



RĪGAS STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Elga Sidhoma

PSORIĀZES SLIMNIEKU ĀDAS
LOKĀLĀS AIZSARDZĪBAS SISTĒMAS
MORFOLOĢISKS RAKSTUROJUMS

Promocijas darba kopsavilkums
medicīnas doktora zinātniskā grāda iegūšanai

Specialitāte – morfoloģija

Darba zinātniskie vadītāji:

Dr. med., Dr. habil. med. profesore **Māra Pilmane**

Dr. med. asociētais profesors **Jānis Kīsis**

Rīga, 2015

Promocijas darbs izstrādāts: Rīgas Stradiņa universitātes Anatomijas un antropoloģijas institūtā, Morfoloģijas katedrā

Darba zinātniskie vadītāji:

Dr. med., Dr. habil. med. profesore **Māra Pilmane**,
Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija
Dr. med. asociētais profesors **Jānis Kīsis**,
Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Oficiālie recenzenti:

Dr. med. profesore **Ilze Štrumfa**,
Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija
Dr. med. vet. profesors **Arnis Mugurēvičs**,
Latvijas Lauksaimniecības universitāte
Dr. med. profesors **Andres Arend**,
Tartu universitāte, Igaunija

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2015. gada 2. oktobrī plkst. 15.00 Rīgas Stradiņa universitātes Medicīnas promocijas padomes atklātā sēdē Rīgā, Dzirciema ielā 16, Hipokrāta auditorijā.

Ar promocijas darbu var iepazīties RSU bibliotēkā un RSU mājas lapā: www.rsu.lv



IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ



EIROPAS SAVIENĪBA

Promocijas darbs veikts ar Eiropas sociālā fonda projekta
“Atbalsts doktorantiem studiju programmas apguvei un zinātniskā grāda
ieguvei Rīgas Stradiņa universitātē” finansiālu atbalstu,
vienošanās Nr. 2009/0147/1DP/1.1.2.1.2/09/IPIA/VIAA/009

Promocijas padomes sekretārs:

Dr. med. docents **Andrejs Vanags**

SATURS

Darbā lietotie saīsinājumi	4
Ievads.....	5
1. Materiāls un metodes.....	8
1.1. Morfoloģiski izmeklējamais materiāls	8
1.2. Izmeklēšanas metodes	9
1.2.1. Ādas biopsijas veikšana	9
1.2.2. Rutīnās histoloģijas metode	9
1.2.3. Biotīna – streptavidīna imūnhistoķīmiskā metode	10
1.2.4. TUNEL metode	13
1.2.5. Statistiskās metodes	14
2. Rezultāti	16
2.1. Morfoloģiskā atradne	16
2.2. Imūnhistoķīmisko pētījumu un apoptozes atradne	16
2.3. Statistiski apstrādāto datu analīze	23
3. Diskusija	25
4. Secinājumi	40
5. Izmantotā literatūra	42
6. Publikācijas un prezentācijas par pētījuma tēmu	48
Pateicības	52

DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI

Abreviatūra	Nosaukums angļu valodā	Skaidrojums latviešu valodā
AAI	<i>Institute of Anatomy and Anthropology</i>	Anatomijas un antropoloģijas institūts
CGRP	<i>Calcitonin gene-related peptide</i>	Kalcitonīngēna radniecīgais peptīds
hBD-2	<i>Human beta defensin-2</i>	Cilvēka beta defensīns-2
IL-1 α	<i>Interleukin-1 alpha</i>	Interleikīns-1 alfa
IL-6	<i>Interleukin-6</i>	Interleikīns-6
IL-8	<i>Interleukin-8</i>	Interleikīns-8
IMH	<i>Immunohistochemistry</i>	Imūnhistokīmija
μ l	<i>Microliter</i>	Mikrolitrs
μ m	<i>Micrometer</i>	Mikrometrs
MMP-2	<i>Matrix metalloproteinase-2</i>	Matrices metaloproteināze-2
PASI	<i>Psoriasis Area Severity Index</i>	Psoriāzes bojājuma plašuma un izteiktības indekss
PGP 9.5	<i>Protein gene product 9.5</i>	Proteīna gēna produkts 9,5
RSU	<i>Rīga Stradiņš University</i>	Rīgas Stradiņa universitāte
Th	<i>T helper lymphocytes</i>	T helperu limfocīti
TIMP-2	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase-2</i>	Matrices metaloproteināzes-2 audu inhibitors
TIMP-4	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase-4</i>	Matrices metaloproteināzes-4 audu inhibitors
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>	Tumora nekrozes faktors alfa
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>	Deoksīnukleotidiltransferāzes mediēta dnt terminālo 3'-galu marķēšana ar deoksīuridinofosfātu

IEVADS

Psoriāze ir hroniska un neizārstējama ādas slimība, kuras patoģenēzē ir nozīme mikrobu superantigēniem un kura ievērojami pazemina pacienta dzīves kvalitāti. Pēdējo gadu laikā iegūti jauni un vēl pilnībā neizpētīti dati par dabīgu antimikrobo peptīdu esamību ādā. Neskatoties uz palielināto mikroorganismu daudzumu psoriāzes pacienta ādā, šie slimnieki ar sekundārām bakteriālām ādas infekcijām slimo reti. Tādēļ dabīgo antimikrobo peptīdu klātbūtnei psoriāzes pacienta ādā ir būtiska nozīme.

Paaugstināta antimikrobo peptīdu produkcija psoriāzes gadījumā korelē ar zemu sekundārās infekcijas proporciju salīdzinājumā ar citām iekaisīgām dermatozēm, kuru gadījumā antimikrobo peptīdu produkcija netiek paaugstināta un pacienti ir ļoti uzņēmīgi pret bakteriālām un virusālām infekcijām. Atšķirības (samazināšanās) antimikrobo peptīdu ekspresijā dažādu citu dermatožu pacientiem un sekojošās (biežākas) ādas infekcijas parāda antimikrobo peptīdu imunoloģisko vērtību (*Braff et al.*, 2005; *Jongh et al.*, 2005; *Schauber and Gallo*, 2007).

Ādas neuroimunoendokrīno sistēmu veido ādas makrofāgi, neuropeptīdus saturošā inervācija un neuroendokrīnās šūnas (*Roosterman et al.*, 2006). Tādējādi aktuāli ir šīs sistēmas ietekmējošie faktori kontekstā ar antimikrobo peptīdu pārmaiņām un to savstarpēja mijiedarbība, kā deģenerācijas, apoptozes un šūnu nāves marķieri, neuropeptīdi un interleikīni, kas kopā nodrošina ādas lokālo aizsardzību. Kopumā, neskatoties uz atsevišķiem pētījumu virzieniem, paliek neatbildēta virkne jautājumu par antimikrobo peptīdu korelāciju ar vietējo ādas neuroimunoendokrīno sistēmu dažāda vecuma un dažādas saslimšanas gaitas psoriāzes pacientiem.

Pētījuma **mērķis** bija dažādas norises psoriāzes pacientu lokālās ādas aizsardzības sistēmas morfoloģiskā izpēte ontogēnētiskā aspektā.

Lai pētījumu veiktu, tika izveidoti sekojoši **darba uzdevumi**:

1. Izpētīt psoriāzes norisi ietekmējošo faktoru: antimikrobo peptīdu, deģenerācijas, apoptozes un šūnu nāves marķieru, neuropeptīdu un interleikīnu sadalījumu un relatīvo daudzumu slimības skartā ādā.
2. Izpētīt antimikrobo peptīdu, deģenerācijas, apoptozes un šūnu nāves marķieru, neuropeptīdu un interleikīnu sadalījumu un relatīvo daudzumu intaktā, t. i., veselā ādā.
3. Savstarpēji korelēt iegūtos datus gan psoriāzes pacientiem, gan kontroles gadījumā, un savstarpēji.
4. Korelēt morfoloģiskos datus ar pacientu slimības klīnisko gaitu un ainu.
5. Izveidot morfoloģiskos diagnostiski prognostiskos psoriāzes kritērijus pacientiem ar psoriāzi slimības norises un terapijas gaitā.

Darba hipotēze

Psoriāzes morfopatogēnēzē nozīme ir dabīgo antimikrobo peptīdu un to sekrēciju ietekmējošo faktoru pārmaiņām, kas kopumā korelē ar ādas lokālo neiroimunoendokrīno sistēmu, un dažādi izpaužas dažādas slimības norises gaitā.

Darba novitāte

Šajā pētījumā pirmo reizi 40 *Psoriasis vulgaris* pacientiem ar imūnhistoķīmijas un *TUNEL* metodēm izpētīti ādas audi no neārstēta ādas iekaisuma rajona. Dokumentēts mikrofotogrāfiju attēlos un statistiski ticami pierādīts *hBD-2*, *PGP 9.5*, *CGRP*, *P* vielas, *TNF-α*, *IL-1α*, *IL-6*, *IL-8*, *MMP-2*, *TIMP-2* un *TIMP-4* imūnreaktīvo šūnu un nervšķiedru relatīvais daudzums,

kā arī apoptozes klātbūtne psoriāzes iekaisuma skartā ādā. Līdz šim publicētajā literatūrā šādi **kompleksi** dati nav atrodam, jo visbiežāk tikai tiek pētīts kāds atsevišķs faktors vai noteikta faktoru grupa.

Personīgais ieguldījums

Šī darba autore ir piedalījies visu pētījuma sadaļu izstrādē, veikusi imūnhistoķīmisko novērtēšanu un vizualizāciju, kā arī ir visu mikrofotogrāfiju autore.

Ētiskie aspekti

Pētījumam izsniegta Ētikas komitejas atļauja – RSU Ētikas komitejas lēmums 2009. gada 1. septembrī un pētījums veikts saskaņā ar Helsinku deklarāciju.

Promocijas darba struktūra un apjoms

Promocijas darbs ir uzrakstīts latviešu valodā. Tam ir klasiska struktūra un tas sastāv no 8 daļām: ievads, literatūras apskats, materiāls un metodes, rezultāti, diskusija, secinājumi, literatūras saraksts un pielikumi. Promocijas darba apjoms ietver 126 lapaspuses, tai skaitā, 12 tabulas, 10 grafikus un 72 attēlus (67 mikrofotogrāfijas). Literatūras saraksts sastāv no 201 avota.

