mol/L}$
Severe psoriasis	>20	21.6 $\mu\text{mol/L}$

Таблица 5. Пациенти с хиперхомоцистеинемия

Нашите резултати са в съответствие с документираните до настоящия момент данни за завишени стойности на хомоцистеина ($\text{Hcy} > 15 \mu\text{M}$) при пациенти с псориазис. От това може да се предположи, че една от причините за повишения коморбилитет при тези пациенти е тази хиперхомоцистеинемия.

Нивото на Met в серума е $23.473 \pm 1.986 \mu\text{M}$. Нивото на Met в серум при псориазис не се различава от това на здрави хора $25 \pm 4 \mu\text{M}$.

Нивата на полиамините в серума са $0.562 \pm 0.024 \mu\text{M}$ за Put, $0.556 \pm 0.056 \mu\text{M}$ за Spd и $3.875 \pm 0.917 \mu\text{M}$ за Spm. Получените резултати са високи от нормалните концентрации за тези метаболити в литературата ($0.24 \pm 0.09 \mu\text{M}$ за Put, $0,20 \pm 0,05 \mu\text{M}$ за Spd и $0,03 \pm 0,04 \mu\text{M}$ за Spm. Възниква въпроса дали повишените нива на полиамините стоят в етиологията на Пс, или са в резултат на засилената епидермална пролиферация (те се отделят в големи количества в системната циркулация).

ИЗСЛЕДВАНЕ НА HCY, MET, PUT, SPD И SPM В СЛЮНКА

Нивата на Hcy, Met и Spd в слюнка са $2.180 \pm 0.358 \mu\text{M}$, $2.920 \pm 0.726 \mu\text{M}$ и $5.812 \pm 0.842 \mu\text{M}$. Получените резултати са в нормата (Hcy 2.92 ± 2.27 , Met 2.920 ± 0.726 и Spd 5.812 ± 0.842). Резултатите за Put и Spm в слюнка са $243.501 \pm 38.535 \mu\text{M}$ и съответно $47.606 \pm 9.651 \mu\text{M}$, които са значително по-високо от документираните стойности при здрави хора Put $136.76 \pm 111.97 \mu\text{M}$ и Spm $0.242 \pm 0.568 \mu\text{M}$.

Наблюдаваната разлика в нивото на Spm и Put в слюнка би могла да се използва като биомаркер при псориазис. В множество проучвания са

изследвани компоненти на слюнката при пациенти с псориазис, като слюнчен тотален протеин, IgA, IgG, лизозим, С-реактивен протеин (CRP), и хаптоглобин. Слюнчените биомаркери биха могли да бъдат полезни за проследяване на тежестта на псориазиса, прогнозата и да бъдат ценни диагностични методи в бъдеще.

ИЗСЛЕДВАНЕ НА HSCY, MET, PUT, SPD И SPM В ЛЕЗИЯ И НЕЛЕЗИОНАЛНА КОЖА

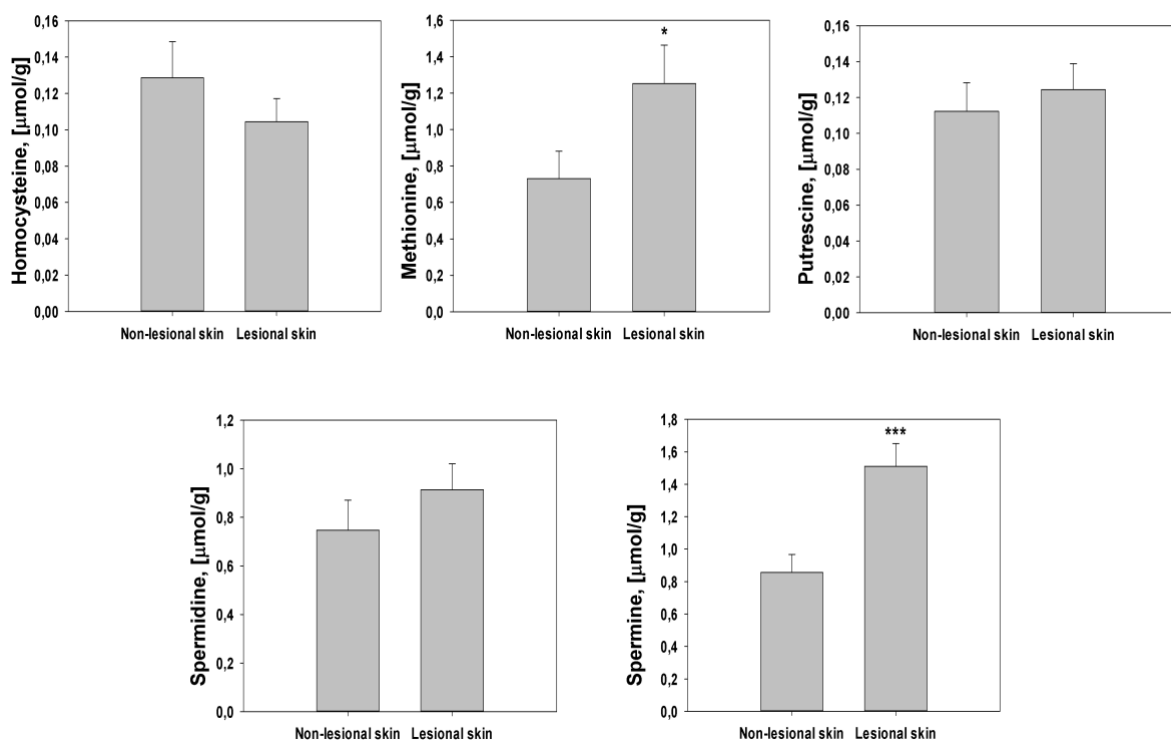
Тъканните нива на Hscy определени в лезия и здрава кожа са илюстрирани на Фигура 4. В сравнение с нивото на Hscy в здравата кожа, в лезията се наблюдава леко понижение (здрава кожа 0.129 ± 0.020 $\mu\text{M/g}$ и лезия 0.104 ± 0.013 $\mu\text{M/g}$). Наблюдаваното понижение не е статистически значимо ($p = 0.587$). До колкото ни е известно в литературата няма данни за нивата на Hscy нито в биопсичен материал от пациенти с псориазис, нито от здрави лица. Получените резултати индикират, че изследването на тъканните нива на Hscy нямат диагностична стойност и не могат да служат като показател за степента на коморбилитет при засегнатите лица.