1. MATERIĀLS UN METODES

1.1. Morfoloģiski izmeklējamais materiāls

Pacientu iekļaušanai pētījumā tika izveidoti atlases kritēriji. Iekļaušanas kritēriji bija sekojoši:

1. Pacients vecāks par 18 gadiem.
2. Vērojami psoriāzei raksturīgie izsitumi tipiskajās atrašanās vietās.
3. Pacients slimo ar psoriāzi vismaz 4 nedēļas, saslimšana pirmreizēja un agrāk nav diagnosticēta vai anamnēzē nesekmīga medikamentozā ārstēšana.
4. Pacients nav saņēmis nekādu psoriāzes terapiju pēdējā mēneša laikā, nav lietojis kortikosteroīdus saturošus lokālus medikamentus bojātajos ādas rajonos (izņemot mitrinošus ādas kopšanas līdzekļus).
5. Āda nav stipri nosauļota.
6. Nav citu ādas slimību vai citu saslimšanu.

Visiem pacientiem vizītes laikā tika ievākta slimības anamnēze, ietverot datus par slimības ilgumu, norisi, lietotajiem medikamentiem, ģimenes anamnēzi. Tāpat tika noteikts *PASI* (psoriāzes bojājuma plašuma un izteiktības indekss). Tika izvērtētas trīs pazīmes – eritēma, indurācija un deskvamācija un aprēķināts skartās virsmas laukums procentuāli. Tika izdalītas četras zonas – galva, ķermenis, rokas un kājas, un katrai zonai minētās pazīmes un bojājuma laukums tika vērtēts atsevišķi, pēc tam to summējot. *PASI* iespējams robežās no 0 līdz 72 punktiem (*Ashcroft et al.*, 1999).

Kopumā pētījumā iekļauti 40 *Psoriasis vulgaris* pacienti, no tiem deviņas sievietes un 31 vīrietis, ar slimības anamnēzi no 4 nedēļām līdz 44 gadiem un *PASI* robežās no 1,2 līdz 60,0. Biežākā izsitumu lokalizācija bija skalps, elkoņi, ceļgali un arī izkaisīti uz ķermeņa.

Kā kontroles pacienti pētījumā tika iekļauti 10 pacienti. Izvēlēta pacientu grupa ietvēra 4 pieaugušos (3 sievietes un 1 vīrietis, vecumā no 31 līdz 54 gadiem) un 6 bērnus (vecumā no 7 līdz 12 gadiem) bez iekaisīgām ādas slimībām anamnēzē un esošām vizuālām izmaiņām uz ādas. Pieaugušo kontroles ādas audu materiāls tika iegūts labdabīgu nēvusu ekscīzijas operācijās no operācijas brūces robežām. Bērnu kontroles ādas audu materiāls tika iegūts no RSU AAI arhīva materiāla, kas iegūts 1998.–2003.

1.2. Izmeklēšanas metodes

1.2.1. Ādas biopsijas veikšana

Ādas biopsija tika veikta, izmantojot *Punch* (perforatora) tehniku. Tika izvēlēta ādas biopsijas vieta – jauns, neārstēts psoriāzes iekaisuma laukums, veikta ādas dezinfekcija ar spirtu saturošu ādas dezinfekcijas aerosolu un pielietota lokāla 2% lidokaīna anestēzija. Biopsijas veikšanai izmantots 3 mm perforatora skalpelis. Pēc ādas audu parauga iegūšanas veikta hemostāze, apstrāde ar 2% fucidīnskābes ziedi un pārsiešana.

1.2.2. Rutīnās histoloģijas metode

Iegūtais ādas audu materiāls tika fiksēts Stefanini šķīdumā (*Stefanini et al.*, 1967). Fiksētais audu materiāls tika sagatavots ieliešanai parafīna blokos. Materiāla atūdeņošanai un attaukošanai tika izmantots spirts. Kā starpposms starp spirtu un parafīnu tika lietotas divas ksilola maiņas. Sekojoši maisījums tika homogenizēts un audi infiltrēti, ielejot divas parafīna maiņas. Parafīna bloki tika iegūti ar parafīna dozatora palīdzību. No aparāta parafīns tika ieliets speciālās kasetēs. Sekojoši izgatavoti 3–4 μm (mikrometri) plāni griezumumi ar pusautomātiskā rotācijas mikrotoma (*Leica RM2245*,

Leica Biosystems Richmond Inc., ASV) palīdzību. Materiāla griezumus no mikrotoma žiletas tika pārnesti uz 48–50°C ūdeni un pēc tam uz tīra un attaukota priekšmetstikliņa. Izmantoti *HistoBond*^{®+} (*Paul Marienfeld GmbH & Co. KG*, Vācija) priekšmetstikliņi. Pēc tam histoloģiskie griezumumi tika žāvēti termostātā 56°C 20–60 minūtes. Tālāk sekoja audu krāsošana. Vispirms tika veikta deparafinizācija ar ksilolu, pēc tam dehidratācija ar 96° spirtu. Audu griezumumi krāsoti ar hematoksilīnu un eozīnu (*Mayer*, 1896; *Lillie*, 1965; *Fischer et al.*, 2008). Krāsošanai sekoja atūdeņošana ar 70°–96° spirtu, dzidrināšana ar karboksilolu un ksilolu, segstikliņu (kods D102450, *Deltalab*, Spānija) pielikšana un pielīmēšana. Segstikliņu pielīmēšanai izmantota speciālā *Pertex* līme (Lot 1710013, *Histolab Products AB*, Zviedrija). Rezultātā iegūti pārskata griezumumi, kur šūnu bazofilās struktūras krāsojas zili violetas, bet acidofilās – sārtas. Preparāti tika izskatīti *Leica* gaismas mikroskopā.

1.2.3. Biotīna – streptavidīna imūnhistoķīmiskā metode

Ādas audu paraugi tika fiksēti Stefanini šķīdumā, kam sekoja audu materiāla atūdeņošana, attaukošana un ieliešana parafīna blokos pēc iepriekš aprakstītās shēmas. No iegūtajiem parafīna blokiem ar mikrotoma palīdzību tika veikti 3–4 µm plāni griezumumi, kas pārnesti uz priekšmetstikliņa. Sekojoši veikta audu deparafinizācija ar ksilolu, pēc tam griezumumi nomazgāti ar 96° spirtu.

Audu griezumumi tika krāsoti pēc biotīna – streptavidīna imūnhistoķīmiskās metodes (*Hsu et al.*, 1981), lai audu paraugos noteiktu:

- **cilvēka beta defensīnu-2** (*hBD-2*, kods AF2758, iegūts no kazas, darba atšķaidījums 1:100, *R&D Systems*, Vācija),
- **proteīna gēna produktu 9,5** (*PGP 9.5*, kods Z5116, iegūts no truša, darba atšķaidījums 1:600, *DakoCytomation*, Dānija),

- **kalcitonīngēna radniecīgo peptīdu** (*CGRP*, kods 281328, iegūts no truša, darba atšķaidījums 1:30, *Quartett*, Vācija),
- **P vielu** (kods ab14184, iegūts no peles, darba atšķaidījums 1:1000, *Abcam*, Lielbritānija),
- **tumora nekrozes faktoru alfa** (*TNF- α* , kods ab6671, iegūts no truša, darba atšķaidījums 1:100, *Abcam*, Lielbritānija),
- **interleikīnu-1 alfa** (*IL-1 α* , kods sc-9983, iegūts no peles, darba atšķaidījums 1:50, *Santa Cruz Biotechnology, Inc.*, ASV),
- **interleikīnu-6** (*IL-6*, kods sc-73319, iegūts no peles, darba atšķaidījums 1:50, *Santa Cruz Biotechnology, Inc.*, ASV),
- **interleikīnu-8** (*IL-8*, kods sc-1269, iegūts no kazas, darba atšķaidījums 1:50, *Santa Cruz Biotechnology, Inc.*, ASV),
- **matrices metaloproteināzi-2** (*MMP-2*, kods AF902, iegūts no kazas, darba atšķaidījums 1:100, *R&D Systems*, Vācija),
- **matrices metaloproteināzes-2 audu inhibitoru** (*TIMP-2*, kods sc-21735, iegūts no peles, darba atšķaidījums 1:50, *Santa Cruz Biotechnology, Inc.*, ASV),
- **matrices metaloproteināzes-4 audu inhibitoru** (*TIMP-4*, kods orb106543, iegūts no truša, darba atšķaidījums 1:50, *Biorbyt Limited*, Lielbritānija).

Audu paraugi tika skaloti *TRIS* buferī (Lot 0713513, *Diapath S.p.A.*, Itālija) 2 reizes 5 minūtes ilgi un ievietoti vārīšanas buferī *EDTA* (Lot 0713311, *Diapath S.p.A.*, Itālija) mikroviļņu krāsnī uz laiku līdz 20 minūtēm. Sekojoši kontainers tika izņemts un atdzesēts ar paraugiem buferī līdz 20 minūtēm, kamēr sasniedza 65°C. Paraugs tika ievietots *TRIS* mazgāšanas buferī un tika veikta bloķēšana ar peroksidāzes bloku 10 minūtes (kods K400611, *DakoCytomation*, Dānija). Sekoja skalošana 2 reizes 5 minūtes un skalošana *TRIS* mazgāšanas buferī 5 minūtes.

Antivielām, kas iegūtas no **kazas**, tika izmantota **LSAB krāsošanas sistēma** (kods sc-2053, *Santa Cruz Biotechnology, Inc.*, ASV). Vispirms tika veikta inkubācija ar primāro antivielu 2 stundas, sekoja mazgāšana *TRIS* mazgāšanas buferī 5 minūtes un inkubācija 30 minūtes ar biotīnu (sekundāro antivielu). Tālāk sekoja mazgāšana *TRIS* mazgāšanas buferī 5 minūtes, inkubācija 30 minūtes ar *HRP*-streptavidīna kompleksu, mazgāšana *TRIS* mazgāšanas buferī 5 minūtes. Audu pārklāšana ar šķidro *DAB*+ substrāta hromogēno sistēmu un inkubēšana istabas temperatūrā, iegūstot pozitīvo struktūru krāsojumu brūnā krāsā, tika veikta līdz 10 minūtēm. Pēc tam nomazgājām paraugu ar destilētu ūdeni 5 minūtes un veicām kontrastkrāsošanu ar hematoksilīnu (kods 05-M06002, *Mayer's Hematoxylin, Bio Optica Milano S.p.A.*, Itālija) 2 minūtes.

Antivielām, kas iegūtas no **peles vai truša**, tika izmantota **EnVision krāsošanas sistēma** (kods K400611, *DakoCytomation*, Dānija). Inkubācijai ar primāro antivielu 2 stundas sekoja mazgāšana *TRIS* mazgāšanas buferī 2 reizes 5 minūtes un *EnVision*+/saistošais posms 30 minūtes. Sekojoši atkal veicām mazgāšanu *TRIS* mazgāšanas buferī 2 reizes 5 minūtes. Audu pārklāšana ar šķidro *DAB*+ substrāta hromogēno sistēmu un inkubēšana istabas temperatūrā, iegūstot pozitīvo struktūru krāsojumu brūnā krāsā, tika veikta no 1 līdz 10 minūtēm. Pēc tam nomazgājām paraugu ar destilētu ūdeni 5 minūtes un veicām kontrastkrāsošanu ar hematoksilīnu (kods 05-M06002, *Mayer's Hematoxylin, Bio Optica Milano S.p.A.*, Itālija) 2 minūtes.

TIMP-2 un TIMP-4 antivielām tika izmantota **HiDef DetectionTM HRP Polymer sistēma** (kods 954D-30, *Cell Marque Corporation*, ASV). Vispirms tika veikta inkubācija ar primāro antivielu 2 stundas. Pēc tam paraugu mazgājām *TRIS* mazgāšanas buferī 3 reizes un pievienojām reaģentu *Link* vai *Amplifier*, un inkubējām istabas temperatūrā 10 minūtes. Paraugi tika skaloti *TRIS* mazgāšanas buferī 3 reizes un inkubēti ar reaģentu *Label* vai *Polymer Detector* istabas temperatūrā 10 minūtes. Atkal sekoja skalošana

TRIS mazgāšanas buferī 3 reizes. Audu pārklāšana ar šķidro DAB+ substrāta hromogēno sistēmu un inkubēšana istabas temperatūrā, iegūstot pozitīvo struktūru krāsojumu brūnā krāsā, tika veikta no 3 līdz 5 minūtēm. Kontrastkrāsošanu ar hematoksilīnu (kods 05-M06002, *Mayer's Hematoxylin*, *Bio Optica Milano S.p.A.*, Itālija) veicām 2 minūtes.

Neatkarīgi no izmantotās krāsošanas sistēmas, visi iegūtie preparāti nobeigumā tika atūdeņoti ar 70°–96° spirtu un dzidrināti ar karboksilolu un ksilolu, kā arī ar *Pertex* līmi (Lot 1710013, *Histolab Products AB*, Zviedrija) pielīmēti segstikliņi. Preparāti tika izskatīti *Leica* gaismas mikroskopā.

1.2.4. TUNEL metode

Programmēta šūnu nāve jeb apoptoze iegūtajos audu paraugos tika izvērtēta, izmantojot *TUNEL* (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*, *Gavrieli et al.*, 1992; *Negoescu et al.*, 1996) metodi. Tika lietots *In situ Cell Death Detection* apoptozes komplekts (*POD* kataloga nr. 1 684 817, *Roche Diagnostics*, Šveice). Griezumi tika deparafinizēti ar ksilolu divas reizes un trīs dažādu koncentrāciju (70°–96°) spirtu dilstošā secībā, arī divas reizes ar katru. Sekojoši griezumai tika mazgāti destilētā ūdenī un fosfātu bufera šķīdumā. Kā nākamais solis tika veikta endogēnās peroksidāzes aktivitātes bloķēšana. Pēc tam audu paraugi atkal tika mazgāti fosfātu bufera šķīdumā 3 reizes, vārīti 10 minūtes un vēlreiz mazgāti fosfātu bufera šķīdumā. Pozitīvas kontroles iegūšanai viens griezums tika krāsots ar *DNase I* 1 mg/ml 10 minūtes un mazgāts fosfātu bufera šķīdumā. Visi audu griezumai 10 minūtes tika bloķēti 0,1% govs seruma albumīna fosfātu bufera šķīdumā un inkubēti ar *TUNEL* maisījumu 1 stundu 37°C tvertnē ar mitrinātu gaisu. Negatīvas kontroles iegūšanai vienu griezumu ievietoja tikai fosfātu bufera šķīdumā. Griezumai atkal mazgāja ar fosfātu bufera šķīdumu un inkubēja *POD* atbilstoši apoptozes komplekta instrukcijām

30 minūtes 37°C, pēc tam mazgāja fosfātu bufera šķīdumā. Audu griezumus pārklāja ar diaminobenzidīna substrāta šķīdumu (kataloga nr. SK-4100, *Vector Laboratories, Inc.*, ASV) 7 minūtes, skaloja destilētā ūdenī 5 minūtes un veica kontrastkrāsošanu ar hematoksilīnu (kods 05-M06002, *Mayer's Hematoxylin, Bio Optica Milano S.p.A.*, Itālija). Apoptotisko šūnu kodoli krāsojās brūnā krāsā. Preparāti tika izskatīti *Leica* gaismas mikroskopā.

Preparātu mikrofotogrāfiju iegūšanai tika izmantoti *Leica DC300F* mikroskops ar *Leica DFC420* digitālo kameru (*Leica Microsystems GmbH*, Vācija) un *Leica DM6000 B* mikroskops ar *Leica DFC450 C* digitālo kameru (*Leica Microsystems GmbH*, Vācija), kā arī attēlu vizualizācijas programma *Image-Pro Plus* (*Media Cybernetics, Inc.*, ASV) un *Leica* attēlu vizualizācijas programma (*Leica Microsystems GmbH*, Vācija).

1.2.5. Statistiskās metodes

Imūnhistoķīmiski noteiktās struktūras analizētas, izmantojot puskvantitatīvo skaitīšanas metodi (*Pilmane et al.*, 1995). Pozitīvo struktūru relatīvais biežums tika izvērtēts trīs nejauši izvēlētos redzes laukos katram sagatavotajam griezumam sekojoši:

- redzeslaukā nav konstatēta neviena pozitīvā struktūra;
- /+ redzeslaukā atsevišķas pozitīvās struktūras;
- + redzeslaukā maz pozitīvo struktūru;
- +/// redzeslaukā maz līdz vidēji daudz pozitīvo struktūru;
- ++ redzeslaukā vidēji daudz pozitīvo struktūru;
- ++/+++ redzeslaukā vidēji daudz līdz daudz pozitīvo struktūru;
- +++ redzeslaukā daudz pozitīvo struktūru;
- +++//++++ redzeslaukā daudz līdz ļoti daudz pozitīvo struktūru;
- ++++ redzeslaukā ļoti daudz pozitīvo struktūru.

TUNEL metodes un apoptozes atradnes izvērtēšanai tika aprēķināts arī apoptotiskais indekss (*Potten*, 1996) – katrā griezumā tika izvērtēti trīs nejauši izvēlēti redzes lauki un skaitītas 100 šūnas, no kurām atsevišķi vērtētas apoptotiskās šūnas, noteikts vidējais šūnu skaits no trīs redzes laukiem un rezultāts dalīts ar 100.

Datu izvērtēšanai tika izvēlēta neparametriskā statistika. Lai izvērtētu, vai psoriāzes un kontroles pacientu grupu rādītāju atšķirības ir statistiski nozīmīgas, tika izmantots Manna – Vitneja U tests (*Mann and Whitney*, 1947). Divu mainīgu lielumu savstarpējās atbilstības ciešuma izvērtēšanai izmantots Spīrmena rangu korelācijas koeficients (*Spearman*, 1904).

Iegūtie dati interpretēti sekojoši:

- 0,00–0,19 – ļoti vāja korelācija;
- 0,20–0,39 – vāja korelācija;
- 0,40–0,59 – vidēji cieša korelācija;
- 0,60–0,79 – cieša korelācija;
- 0,80–1,00 – ļoti cieša korelācija.

Korelācija tika uzskatīta par statistiski nozīmīgu tikai, ja iegūtā p-vērtība bija mazāka par 0,05 jeb 5% ticamības līmeni.

Statistiskā analīze veikta ar *SPSS (Statistical Package for the Social Sciences)* 20.0 versiju (*IBM Corporations*, ASV).

2. REZULTĀTI

2.1. Morfoloģiskā atradne

Visu 10 kontroles pacientu ādas audu pārskata paraugos konstatējām praktiski neizmainītas ādas histoloģisko ainu.

Visu pētījumā iekļauto psoriāzes pacientu ādas audu pārskata griezumos patoloģiskas izmaiņas tika konstatētas gan epidermā, gan dermā. Epidermā novērojām tās nevienmērīgu sabiezēšanu, bazālā un dzeloņainā slāņa izteiktu proliferāciju, bieži graudainā slāņa izzušanu ar parakeratozi. Atsevišķu psoriāzes pacientu ādā konstatējām psoriāzes histoloģiskajai ainai raksturīgo Munro mikroabscesu un Kogoj sūklveidīgu pustulu klātbūtni. Dermā bija vērojami plaši limfocītus, polimorfonukleāros leukocītus un makrofāģus saturoši iekaisuma infiltrāti. Tika novērota arī arteriolu skleroze un ekrīnos sviedru dziedzerus veidojošo glandulocītu vakuolizācija.

2.2. Imūnhistoķīmisko pētījumu un apoptozes atradne

Kontroles grupas pacienti

Epidermā *hBD-2*-saturušu keratinocītu bija maz līdz vidēji daudz (+/++) redzes laukā, kamēr dermas saistaudos *hBD-2*-saturušo šūnu redzeslaukā vidēji bija maz (+).

Gan epidermā, gan dermā daudz līdz ļoti daudz (+++/++++) struktūru saturēja *PGP 9.5*.

Epidermā ap keratinocītiem bija atrodamas daudz līdz ļoti daudz (+++/++++) *CGRP* pozitīvas struktūras redzes laukā, kamēr dermas saistaudos bija vidēji daudz līdz daudz (++) *CGRP* pozitīvas struktūras redzes laukā.

Epidermā daudz (+++) struktūras saturēja P vielu un dermas saistaudos vidēji daudz līdz daudz (++) struktūras saturēja P vielu.

TNF-α tika novērots maz līdz vidēji daudz epidermas keratinocītos un variēja no atsevišķām (-/+) līdz vidēji daudz (++) pozitīvām šūnām dermā.