В сравнение с нивото на Met в здравата кожа, в лезията се наблюдава значително повишение (здрава кожа 0.731 ± 0.150 $\mu\text{M/g}$ и лезия 1.253 ± 0.211 $\mu\text{M/g}$). Разликата между наблюдаваните нива е статистически значима ($p = 0.047$). До този момент в литературата не са известни данни за изследване на нивото на Met в материал от биопсична проба от пациенти с псориазис, както и от здрави такива. Получените резултати предполагат, че метаболизма на Met е засегнат в лезиите.

Нивата на Put и Spd в здрава кожа и лезия е статистически незначима (Put здрава кожа $0.112 \pm 0.06 \mu\text{M/g}$ и лезия $0.124 \pm 0.015 \mu\text{M/g}$, $p=0.410$; Spd здрава кожа $0.747 \pm 0.124 \mu\text{M/g}$ и лезия $0.914 \pm 0.106 \mu\text{M/g}$, $p = 0.125$).

В сравнение с нивото на Spm в здравата кожа, в лезията се наблюдава повишение (здрава кожа $0.856 \pm 0.112 \mu\text{M/g}$ и лезия $1.511 \pm 0.141 \mu\text{M/g}$). Наблюдаваната разлика е статистически значима с $p = 0.002$. Получените резултати са в съответствие с данните декларираны в литературата.

Поради наблюдаваните повишени нива на Met и Spm бихме могли да предположим, че метаболизма на Met е изтеглен в посока синтеза на полиамини и в частност Spm. Това предположение се потвърждава и от факта, че в клиничната практика се препоръчва ниско протеинова диета, която би повлияла на Met и от там на полиамините.



Фигура 4. Сравнение нивата на Hcy, Met, Put, Spd и Spm в незасегнатата кожа и лезионална кожа от пациенти с псориазис.

КОРЕЛАЦИИ МЕЖДУ НИВАТА НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ МЕТАБОЛИТИ

Беше оценена корелацията между нивата на всички изследвани метаболити във всички видове анализирани проби. Целта на това проучване беше да се провери евентуалната връзка между нивата на метаболитите в отделните проби, както и помежду им.

При сравняване на корелацията между Spd и Spm (табл. 6A) в серум се наблюдава слаба пропорционална корелация, която е следствие метаболизма на полиамините – Spd е прекурсор на Spm и те са взаимопревръщащи се.

Корелацията между Spd и Met в серум (табл. 6B) е значителна ($r = 0.650$ и $p = 0.002$). Полученият резултат показва, че в серума има връзка между нивата на Met и Spd.

Между нивата на Met и Spm (табл. 6C) в серум не се наблюдава корелация ($r = 0.396$ и $p = 0.091$).

Между нивата на Hcy и Met (табл. 6D) в серум се наблюдава умерена корелация ($r = 0.498$ и $p = 0.034$).

Не се наблюдава корелация между нивата на Hcy и Spm (табл. 6E) в серум ($r = 0.202$ и $p = 0.401$).

Не се наблюдава корелация между нивата на Hcy и Spd (табл. 6F) в серум ($r = 0.439$ и $p = 0.067$).

Не се наблюдава корелация между нивата на Put и Spd (табл. 6I) в серум ($r = 0.835$ и $p < 0.001$).

Не се наблюдава корелация между нивата на Put и Spm (табл. 6К) в серум ($r = 0.037$ и $p = 0.871$).

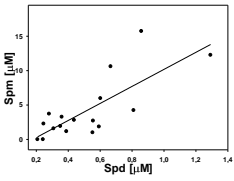
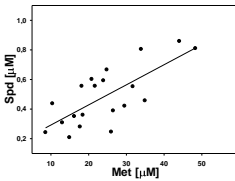
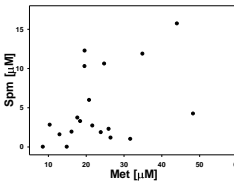
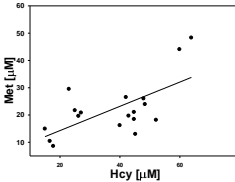
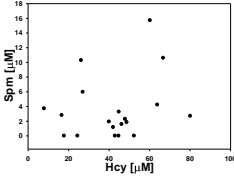
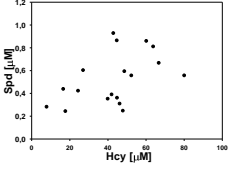
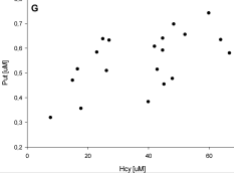
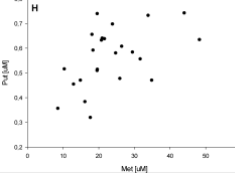
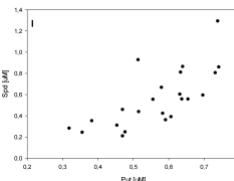
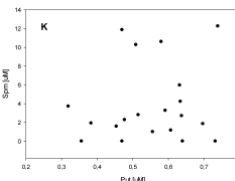
 <p>A. Корелация между нивата на Spd и Spm в серум</p>	 <p>B. Корелация между нивата на Met и Spd в серум</p>
 <p>C. Корелация между нивата на Met и Spm в серум</p>	 <p>D. Корелация между нивата на Hcy и Met в серум</p>
 <p>E. Корелация между нивата на Hcy и Spm в серум</p>	 <p>F. Корелация между нивата на Hcy и Spd в серум</p>
 <p>G. Корелация между нивата на Hcy и Put в серум</p>	 <p>H. Корелация между нивата на Met и Put в серум</p>
 <p>I. Корелация между нивата на Spd и Put в серум</p>	 <p>K. Корелация между нивата на Spm и Put в серум</p>

Таблица 6: Корелация между нивата на изследваните метаболити в серум.

Не се наблюдава статистически значима корелация между нивата на Spd и Spm (табл. 7A) в слюнка ($r = 0.426$ и $p = 0.060$). Причина за това може да бъде наличието на полиамините в различни храни като зеленчуци и месо, и тяхната евентуална акумулация в слюнката.

Корелацията, която се наблюдава между нивата на Met и Spd (табл. 7B) е висока ($r = 0.734$ и $p < 0.001$).

Не се наблюдава корелация между нивата на Met и Spm (табл. 7C) в слюнка ($r = 0.033$ и $p = 0.886$).

Наблюдава се висока корелация между нивата на Hcy и Met (табл. 7D) в слюнка ($r = 0.716$ и $p < 0.001$).

Не се наблюдава корелация между нивата на Hcy и Spm (табл. 7E) в слюнка ($r = 0.360$ и $p = 0.107$).

Наблюдава се много висока корелация между нивата на Hcy и Spd (табл. 7F) в слюнка ($r = 0.932$ и $p < 0.001$).

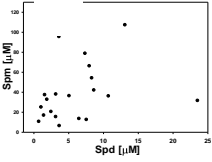
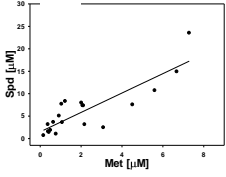
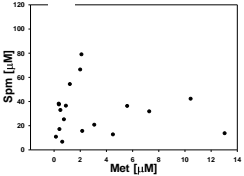
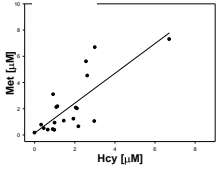
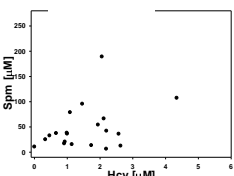
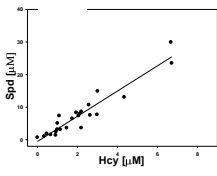
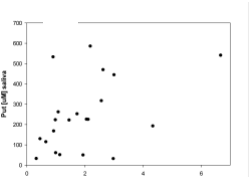
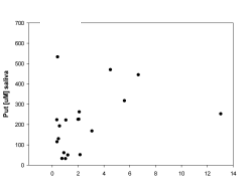
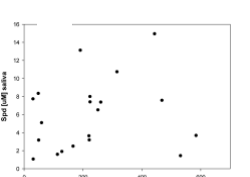
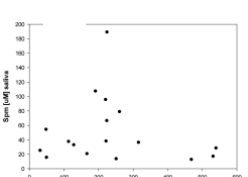
 <p>A. Корелация между нивата на Spd и Spm в слюнка.</p>	 <p>B. Корелация между нивата на Met и Spd в слюнка</p>
 <p>C. Корелация между нивата на Met и Spm в слюнка</p>	 <p>D. Корелация между нивата на Hcy и Met в слюнка</p>
 <p>E. Корелация между нивата на Hcy и Spm в слюнка</p>	 <p>F. Корелация между нивата на Hcy и Spd в слюнка</p>
 <p>G. Корелация между нивата на Put и Hcy в слюнка</p>	 <p>H. Корелация между нивата на Put и Met в слюнка</p>
 <p>I. Корелация между нивата на Put и Spd в слюнка</p>	 <p>K. Корелация между нивата на Put и Spm в слюнка</p>

Таблица 7: Корелация между нивата на изследваните метаболити в слюнка.

Наблюдава се корелация между нивото на Hcy и Met (табл. 8A) в здрава кожа ($r = 0.6$ и $p = 0.04$).

Наблюдава се значителна корелация между нивото на Hcy и Spd (табл. 8B) в здрава кожа ($r = 0.6$ и $p = 0.05$).

Не се наблюдава корелация между нивото на Hcy и Spm (табл. 8C) в здрава кожа ($r = 0.4$ и $p = 0.059$).

Корелацията между нивото на Met и Spd (D) е значителна ($r = 0.7$ и $p < 0.001$). Полученият резултат индикира, че в серума има правопрпорционална връзка между нивата на Met и Spd.

Наблюдава се значителна корелация между нивото на Met и Spm (табл. 8E) в здрава кожа ($r = 0.7$ и $p < 0.001$).

Наблюдава се значителна корелация между нивото на Put и Spd (табл. 8F) в здрава кожа ($r = 0.7$ и $p < 0.001$).

Наблюдава се значителна корелация между нивото на Put и Spm (табл. 8G) в здрава кожа ($r = 0.7$ и $p < 0.001$).

Корелацията, която се наблюдава между нивото на Spd и Spm (табл. 8H) в здрава кожа е правопрпорционална, висока и статистически значима ($r = 0.8$ и $p = 0.004$). Полученият резултат индикира, че в здравата кожа нивата на тези два полиамина са тясно свързани и стриктно регулирани. Потвърждава данните от литературата за повишено съотношение на Spm и Spd в здрава кожа. Това затвърдява предположението, че има нарушение в метаболизма на цялата кожа при пациенти с псориазис, а не само в лезиите.