IL-1α-saturēši keratinocīti bija maz (+), kamēr dermā *IL-1α*-saturēšas saistaudu šūnas tika konstatētas tikai dažos audu paraugos.

Ļoti daudz (+++++) epidermas keratinocīti un daudz (++) dermas saistaudu šūnas saturēja *IL-6*.

IL-8 atradne arī bija uzskatāma – konstatējām daudz (+++) *IL-8*-saturēšus keratinocītus epidermā un vidēji daudz līdz daudz (++) *IL-8* pozitīvas dermas saistaudu šūnas.

MMP-2 konstatējām maz līdz vidēji daudz (++) keratinocītos un vidēji daudz līdz daudz (++) dermas saistaudu šūnās.

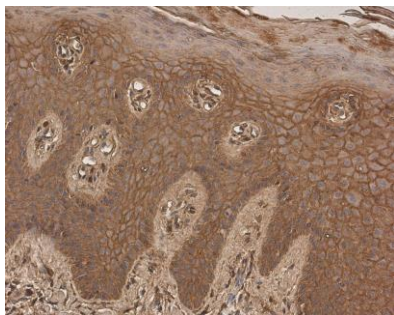
Daudz (++) keratinocīti saturēja *TIMP-2*, kamēr tikai vidēji daudz (++) *TIMP-2*-saturēšas saistaudu šūnas tika konstatētas dermā.

Arī daudz (++) *TIMP-4*-saturēši keratinocīti tika konstatēti veselas ādas epidermā, kamēr vidēji daudz līdz daudz (++) dermas fibroblasti saturēja *TIMP-4*.

Apoptoze tika konstatēta visu kontroles pacientu ādas audu griezumos. Daudz līdz ļoti daudz (++) epidermas keratinocītos un daudz (++) dermas saistaudu šūnās novērojām apoptozes klātbūtni.

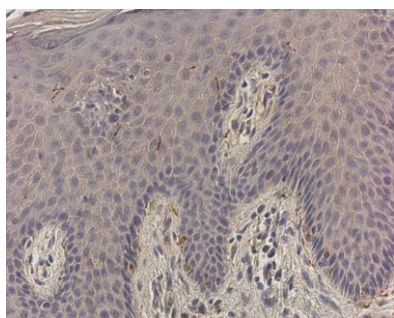
Psoriāzes pacienti

hBD-2 tika novērots visos audu paraugos. Vidēji daudz līdz daudz (++) epidermas keratinocīti un dermas fibroblasti, makrofāgi un limfocīti saturēja *hBD-2*. Daļai mūsu pacientu audu paraugos novērojām ļoti daudz *hBD-2*-saturēšus keratinocītus ar izteiktāku tieši bazālā un dzeloņainā slāņa keratinocītu antimikrobo atbildi (2.1. attēls).



2.1. attēls. Bagātīga *hBD-2* klātbūtne gan 64 gadus vecas psoriāzes pacientes epidermā, gan dermas saistaudu un iekaisuma šūnās. Epidermā izteikts *hBD-2*-saturušu keratinocītu pārsvars bazālajā un dzeloņainajā slānī. *hBD-2 IMH*, $\times 250$

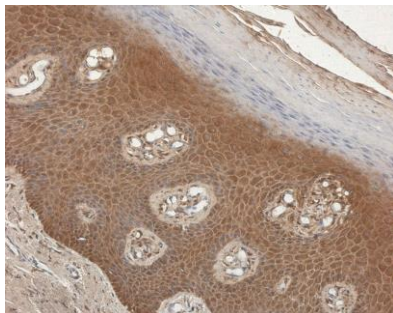
PGP 9.5-saturušu struktūras epidermā bija maz līdz vidēji daudz (+/++) un dermā vidēji daudz (++). Novērojām smalkas *PGP 9.5*-saturušu nervšķiedras starp keratinocītiem, dermas kārpīņu slānī, gar epidermas un dermas robežu (2.2. attēls), iekaisuma infiltrātos, ap asinsvadiem un sviedru dziedzeriem.



2.2. attēls. Maz (+) smalkas *PGP 9.5*-saturušu nervšķiedras vijas cauri epidermas dzeloņainajam slānim 51 gadu veca psoriāzes pacienta ādā ar ilgstošu slimības anamnēzi. Vienlaikus vērojamas vidēji daudz (++) *PGP 9.5*-saturušu nervšķiedras audos uz epidermas un dermas robežas. *PGP 9.5 IMH*, $\times 400$

CGRP-saturušu nervšķiedras ap keratinocītiem epidermā bija vidēji daudz (++), kamēr dermā atradām vidēji daudz līdz daudz (++)

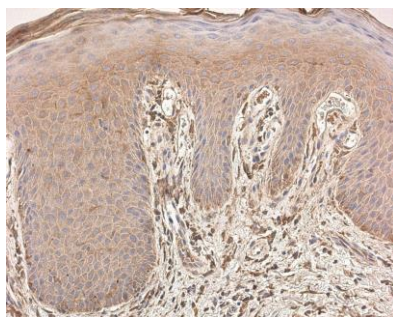
CGRP-saturošas nervšķiedras. Biežāk vērojām peptīda dominēšanu epidermas bazālā un dzeloņainā slāņa šūnās (2.3. attēls).



2.3. attēls. **Ļoti daudz (++++)** *CGRP*-saturošas struktūras tieši epidermas bazālajā un dzeloņainajā slānī 68 gadus vecam psoriāzes pacientam ar 44 gadus ilgu slimības anamnēzi. *CGRP IMH*, $\times 200$

P vielas atradne bija ierobežota – tikai 24 mūsu psoriāzes pacientu epidermā konstatējām P vielu saturošas struktūras epidermā (pārsvarā atsevišķas (-/+) pozitīvas struktūras), kamēr visi ādas audu paraugi saturēja P vielu dermā, arī lielākoties atsevišķas (-/+) pozitīvas struktūras.

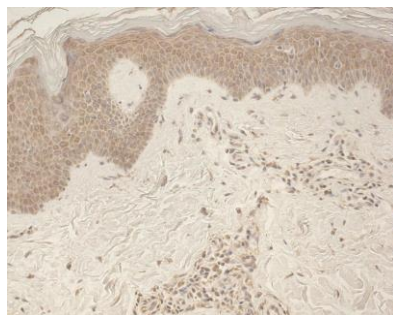
Maz līdz vidēji daudz (+/++) keratinocīti un vidēji daudz līdz daudz (++) fibroblasti un iekaisuma šūnas dermā saturēja *TNF- α* . 10 pacientu dermā novērojām ļoti daudz (++++ *TNF- α* pozitīvas šūnas (2.4. attēls).



2.4. attēls. **38 gadus veca psoriāzes pacienta ar 6 mēnešus ilgu slimības anamnēzi, taču ļoti smagu un plašu ādas bojājumu skartā ādā dermā redzamas ļoti daudz (++++) *TNF-α*-saturošas saistaudu un iekaisuma šūnas. Epidermas vidējā daļā atrodamas faktora pozitīvas citolemmas. *TNF-α IMH*, $\times 250$**

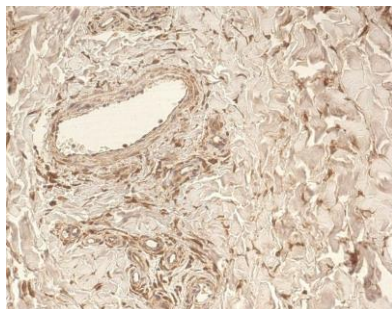
Tikai atsevišķi (-/+) keratinocīti saturēja *IL-1α*. Dermā maz (+) fibroblastu, bet vidēji daudz (++) iekaisuma šūnu saturēja *IL-1α*.

IL-6 atradne bija bagātīga. Vidēji daudz līdz daudz (++) keratinocīti epidermā un vidēji daudz līdz daudz (++) fibroblasti un iekaisuma šūnas dermā saturēja *IL-6*. Atsevišķu pacientu epidermā atradām ļoti daudz (++) *IL-6*-saturošus keratinocītus un daudz līdz ļoti daudz (++) *IL-6*-saturošus fibroblastus un iekaisuma šūnas (2.5. attēls).



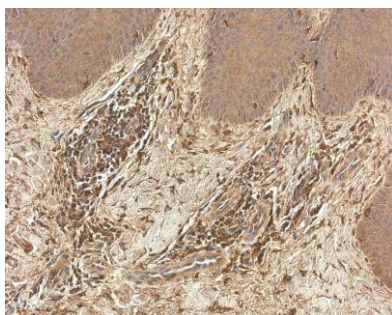
2.5. attēls. **65 gadus veca psoriāzes pacienta epidermā redzami ļoti daudz (++) *IL-6*-saturīgi keratinocīti. Vienlaikus arī dermas saistaudos iekaisuma infiltrātu šūnas satur *IL-6*. *IL-6 IMH*, $\times 200$**

IL-8 novērojām vidēji daudz līdz daudz (++)/+++ keratinocītos un dermas šūnās (fibroblastos, makrofāgos, limfocītos). Vienlaikus *IL-8*-saturošas šūnas tika konstatētas perivaskulāri (2.6. attēls).



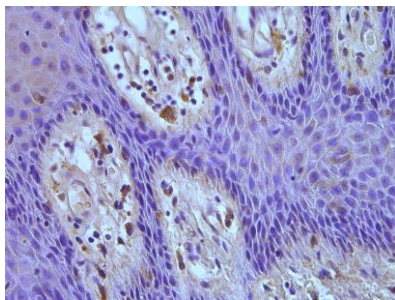
2.6. attēls. **40 gadus vecas psoriāzes pacientes ādas dermas tīklainajā slānī perivaskulāri redzamas daudz (+++) *IL-8*-saturošas šūnas.**
IL-8 IMH, × 200

Vidēji daudz līdz daudz (++)/+++ keratinocīti un daudz (+++) dermas šūnas saturēja *MMP-2*. Svarīgi minēt, ka ievērojamam mūsu audu paraugu skaitam ļoti daudz (+++++) keratinocīti (11 pacienti) un dermas šūnas (17 pacienti) saturēja *MMP-2* (2.7. attēls).



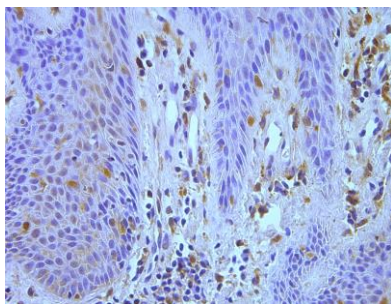
2.7. attēls. **40 gadus vecam psoriāzes pacientam ar vienu gadu ilgu slimības anamnēzi dermā perivaskulāri iekaisuma šūnu infiltrāti bagātīgi satur *MMP-2*.** *MMP-2 IMH, × 250*

Maz (+) keratinocīti un vidēji daudz (++) dermas fibroblasti un iekaisuma šūnas saturēja *TIMP-2* (2.8. attēls). Biežāk novērojām tieši *TIMP-2* pozitīvu bazālo keratinocītu dominēšanu.



2.8. attēls. **Dermas saistaudos redzamas vidēji daudz (++) *TIMP-2*-saturošas iekaisuma šūnas 36 gadus vecam psoriāzes pacientam. *TIMP-2* IMH, × 400**

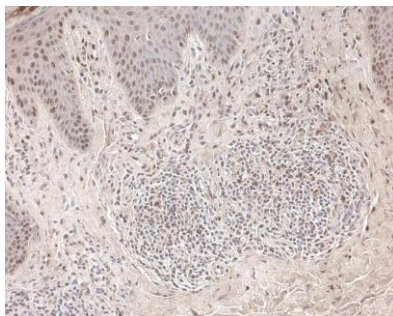
Pārsvarā vidēji daudz (++) keratinocīti un vidēji daudz līdz daudz (++)/++++) dermas fibroblasti, makrofāgi, limfocīti saturēja *TIMP-4* (2.9. attēls).



2.9. attēls. **Daudz (++++) *TIMP-4*-saturošas šūnas redzamas 36 gadus veca psoriāzes pacienta ādā. Šūnas reprezentē gan epidermas keratinocītus, gan dermas fibroblastus un iekaisuma šūnas. *TIMP-4* IMH, × 400**

Apoptoze tika novērota keratinocītos (pārsvarā maz (+)), dermas fibroblastos un iekaisuma šūnās (pārsvarā vidēji daudz (++)), kā arī tauku un sviedru dziedzerus veidojošajos glandulocītos, asinsvadu sienīņās un mata

folikulu šūnās (2.10. attēls). Apoptotiskais indekss bija robežās no $0,22 \pm 0,06$ līdz $0,91 \pm 0,16$.



2.10. attēls. 19 gadus veca psoriāzes pacienta ādā redzamas daudz (+++) apoptotiskas iekaisuma šūnas dermas perēkļveida iekaisuma infiltrātos.

Vienlaicīgi arī daudz (+++) apoptotiski keratinocīti epidermā.

TUNEL, $\times 200$

2.3. Statistiski apstrādāto datu analīze

Statistiski nozīmīga atšķirība starp psoriāzes pacientu un kontroles pacientu grupām pastāv *hBD-2*, *PGP 9.5*, *P* vielas faktoriem un apoptotisko šūnu daudzumam epidermā un dermā, kā arī *CGRP*, *TIMP-2* un *TIMP-4* faktoriem epidermā.

Statistiski nozīmīgu ļoti ciešu pozitīvu korelāciju konstatējām:

- 0,921 (p 0,000) – starp šūnām, kas saturēja *hBD-2* epidermā un dermā,
- 0,915 (p 0,000) – starp *TNF- α* -saturošām šūnām epidermā un dermā,
- 0,886 (p 0,000) – starp *hBD-2* atradni dermā un *MMP-2* atradni epidermā,
- 0,885 (p 0,000) – starp šūnām, kas saturēja *hBD-2* un *MMP-2* dermā,
- 0,878 (p 0,000) – starp *MMP-2*-saturošām šūnām epidermā un dermā,
- 0,860 (p 0,000) – starp *IL-8*-saturošām šūnām epidermā un dermā,

- 0,824 (p 0,000) – starp *hBD-2* un *TNF-α* atradni epidermā,
- 0,821 (p 0,000) – starp *hBD-2* un *MMP-2* atradni epidermā,
- 0,805 (p 0,000) – starp apoptotisku šūnu atradni epidermā un dermā,
- 0,803 (p 0,000) – starp *hBD-2* un *TNF-α* atradni dermā,
- 0,801 (p 0,000) – starp *hBD-2* atradni epidermā un *TNF-α* atradni dermā.

Statistiski nozīmīgu ciešu pozitīvu korelāciju konstatējām:

- 0,795 (p 0,000) – starp *TNF-α* un *MMP-2* atradni dermā,
- 0,786 (p 0,000) – starp *hBD-2* atradni dermā un *TNF-α* atradni epidermā,
- 0,758 (p 0,000) – starp *TNF-α* un *MMP-2* atradni epidermā,
- 0,756 (p 0,000) – starp *hBD-2* atradni epidermā un *MMP-2* atradni dermā,
- 0,751 (p 0,000) – starp *TNF-α* atradni epidermā un *MMP-2* atradni dermā,
- 0,745 (p 0,000) – starp *CGRP*-saturošām struktūrām epidermā un dermā,
- 0,733 (p 0,000) – starp *IL-8* un *CGRP* atradni epidermā,
- 0,723 (p 0,000) – starp *TNF-α* atradni dermā un *MMP-2* atradni epidermā,
- 0,639 (p 0,000) – starp *TIMP-2* un *TIMP-4* atradni dermā,
- 0,633 (p 0,000) – starp *IL-6*-saturošām šūnām epidermā un dermā,
- 0,617 (p 0,000) – starp *IL-8* atradni dermā un *CGRP* atradni epidermā,
- 0,614 (p 0,000) – starp *CGRP*-saturošām struktūrām un apoptotiskām šūnām epidermā,
- 0,606 (p 0,000) – starp *IL-8* un *PGP 9,5* atradni dermā.

3. DISKUSIJA

Šajā pētījumā psoriāzes skarta neārstēta iekaisuma ādas biopsiju paraugos imūnhistoķīmiski tika izvērtēti *hBD-2*, *PGP 9.5*, *CGRP*, *P* vielas, *TNF- α* , *IL-1 α* , *IL-6*, *IL-8*, *MMP-2*, *TIMP-2* un *TIMP-4* imūnreaktīvo struktūru relatīvais daudzums, kā arī apoptozes klātbūtne, tos salīdzinot ar veselas ādas kontroles paraugiem.

Psoriāze ir bieži sastopama hroniska dermatoloģiska saslimšana ar ļoti variablu atradni dažādās populācijās un ģeogrāfiskos rajonos. Par biežākajiem cēloņiem šādai izteiktai atšķirībai tiek uzskatīti klimats, ģenētiskā uzņēmība un pakļautība apkārtējās vides antigēniem. Savukārt, nozīmīgas dzimuma atšķirības psoriāzes prevalencē nav konstatētas (*Enamandram and Kimball*, 2013).

Latvijas iedzīvotāji ģeogrāfiski atrodas klimata joslā, kas īpaši pastiprina psoriāzes iekaisuma norisi, jo garajā rudens un ziemas periodā samazinās un bieži svārstās gaisa temperatūra ārpus telpām ar vienlaikus ļoti sausu gaisu iekštelpās apkures dēļ, kā arī izteikti saīsinās dienas gaišais laiks un saņemtais ultravioletā starojuma daudzums. Tādēļ bieži ir vērojama izteikta simptomu sezonālitate. Tomēr mēs sezonalitāti nevērtējām, jo mūsu pētījumā izmantotie ādas paraugi pamatā arī tika iegūti rudens un ziemas periodā, kad ir īpaši raksturīga psoriāzes norises klīniska pasliktināšanās.

Mūsu pētījumā nekonstatējām saistību starp pētītajiem faktoriem un pacienta dzimumu. Vienlaikus netika konstatētas apskatīto faktoru statistiski nozīmīgas korelācijas arī ar pacientu vecumu vai slimības ilgumu, kā arī pacienta vecums un slimības ilgums nekorelēja savā starpā, kas nozīmē, ka šie parametri slimības patoģenēzē nav būtiski.

Ādas antimikrobie peptīdi darbojas kā pirmā aizsardzības līnija ārējās vides patogēniem. Gan vesela āda, gan iekaisuma skarta āda spēj izdalīt

olbaltumvielas ar antimikrobu darbību. Visvairāk līdz šim ir pētīti *hBD* un katelicidīni (Borkowski and Gallo, 2011; Gallo and Nakatsuji, 2011; Morizane and Gallo, 2012). Psoriāzes skartas ādas antimikrobās aizsardzības spējas vērtējām, nosakot *hBD-2* klātbūtni iegūtajos ādas paraugos. Atsevišķi tika izvērtēta epiderma un derma – visu psoriāzes pacientu ādas biopsiju paraugos tika konstatēti *hBD-2*-saturīgi epidermas keratinocīti un dermas fibroblasti, limfocīti un makrofāgi. Starp epidermas un dermas *hBD-2*-saturīgajām šūnām konstatējām statistiski nozīmīgu ļoti ciešu pozitīvu korelāciju. Vienlaikus svarīgi piebilst, ka starp psoriāzes un kontroles pacientu grupām tika konstatēta statistiski nozīmīga atšķirība *hBD-2* faktora klātbūtnei gan epidermā, gan dermā, liecinot par to, ka psoriāzes pacientiem tieši šīs ādas antimikroba proteīns būtiski palielinās nemodificēta (vulgāra) psoriāzes iekaisuma laikā.

Līdz šim ir iegūti dažādi un neviennozīmīgi dati par *hBD-2* lomu psoriāzes patogēnēzē. *hBD-2* ir pētīts gan proteīnu, gan gēnu līmenī, gan noteikts asins serumā (Metz-Boutigue et al., 2010). Eiropas iedzīvotāju vidū psoriāzes sastopamība ir augsta, tādēļ ir pētīta *hBD* ģenētiskā loma. Ir konstatēts gēnu, kas kodē *hBD*, palielināts kopiju skaits Eiropas populācijā (Hollox et al., 2008; Stuart et al., 2012).