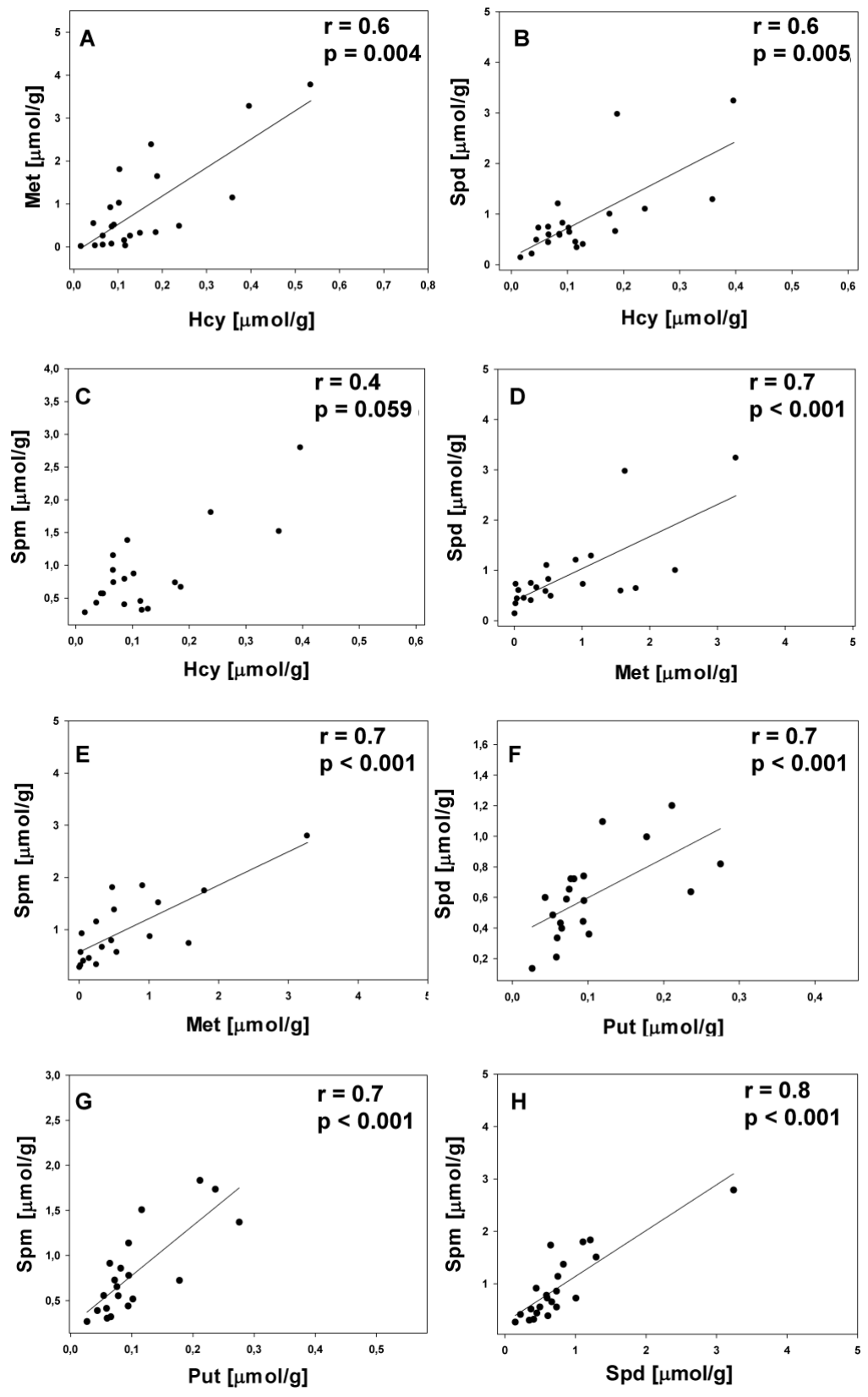


Таблица 8: Корелация между нивата на изследваните метаболити в здрава кожа.

Не се наблюдава корелация между нивата на Hcy и Met в лезия (табл. 9A) ($r = 0.3$ и $p = 0.095$).

Не се наблюдава корелация между нивата на Hcy и Spd (табл. 9B), Hcy и Spm (табл. 9C), Met и Spd (табл. 9D) в лезия.

Наблюдава се значителна корелация между нивата на Met и Spm (табл. 9E) в лезия ($r = 0.7$ и $p < 0.001$). Откритията, че нивата на Met и Spm са значително по-високи в лезия, сравнено с незасегнатата кожа, и позитивната корелация Met/Spm, както и корелациите между нивата на полиамините в лезия, показват тясна връзка между тези метаболити в засегнатата кожа.

Наблюдава се корелация между нивата на Put и Spd (табл. 9F), Put и Spm (табл. 9G) в лезия.

Корелацията, която се наблюдава между нивото на Spd и Spm (табл. 9H) в лезия е правопрпорционална, висока и статистически значима ($r = 0.9$ и $p < 0.001$). Данните потвърждават хипотезата за положителна корелация на Spd и Spm в лезионална кожа при пациенти с Пс.

Данните потвърждават хипотезата за положителна корелация на Spd и Spm в лезионална кожа при пациенти с Пс. Полученият резултат индикира, че в лезията нивата на двата полиамина също са свързани. Съотношението Spd/Spm, използвано като индикатор за пролиферативна активност, беше 0.9 за незасегнатата кожа и 0.6 за лезия. Този резултат е в съответствие с данните докладвани от Броцилова и съавтори, но противоположно, не подкрепя хипотезата за позитивна корелация между тъканната пролиферативна активност в епидермиса и съотношението Spd/Spm.