Līdzīgi mūsu iegūtajiem datiem konstatēta izteikta *hBD-2* atradne psoriāzes pacienta ādā, salīdzinot ar citām iekaisīgām ādas slimībām, kā atopiskais dermatīts, alerģisks kontaktdermatīts un kairinājuma kontaktdermatīts (Kamsteeg et al., 2010). Arī asins serumā, vienlaikus pētot psoriāzes un atopiskā dermatīta pacientus, ir novērota augsta *hBD-2* koncentrācija un cieša korelācija ar *PASI* jeb slimības aktivitāti tieši psoriāzes pacientiem (Jansen et al., 2009). Ievērojami paaugstināta *hBD-2* klātbūtne novērota psoriāzes pacientu plazmā un vienlaikus (tā paša pētījuma ietvaros) arī keratinocītu kultūrās (Kanda et al., 2011). *hBD-2* kopā ar citiem

antimikrobiem peptīdiem ir konstatēts no psoriāzes iekaisuma perēkļa iegūtās zvīnās, kas, savukārt, aktivē dermālās dendrītiskās šūnas (Lande et al., 2015).

hBD-2 nozīme psoriātiska iekaisuma patogēnēzē un psoriāzes terapijā parādīta, to imūnhistoķīmiski izvērtējot 12 psoriāzes pacientu ādas biopsijās pirms un sešas nedēļas pēc sistēmiskas terapijas ar *TNF-α* inhibitoru *Etanercept*. Tika novērota gan ievērojama *PASI* samazināšanās, gan *hBD-2* ekspresijas samazināšanās pētāmajos ādas paraugos (Gambichler et al., 2011).

Bieži psoriāzes iekaisuma norisē tieši saistībā ar antimikrobo aizsardzību tiek uzsvērti citu faktoru, piemēram, omega 3 un vitamīna A ietekme. Tomēr šie pētījumi ir sporādiski un, galvenokārt, ir aprakstīti vitamīna D loma. Imūnhistoķīmiski konstatēts, ka *hBD-2* ekspresija psoriāzes pacientu ādā ir augstāka pacientiem ar normālu vitamīna D līmeni serumā, salīdzinot ar pacientiem, kuriem bija vitamīna D deficīts. Šādas ādas vietējās imūnās atbildes izmaiņas varētu tikt izmantotas psoriāzes terapijā (Kim et al., 2010). Mūsu pētījumā iekļauto psoriāzes pacientu āda bija nesauļota, kā arī pacienti nebija papildus saņēmuši vitamīnu D, lai izslēgtu *hBD-2* klātbūtni ietekmējošus faktorus. Tāpat mūsu pētījumā psoriāzes pacienti pirms ādas biopsijas parauga iegūšanas nesaņēma ne sistēmisku, ne lokālu terapiju. Tādējādi iegūtie dati parāda *hBD-2* klātbūtni nemodificētā iekaisumā jeb “izejas” līmeni.

Cilvēka āda ir ļoti labi inervēta un tajā arī neizmainītos apstākļos ir atrodamā virkne neuropeptīdu. Autonomās nervu sistēmas aktivācija un dažādu neuropeptīdu klātbūtnes palielināšanās ādā korelē ar psoriāzes iekaisumu. Tiek uzskatīts, ka ne tikai ādas imūnās sistēmas, bet arī perifērās nervu sistēmas regulācijas traucējumi ir nozīmīgi psoriāzes patogēnēzē. Tieši lokāli ādā sekretētie neuropeptīdi, iespējams, uztur ilgu psoriāzes iekaisumu. Līdz šim ir konstatēts palielināts nervu šķiedru blīvums psoriātiskā ādā un palielināta tādu neuropeptīdu kā kateholamīni un P viela sekrēcija (Chapman and Moynihan, 2009).

Psoriāzes skarta ādas iekaisuma inervācijas pārmaiņu izvērtēšanai pētījumā imūnhistoķīmiski noteicām *PGP 9.5*, *CGRP* un *P* vielu. Kopumā *PGP 9.5*-saturušu nervšķiedru epidermā bija maz līdz vidēji daudz un dermā vidēji daudz, kamēr *CGRP*-saturušu struktūru kopumā epidermā bija vidēji daudz un dermā vidēji daudz līdz daudz. Salīdzinoši *CGRP* atradne bija nedaudz izteiktāka. Statistiski nozīmīgu ciešu pozitīvu korelāciju konstatējām starp *CGRP*-saturušām struktūrām epidermā un dermā. Īpaši pārsteidzoši bija *P* vielas rezultāti – visu pacientu dermā un tikai daļai pacientu epidermā (24 no 40) tika konstatēts pārsvarā maz *P* vielu-saturušu struktūru. Tas varētu liecināt par, iespējams, tahikinīnu sekundāru lomu psoriāzes iekaisumā. Vienlaikus svarīgi atzīmēt arī, ka statistiski nozīmīga atšķirība starp psoriāzes pacientu un kontroles pacientu grupām pastāv *PGP 9.5* un *P* vielai epidermā, dermā un *CGRP* faktoram epidermā.

PGP 9.5 loma tieši psoriāzes norisē pētīta maz un arī pieejamo datu līdz ar to nav daudz. Divos pētījumos *PGP 9.5*-imūnreaktīvas nervšķiedras palielinātā daudzumā ir konstatētas psoriāzes iekaisuma skartā ādā (*Al'Abadie et al.*, 1995; *Hagforsen et al.*, 2000). Ir pieejami pilnībā pretēji divu citu pētījumu dati, kuros parādīta izteikta *PGP 9.5*-imūnreaktīvu nervšķiedru samazināšanās psoriāzes iekaisumā, salīdzinot ar veselu ādu vai psoriāzes pacienta ādu bez iekaisuma (*Johansson et al.*, 1991; *El-Nour et al.*, 2009). Samazināta *PGP 9.5* ekspresija konstatēta arī eksperimenta atopiskā dermatīta modelī pelei, kas pakļauta ilgstošam nelielam stresam. Tādējādi pastāvīgs stress iekaisīgā ādā samazina inervāciju (*Lönndahl et al.*, 2010).

Nevar izslēgt iespējamu variablu *PGP 9.5* lomu ādas iekaisuma uzturēšanā un neiroģēna iekaisuma veidošanā. Ir pierādīta *PGP 9.5* nozīme nervu šķiedru kvalitātes izvērtēšanā – tā imūnhistoķīmiska noteikšana ar ādas biopsijas palīdzību ir rekomendēta kā diagnostika procedūra perifēru neiropatiju diagnostikā. *PGP 9.5*-saturušu nervšķiedru blīvums dermā tieši parāda siltuma, karstuma un sāpju sajūtas uztveri (*Lauria et al.*, 2005).

PGP 9.5 ir svarīgs neironu citoplazmas proteīns, kas ir atrasts gan centrālajā, gan perifērajā nervu sistēmā, gan arī plaši difūzās neiroendokrīnās sistēmas šūnās (Thomson *et al.*, 1983). Vienlaikus *PGP 9.5* izteikti skaidri iezīmē dažāda izmēra perifērās nervu šķiedras dažādos orgānos (Wilson *et al.*, 1988). Ņemot vērā visu augstāk minēto, pieļaujams, ka mūsu pacientu ādā *PGP 9.5* struktūru nedominējošais pārsvars atspoguļo visu kopējo nervu šķiedru kvalitātes samazināšanos psoriāzes gadījumā.

Statistiski nozīmīgu vidēji ciešu pozitīvu korelāciju konstatējam gan starp *PGP 9.5* atradni un apoptotiskām šūnām epidermā un dermā, gan arī starp *PGP 9.5* atradni dermā un apoptotiskām šūnām epidermā. Līdzīgi kā mūsu pētījumā *PGP 9.5*-imūnreaktīvo nervšķiedru un identisks apoptotisku keratinocītu izvietojums epidermā ir novērots *Vitiligo* pacientu ādas paraugos (Aroni *et al.*, 2008). Citā pētījumā eksperimenta peles modelī ar stresa inducētu neirogēno iekaisumu tika novērota dendrītisko šūnu skaita palielināšanās, straujāka nobriešana un migrācija un sekojoša pastiprināta keratinocītu apoptoze (Joachim *et al.*, 2008). Tādējādi, domājams, neirālās un apoptotiskās izmaiņas ir cieši saistītas, jo iekaisuma šūnu izdalītie neirohormoni un mediatori iekaisuma gaitā (īpaši neirogēna iekaisuma) var inducēt programmētu šūnu nāvi.

CGRP un *P* vielas ietekme uz psoriātisku iekaisumu pētīta eksperimenta peles modelī. Tika novērots, ka, denervējot ādu vai inhibējot minētos faktorus, ievērojami samazinās limfocītu skaits un akantoze. Limfocītu skaita izmaiņas ietekmēja gan *CGRP*, gan *P* vielas aktivitāte, savukārt, akantozī veicināja tieši *CGRP* (Ostrowski *et al.*, 2011). Arī citu autoru pētījumu dati liecina tieši par *CGRP* ietekmi uz pastiprinātu keratinocītu proliferāciju un sekojošu epidermas sabiezēšanu gan psoriāzes skartā ādā, gan saistībā ar keloīdrētu veidošanos, gan inervētā eksperimenta ādas modelī (Yu *et al.*, 2009; Roggenkamp *et al.*, 2013; Suarez *et al.*, 2014). *CGRP* veicina ne tikai keratinocītu proliferāciju, bet arī epidermas cilmes šūnu dalīšanos. Šāds minētā

faktora darbības efekts novērots *in vitro* (Dong et al., 2010). Jāatzīmē, ka arī mēs vienlaikus ar izteiktu *CGRP* klātbūtni novērojām keratinocītu pastiprinātu proliferāciju un epidermas sabiezēšanu, salīdzinot ar kontroles grupas audu paraugiem.

Keratinocītu audu kultūrās ir parādīta iespējama autokrīna vai parakrīna keratinocītu spēja ekspresēt neuropeptīdus *CGRP* un P vielu – neuropeptīdu stimulācija ievērojami palielināja neuropeptīdu receptoru ekspresiju keratinocītos un rezultātā ļoti liels daudzums *CGRP* un P vielas tika izdalīts no keratinocītiem. Savukārt, šo peptīdu koncentrācijas pieauguma rezultātā tika veicināta šūnu proliferācija un iekaisuma citokīnu ekspresija un sekrēcija (Shi et al., 2013). Jādomā, ka šāda autokrīna vai parakrīna šūnu sadarbība iespējama arī citu neuropeptīdu un pat citu iekaisuma mediatoru gadījumā.

Interesanti, ka visi trīs mūsu pētītie faktori kompleksi tika izvērtēti hipertrofiskos apdeguma rētaudos saistībā ar izteiktām sāpēm un niezes sajūtu citu autoru darbos. Tika konstatēta visu trīs faktoru palielināta atradne un cieša korelācija gan ar sāpju, gan ar niezes sajūtu. *PGP 9.5* korelēja ar niezes sajūtu, P viela korelēja ar sāpju sajūtu un *CGRP* korelēja gan ar niezes, gan ar sāpju sajūtu (Kwak et al., 2014). Šie fakti varētu izskaidrot arī atsevišķu mūsu psoriāzes pacientu subjektīvās sūdzības par ādas iekaisīgo laukumu niezi, kamēr sāpes tiem tomēr nebija raksturīgas (P viela mūsu pētāmajos audu paraugos bija atrodama maz). Citā pētījumā P viela psoriāzes pacientu ādas biopsiju paraugos tika atrasta daudz un izteikti korelēja ar niezes intensitāti (Amatya et al., 2011). Šajā pētījumā iekļauto pacientu skaits bija nedaudz mazāks (28), salīdzinot ar mūsu pētījuma 40 pacientiem. Šīs izteiktās P vielas atradnes atšķirības varētu būt skaidrojamas tieši ar to, ka minētajā pētījumā gandrīz visi iekļautie pacienti sūdzējās par izteiktu pavadošu niezes sajūtu, kamēr no mūsu pētījuma pacientiem par niezes sajūtu sūdzējās tikai daži pacienti un arī ne pastāvīgi.

Kopumā tradicionāli tiek uzskatīts, ka P vielai ir nozīmīga loma psoriāzes un arī citu hronisku iekaisīgu ādas slimību patogēnēzē (Asadi et al., 2012; Lotti et al., 2014). Taču mūsu iegūtie dati par neizteiktu P vielu saturošo struktūru atradni krasi atšķirās no līdz šim literatūrā pieejamajiem uzskatiem. Viens pētījums iepriekš arī ir parādījis samazinātu P vielas ekspresiju psoriāzes skartā ādā (Pincelli et al., 1992). Domājams, ka tieši tahikinīnu loma psoriāzes patogēnēzē ir ļoti variabla un varbūt pārvērtēta. Kaut gan vienlaikus, iespējams, tieši dažādās P vielas noteikšanas laboratoriskās metodes var ievērojami ietekmēt iegūtos rezultātus.

Psoriāzes iekaisuma izvērtēšanai ādā imūnhistokīmiski noteicām *TNF- α* , *IL-1 α* , *IL-6* un *IL-8*. *TNF- α* -saturošas šūnas konstatējām gan epidermā, gan dermā, tomēr dermā šī atradne bija ievērojami izteiktāka. Arī *IL-6* un *IL-8* atradne bija bagātīga – abus minētos faktorus vidēji daudz līdz daudz saturēja gan epidermas, gan dermas šūnas. Vidēji ciešu pozitīvu korelāciju konstatējām starp *IL-6* un *IL-8* atradni dermā. Daļai no mūsu pētījuma pacientiem atsevišķi epidermas keratinocīti un maz dermas saistaudu šūnas saturēja *IL-1 α* . Citā pētījumā no psoriāzes skartas ādas tika iegūtas mezenhimālās cilmes šūnas, kurās tika konstatēta palielināta *IL-6* un *IL-8* kodējošo gēnu ekspresija salīdzinājumā ar veselu ādu, kamēr *IL-1* kodējošā gēna ekspresija nebija lielāka nekā veselā ādā (Campanati et al., 2014). Tādējādi varam domāt, ka galvenie citokīni psoriāzes skartā ādā ir citu citokīnu izdales stimulētāji *IL-6* un *IL-8*.

Psoriāze pieder saslimšanām, kurās dominē tieši *Th1* citokīnu profils. *TNF- α* psoriāzes iekaisumā tiek saistīts ar hiperplāziju un dermas kārpīņu proliferāciju (klīniski psoriātiskā iekaisuma perēkļa attīstība), kapilāru dilatāciju un limfocītus saturošiem iekaisuma infiltrātiem (klīniski eritēmas parādīšanās) (Tokura et al., 2010; Brotas et al., 2012; Singh et al., 2013). Minētās morfoloģiskās izmaiņas konstatējām arī mūsu pētījuma ietvaros iegūtajos ādas audu paraugos.

Ir pierādīta tieši *TNF- α* kā vadošā citokīna loma psoriāzes iekaisuma attīstībā eksperimenta peles modelī. Ar sarkano kaulu smadzeņu transplantācijas palīdzību tika iegūti dati par to, ka *TNF- α* , kas veicina ādas iekaisuma attīstību, producēšanu veic ādā pastāvīgi esošās šūnas, bet ne tās, kas attīstās no sarkanām kaulu smadzenēm un migrē (*Nakajima et al.*, 2010). Vienlaikus citā pētījumā eksperimenta peles psoriāzes modelī *TNF- α* izdalīja gan keratinocīti, gan dendrītiskās šūnas, makrofāgi un limfocīti (*Sato et al.*, 2014). Izteikta *TNF- α* ekspresijas un sekojoši arī psoriāzes radītā iekaisuma samazināšanās ir novērota pēc pielietotas terapijas ar *TNF- α* inhibitoru (*Menter et al.*, 2007). Keratinocīti ekspresē *TNF- α* , tomēr uzskatām, ka *TNF- α* pamatā skar tieši psoriāzes bojātu dermu, liecinot par galvenajām iekaisuma norisēm tieši saistaudos.

Ir aprakstīta *TNF- α* spēja inducēt keratinocītu apoptozi psoriātiskā iekaisumā (*Zimmermann et al.*, 2011). Mūsu pētījumā novērojām ievērojami palielinātu *TNF- α* klātbūtni epidermā un dermā, kā arī apoptotiskus keratinocītus un dermas šūnu apoptozi. Neskatoties uz statistiski ticamas abu augstāk minēto faktoru korelācijas trūkumu, tomēr uzskatām, ka psoriāzes pacientiem ir vērojama šī literatūrā aprakstītā keratinocītu un dermas šūnu *TNF- α* ekspresijas un programmētas šūnu nāves savstarpējā korelācija, un primārā indukcija visdrīzāk “nāk” no *TNF- α* .

IL-1 α atradne mūsu pētījuma ietvaros bija neizteikta, kas ir daļēji pretēja literatūrā pieejamiem datiem. Tā, ādas biopsijās un vienlaikus arī asins plazmā psoriāzes pacientiem, kas nebija saņēmuši terapiju, konstatēts samazināts *IL-1 α* daudzums (*Tamilselvi et al.*, 2013). *Johnston* un līdzautoru divos atsevišķos pētījumos konstatēta *IL-1* ekspresijas palielināšanās un tieša saistība ar antimikrobo peptīdu izteiktāku producēšanu, t. sk., *hBD-2* (*Johnston et al.*, 2011). Tomēr jāņem vērā, ka atšķiras diagnostikas metodes un šie rezultāti ir iegūti *in vitro* apstākļos, kā arī vienā no pētījumiem izmantots eksperimenta peles psoriāzes modelis, kas nozīmē to, ka ne vienmēr dati, ko iegūst no vienas

sugas, ir korekti interpretējami citai, piemēram, cilvēkam. Tādēļ būtu jāvērtē gan tas, ka *IL-1* loma psoriāzes iekaisumā variē, gan arī tas, ka vienlaikus molekulārā un gēnu līmenī iespējamās ievērojamas minētā faktora ekspresijas atšķirības.

IL-1 ekspresiju kodējošo gēnu izmaiņas un līdz ar to arī lielāks slimības attīstības risks konstatēts psoriātiska artrīta pacientiem (*Rahman et al.*, 2006; *Bowes et al.*, 2012).

Kopumā *IL-1α* darbības efekts varētu būt skaidrojams ar to, ka lokāli ādā svešu antigēnu ietekmē dendrītiskās šūnas un T limfocīti veido šūnu sakopojumus, kas dermā perivaskulāri veicina jaunu T limfocītu proliferāciju un aktivāciju. Šāda imūno šūnu perēkļu veidošanās samazinās, ja samazinās makrofāgu daudzums. Terapija ar *IL-1α* kontakta hipersensitivitātes eksperimenta peles modelī dermas makrofāgos veicina hemokīnu produkciju. Tādējādi *IL-1α*, iespējams, vairāk saistīts tieši ar iegūto ādas imunitāti (*Natsuaki et al.*, 2014). Vienlaikus *IL-1α* aktīvi piedalās arī imūnās funkcijas nodrošināšanā gļotādās (*Wu et al.*, 2013; *Bamias et al.*, 2014).

Interesanti, ka mūsu pētījumā iekaisuma citokīnu atradne ar pacienta vecumu nekorelēja, tomēr literatūrā ir pieejami dati par nelielu *IL-1α* un tā receptora antagonista samazināšanos lokāli veselā ādā saistībā ar novecošanas procesiem (*Sato et al.*, 2014).

Ievērojama *IL-6* atradne konstatēta tuklajās šūnās eksperimentāli inducētā psoriāzes bojājumā. Vienlaikus novērota arī *IL-6* receptora ekspresija dermas šūnās (*Suttle et al.*, 2012). Seruma *IL-6* koncentrācija ir aprakstīta kā labs prognostisks faktors veiksmīgas lokālās terapijas rezultātiem, jo pasargā no imunitātes nomākuma (*Lo et al.*, 2010). Kopumā *IL-6* koncentrācija asins serumā aprakstīta kā sistēmiska iekaisuma efektīvs prognostisks faktors, īpaši pacientiem ar smagu slimības gaitu (*Dowlatshahi et al.*, 2013). *IL-6* koncentrācijas samazināšanās novērota arī kā atbildes reakcija

psoriāzes pacientiem ar sekmīgiem sistēmiskas terapijas rezultātiem (*Cordiali-Fei et al.*, 2014).

Tomēr jāmin arī, ka ir variabli dati, kas iegūti no gēnu izpētes. *IL-6* kodējošo gēnu polimorfisms tiek asociēts tieši ar lielāku psoriāzes attīstības risku, taču ne terapijas efektivitāti (*Bialecka et al.*, 2015). Vienlaikus citā pētījumā *IL-6* ģenētiskās variācijas uzskatītas par psoriāzes attīstības risku samazinošām (*Boca et al.*, 2013).