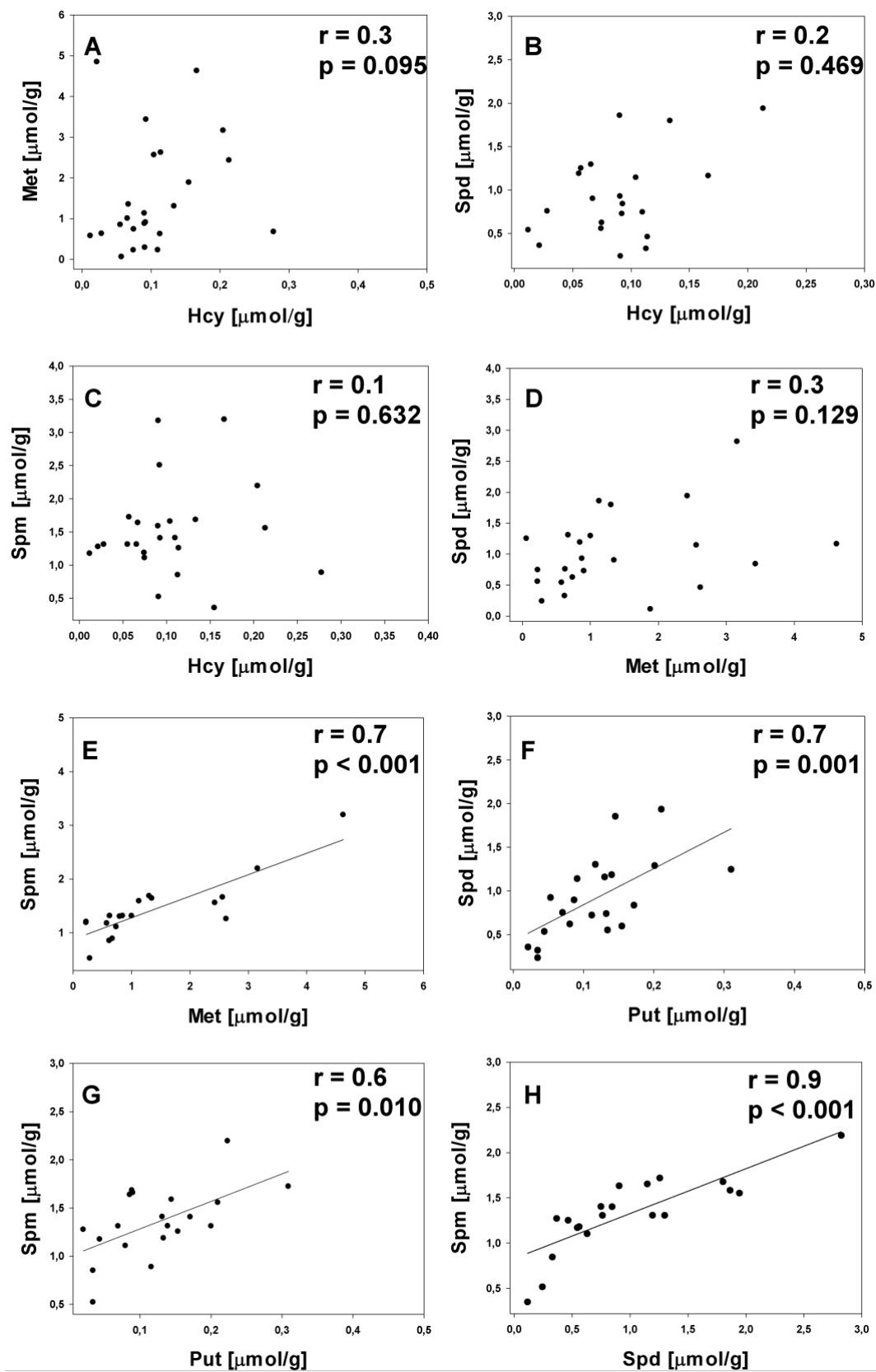


Таблица 9: Корелация между нивата на изследваните метаболити в лезия

Интересен е фактът, че в лезионална кожа, няма корелации между Hcy/Met, Hcy/Spd и Met/Spd. Липсата на корелации с Hcy нива в лезиите може да означава, че са нарушени нормалните Hcy метаболитни процеси в засеганата кожа. Променените нива на Hcy в лезиите може да бъдат обяснени както с ускорение, така и с подтискане на двата метаболитни пътя: транссулфориращият и реметиализиращият.

В здрава кожа се установиха високи корелации между Hcy/Met, Hcy/Spd и Met/Spd, които не се наблюдават в лезионалната кожа. Тези резултати, заедно със сигнификантно повишените нива на Met и Spm в лезии, показват, че високите полиаминни нива могат да бъдат в резултат на нарушения метаболизъм на Hcy, по-точно в смущения в транссулфориращия път.

КОРЕЛАЦИИ МЕЖДУ ОТДЕЛНИТЕ ПРОБИ НА ЕДИН И СЪЩИ МЕТАБОЛИТ

Направи се сравнение на нивата на отделните проби на един и същи метаболит с цел неинвазивен метод на диагностика, и по-конкретно изследване на слюнка.

Използването на неинвазивни методи на диагностика би довело по-достъпен начин на събиране на изследвания материал. Тези методи биха причинили по-малка психическа травма за болните, особено за пациентите с псориазис, при които всяка психическа травма би могла да доведе до нов тласък на заболяването. За събирането на такъв материал (по-конкретно слюнка) не е необходим специално обучен за целта персонал, което също би улеснило цялостния процес по диагностика. Материалите, които се

използват за събиране на пробите са много по-малко, което би довело до намаляване на финансовия ресурс.

Не се наблюдават корелации между нивата на Нсу (табл. 10) между различните проби (серум и слюнка, слюнка и лезия, здрава кожа и лезия, serum и здрава кожа, serum и лезия, слюнка и здрава кожа).

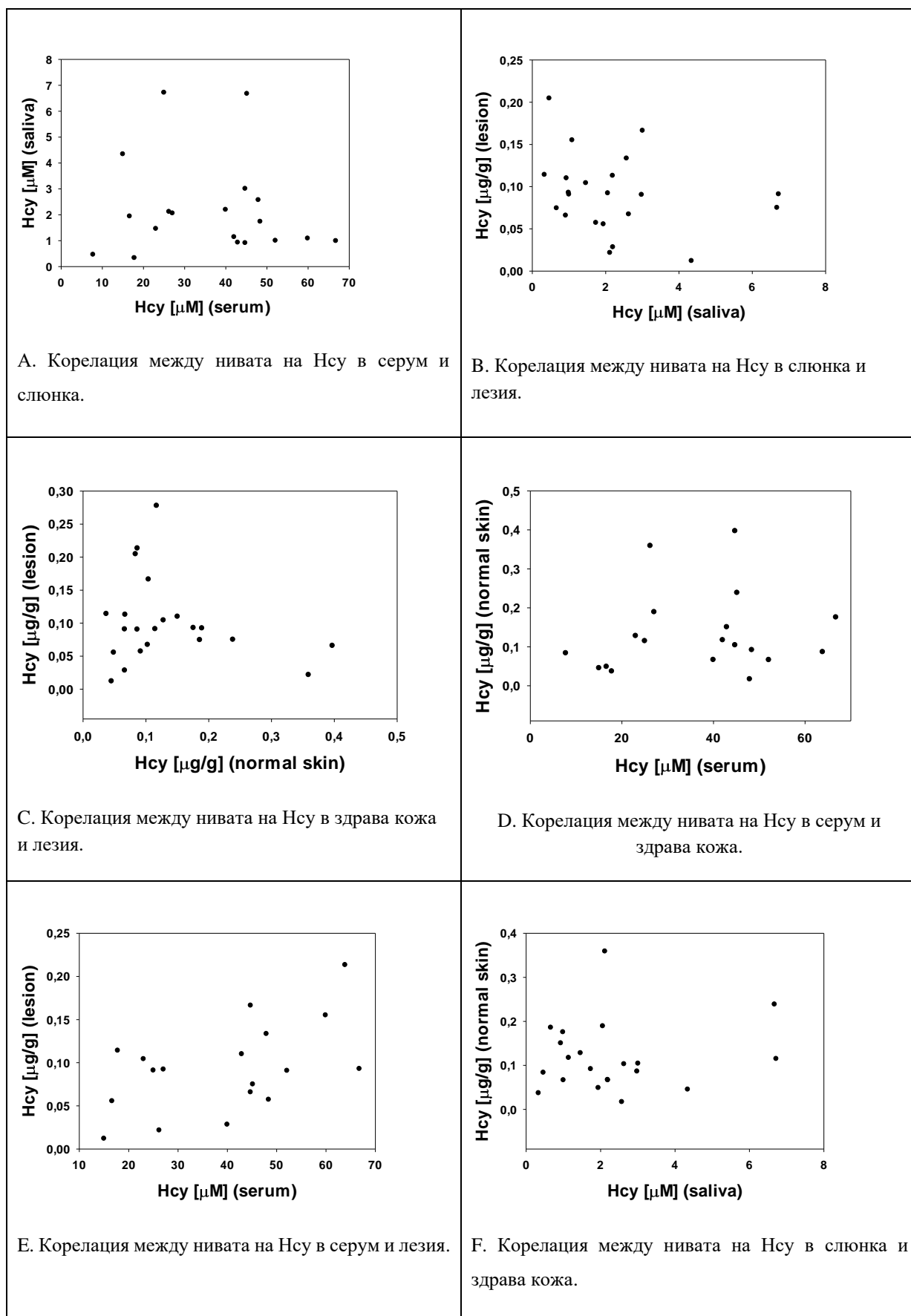


Таблица 10. Корелация между нивата на Нсу в различните проби.

Не се наблюдават корелации между нивата на Met (табл.11) между различните проби (серум и слюнка, слюнка и лезия, здрава кожа и лезия, серум и здрава кожа, серум и лезия, слюнка и здрава кожа).

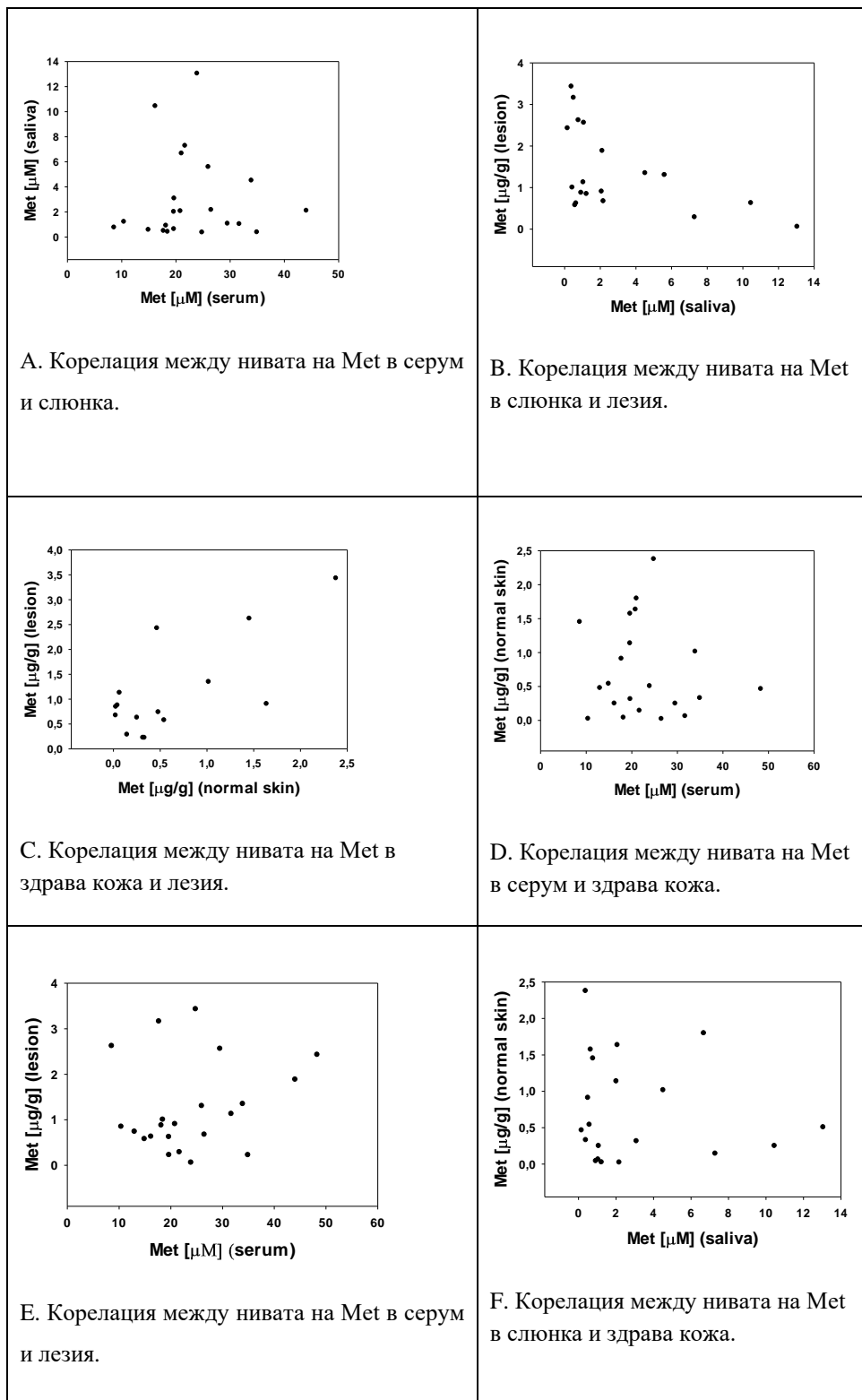


Таблица 11. Корелация между нивата на Met в различните проби.

Не се наблюдават корелации между нивата на Spd (табл. 12) между различните проби (серум и слюнка, слюнка и лезия, здрава кожа и лезия, серум и здрава кожа, серум и лезия, слюнка и здрава кожа).

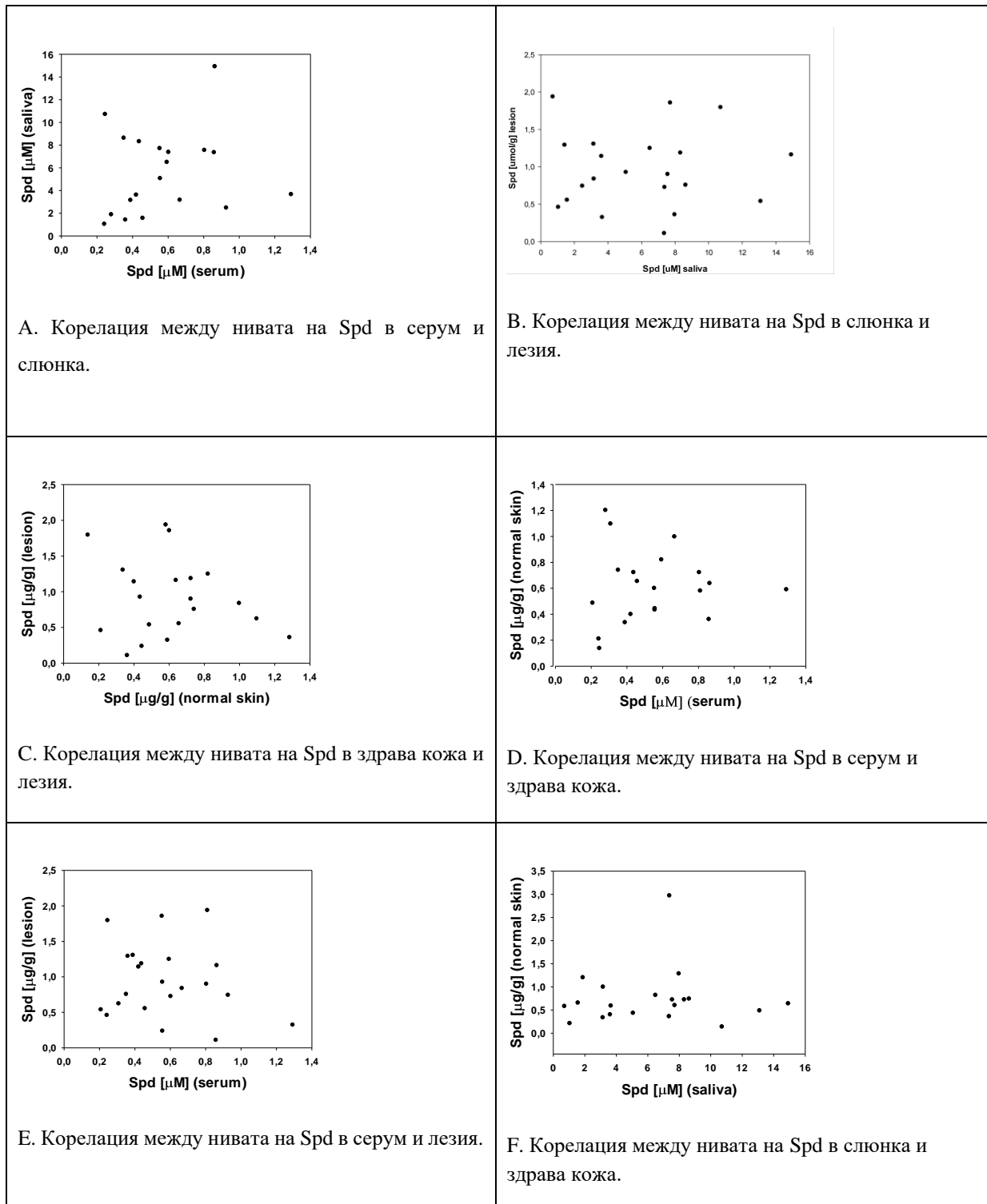


Таблица 12. Корелация между нивата на Spd в различните проби.

Не се наблюдават корелации между нивата на Spm (табл. 13) между различните проби (серум и слюнка, слюнка и лезия, здрава кожа и лезия, serum и здрава кожа, serum и лезия, слюнка и здрава кожа).

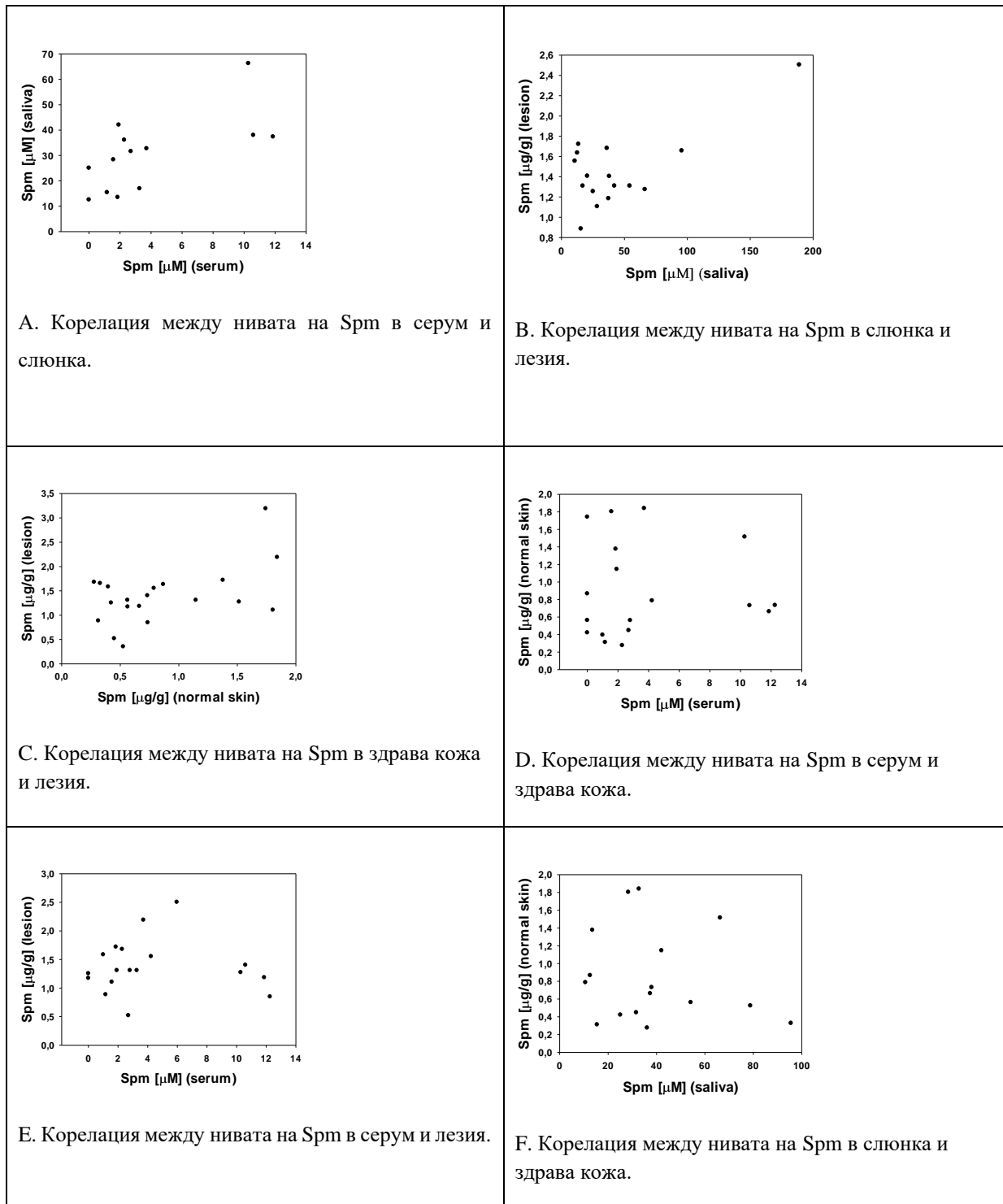


Таблица 13. Корелация между нивата на Spm в различните проби.

Липсата на корелации при изследваните метаболити показва, че тези метаболити не могат да бъдат изследвани за целите на неинвазивна диагностика.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Нивата на хомоцистеин са повишени в серума на пациенти с псориазис, което се свързва с повишения коморбилитет при тези болни
2. По-високото съдържание Spm в серума може да е резултат на засилената епидермална пролиферация и по-високото им отделяне в системната циркулация, или може да се предположи, че те стоят в етиологията на Пс.
3. Нивата на Spm и Put са по-високи в слюнка, като те биха могли да се използват като биомаркер при пациенти с псориазис в бъдеще, ако бъдат направени допълнителни изследвания. При наличие на допълнителни доказателства биха били полезни за проследяване на тежестта на псориазис, прогнозата и да бъдат ценни диагностични методи.
4. Нивата на Hsu в лезия от пациенти с псориазис нямат диагностична стойност, и не могат да служат като показател за степента на коморбилитетите при засегнатите лица.
5. Метаболизма на Met е засегнат в лезиите, поради промяната в неговото ниво в лезионална кожа.

6. По – високите нива на полиамините в лезия могат да бъдат в резултат на нарушения метаболизъм на Hsu, по-конкретно в смущение в трансулфориращия път.

7. Поради липсата на корелации между отделните проби един и същ метаболит, тези метаболити не могат да бъдат използвани за метода на неинвазивна диагностика.

ПРИНОСИ

ОРИГИНАЛНИ

1. ЗА ПЪРВИ ПЪТ СА ИЗСЛЕДВАНИ НИВАТА НА МЕТИОНИН В КОЖА ПРИ ПАЦИЕНТИ С ПСОРИАЗИС.
2. ЗА ПЪРВИ ПЪТ СЕ ИЗСЛЕДВА ВРЪЗКАТА НА ХОМОЦИСТЕИН С ПОЛИАМИНИТЕ ПРИ ПАЦИЕНТИ С ПСОРИАЗИС.
3. ЗА ПЪРВИ ПЪТ СЕ ИЗСЛЕДВАТ ТЪКАННИТЕ НИВА НА ХОМОЦИСТЕИН ПРИ ПСОРИАЗИС

НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧНИ

1. ЛИПСАТА НА КОРЕЛАЦИИ МЕЖДУ ПРОБИТЕ НА ЕДИН И СЪЩ МЕТАБОЛИТ ПОКАЗВА, ЧЕ ТЕ НЕ МОГАТ ДА БЪДАТ ИЗПОЛЗВАНИ ЗА МЕТОДИТЕ НА НЕИНВАЗИВНАТА ДИАГНОСТИКА.

ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД:

Публикации, свързани с дисертационния труд:

- Silviya Ruseva , Inna Popova , Valentin Lozanov and Vanio Mitev ,
Insight into the Metabolite Pattern of Psoriasis: Correlation among
Homocysteine, Methionine, and Polyamines , Symmetry 2021, 13, 606
(IF 3.11)
- И. Попова, С. Русева, Ж. Лозанов, Л. Митева, Из метаболизма на
псориазис: корелации между хомоцистеин, метионин, спермидин и
спермин в слюнка, серум и кожа, GP news, 2020, 6
- И. Попова, В. Лозанов, Л. Митева, Хомоцистеин и коморбилитет
при псориазис – взаимовръзки и корелации, GP news 2016,10
- И. Попова, М. Камушева, Хр. Боденска, Л. Митева, Г. Петрова,
Социалноикономическа тежест на псориазиса и съпътстващите го
заболявания,Обща медицина 2017, 19(1): 56-68

Участия, свързани с дисертационния труд:

- И. Попова, В. Лозанова, Л. Митева, Ролята на хомоцистеина в
коморбилитета на псориазиса, Пролетни варненски дерматологични
дни, Златни пясъци, България, , 07-10.04.2016(орална презентация)
- И. Попова, В. Лозанов, Л. Митева, Хомоцистеин и фолиева киселина
– връзка с коморбилитета при псориазис, Софийски дерматологични
дни “Проф. Асен Дурмишев” , София, България 04-
07.11.2016(орална презентация)

Д-Р ИННА РУМЕНОВА ПОПОВА - СТАТЕВА

РОЛЯ НА ХОМОЦИСТЕИНА В КОМОРБИЛИТЕТА НА ПСОРИАЗИС

АВТОРЕФЕРАТ

София, 2022г.