Vienlaicīga iekaisuma citokīnu *TNF-α*, *IL-1α* un *IL-6* noteikšana varētu kalpot kā psoriāzes diagnozes un terapijas izvērtēšanas rādītājs (*Portugal-Cohen et al.*, 2012).

Gan *IL-6*, gan *IL-8* palielinātā atradne mūsu pētījumā iegūtajiem audu paraugiem atbilst literatūrā pieejamiem datiem. *IL-6* un *IL-8* kodējošo gēnu ekspresijas vienlaicīga palielināšanās konstatēta pacientiem ar smagiem apdegumiem (*Noronha et al.*, 2014). Tādējādi varam spriest, ka šo abu iekaisuma citokīnu darbība kopumā notiek saskaņoti. To pamato mūsu pētījumā novērotā gan *IL-6*, gan *IL-8* vienlaicīga paaugstināšanās gan epidermas keratinocītos, gan dermas iekaisuma šūnās psoriāzes iekaisumā un vidēji cieša pozitīva korelācija starp abiem minētajiem faktoriem.

Interesanti, ka *IL-6* un *IL-8* secīga paaugstināšanās konstatēta arī keratinocītu un melanocītu kultūrās ultravioletā starojuma ietekmē. Iespējams, tieši parakrīnas šūnu sadarbības rezultātā tiek nodrošināta abu minēto interleikīnu augsta sekrēcija. Kopā ar šiem iekaisuma citokīniem tika novērota arī *MMP-9* faktora palielināšanās. Tādējādi, domājams, audu deģenerācijas marķieri rada nosacījumus iekaisuma attīstībai un kompleksi ar *IL-6* un *IL-8* ietekmē šūnu diferenciāciju un pat fenotipu (*Decean et al.*, 2013).

Psoriāzes skartās ādas audu deģenerācijas un remodelācijas izvērtēšanas nolūkos imūnhistoķīmiski noteicām *MMP-2*, *TIMP-2* un *TIMP-4*. Kopumā daudz *MMP-2*-saturošas šūnas konstatējām visos audu paraugos dermā, kamēr arī gandrīz visu psoriāzes pacientu epidermas keratinocīti

saturēja *MMP-2*. Vienlaikus maz epidermas keratinocīti un vidēji daudz dermas saistaudu un iekaisuma šūnas vairumam psoriāzes pacientu saturēja *TIMP-2*, bet vidēji daudz epidermas keratinocīti un vidēji daudz dermas saistaudu un iekaisuma šūnas vairumam psoriāzes pacientu saturēja *TIMP-4*. Bieži novērojām perēkļveidīgu *TIMP-2* un *TIMP-4* ekspresiju. Jāuzsver arī, ka pastāv statistiski nozīmīga atšķirība starp psoriāzes pacientu un kontroles pacientu grupām *TIMP-2* un *TIMP-4* faktoriem epidermā. Cieši savā starpā korelēja *TIMP-2* un *TIMP-4* atradne dermā psoriāzes pacientiem. Tātad tas norāda uz *MMP-2* kā galveno audu degradācijas enzīmu psoriāzes skartā ādā, ko cenšas nomākt saskaņota vairāku audu kolagenāžu nomācējfaktoru – *TIMP-2* un *TIMP-4*, izdale. Tāpēc pieļaujam, ka *TIMP-4* vispār varētu būt selektīvs psoriāzes skartas ādas *MMPs* nomācējfaktors.

MMPs serumā un sinoviālajā šķidrumā ir kļuvušas par vērtīgiem diagnostiskajiem biomarķieriem psoriātiska artrīta norises un tā terapijas ar *TNF-α* blokatoriem, kurus lieto arī psoriāzes terapijā, izvērtēšanā (Giannelli et al., 2004; Chandran et al., 2013). Pašlaik pieejami dati arī, ka *MMPs* ir svarīgi biomarķieri psoriāzes aktivitātes un terapijas rezultātu izvērtēšanā. Jāmin gan, ka biežāk tomēr pētīta tiek asins plazma un salīdzinoši ierobežoti pieejama informācija par *MMPs* izmaiņām tieši ādas audu paraugos. Minēta *MMP-3* un vienlaikus augsti jutīga C reaktīvā olbaltuma noteikšana asins plazmā, kas varētu palīdzēt diferencēt pacientus ar psoriāzi no pacientiem ar psoriāzi un psoriātisku artrītu (Chandran, 2012). Tomēr nav norādīts, ka asins plazma uzrāda kopējo organisma, nevis selektīvo katram orgānam raksturīgo faktora lielumu.

Psoriāzes pacientiem, salīdzinājumā ar veseliem kontroles pacientiem, *MMP-9* paaugstināšanās novērota perifēro asiņu mononukleārajās šūnās, asins plazmā un ādas paraugos, bet vienlaikus tās samazināšanos visos minētajos paraugos novēroja pēc terapijas ar *TNF-α* blokatoriem (Buommino et al., 2012). *MMP-9* izteiktas izmaiņas novērotas tieši pacientiem ar lielperēkļu psoriāzi

(Lee and Lew, 2009). Arī *MMP-1* un *TIMP-1* pētīts psoriāzes pacientiem asins plazmā un, iespējams, tie varētu kalpot kā biomarkēri psoriāzes gaitas izvērtēšanā (Flisiak et al., 2008). *MMP-9* un *MMP-12* kopā ar *TIMP-1* un *TIMP-3* izteikta ekspresija konstatēta psoriāzes pacientu ādas paraugos, pārsvarā perivaskulāri un makrofāgos (Suomela et al., 2001).

Tieši *MMP-2* ir pētīts gēnu līmenī un atsevišķām pacientu apakšgrupām ir konstatēta saistība ar psoriāzes, t. s., ādas gēna lokusu uzņēmības rajonu (Vasku et al., 2009). Arī mūsu pētījumā bija vērojama *MMP-2* ekspresijas palielināšanās, taču tika pētīti tieši ādas paraugi, kas iegūti no izteikti iekaisuša ādas rajona. Mūsu dati parāda, ka *MMP-2* ekspresijas palielināšanās raksturīga tieši psoriāzes skartā ādā, taču, iespējams, šiem pacientiem raksturīgas arī ģenētiskas izmaiņas.

Mēs konstatējām *TIMP-2* samazinātu ekspresiju psoriātiskā epidermā, kamēr, domājams, kompensatori dermas saistaudu šūnas un iekaisuma šūnas vidēji daudz saturēja *TIMP-2*. Mūsu pētījuma atradne daļēji atbilst citu autoru iegūtajiem datiem par palielinātu *TIMP-2* klātbūtni psoriāzes skartā ādā, kaut gan atkal citu autoru pētījumā īpaša uzmanība tika pievērsta tieši izmaiņām epidermā. Gan šajā pētījumā, gan arī mūsu pētījumā psoriāzes iekaisuma skartā epidermā tika novērota tieši bazālo keratinocītu dominēšana *TIMP-2* ekspresēšanā (Fleischmajer et al., 2000). Ir apstiprināta arī *TIMP-2* kodējošo gēnu palielināta ekspresija psoriāzes pacientiem (Zhang et al., 2013).

Šobrīd pieejamo datu par *TIMP-4* kopumā ir maz. *TIMP-2* un *TIMP-4* ir kompleksi pētīti saistībā ar brūču dzīšanu. Novērota *TIMP-2* ievērojama atšķirība netraucētā dzīšanas procesā un hroniskās čūlās. Hroniskās nedzīstošās čūlās *TIMP-2* klātbūtne ievērojami samazinājās. Vienlaikus *TIMP-4* ekspresija hroniskās čūlās tika konstatēta perivaskulāri (Vaalamo et al., 1999). Tādējādi, domājams, *TIMP* ekspresijas un savstarpējā līdzsvara izmaiņas tieši ietekmē gan brūču dzīšanu, gan audu reģenerāciju kopumā. *TIMP-4* koncentrācija asins serumā ir ievērojami palielināta sistēmiskās sklerozes pacientiem

(Elias *et al.*, 2008). Psoriāzes skartā ādā *TIMP-4* pētīts nav. Mēs konstatējām *TIMP-4*-saturu šūnu klātbūtni gan epidermā, gan dermā un vienlaikus arī tā pozitīvu korelāciju ar *TIMP-2*. Tādējādi, domājams, *TIMP* un, īpaši, *TIMP-4* ir kompensatora inhibējoša nozīme audu deģenerācijā un sekojošā remodelācijā.

Apoptozes noteikšanai mūsu pētījuma ietvaros pielietojām *TUNEL* kitu. Konstatējām statistiski nozīmīgu atšķirību starp psoriāzes pacientu un kontroles pacientu grupām apoptotisko šūnu daudzumam epidermā un dermā. Gandrīz visu psoriāzes pacientu ādas paraugos konstatējām apoptotisko šūnu klātbūtni. Kopumā gan epidermā, gan dermā apoptotisko šūnu bija vidēji daudz, un to starpā konstatējām statistiski nozīmīgu ļoti ciešu pozitīvu korelāciju, kas liecina par programmētu šūnu nāvi kā kompensatoro mehānismu bojātu šūnu aizvākšanai no ādas psoriātiska rajona bez rētaudu veidošanās.

Apoptoze kā programmēta šūnu nāve ir neatņemama šūnas dzīves cikla sastāvdaļa. Psoriāzes skartā ādā ļoti plašas izmaiņas skar, pirmkārt, epidermu un to veidojošo keratinocītu dzīves ciklu. Bieži ir novērota parakeratoze. Ādai līdzīgā eksperimenta psoriāzes modelī, pielietojot *TUNEL* reaģentus, ir novērota variabla apoptozes atradne tieši parakeratotiskajos epidermas rajonos (Yamamoto-Tanaka *et al.*, 2014). Arī psoriāzes pacientu ādas biopsijās ar šo pašu metodi ir konstatēta palielināta apoptotisko šūnu klātbūtne epidermā, salīdzinot ar veselu ādu (Kawashima *et al.*, 2004; Gündüz *et al.*, 2006; Doger *et al.*, 2007).

Apoptoze vairākos pētījumos psoriāzes pacientiem apskatīta saistībā ar pielietoto ārstēšanu. Pētīta psoriāzes skarta āda, kas ārstēta ar vitamīna D3 analogu kalcipotriola ziedi – visplašāk psoriāzes ārstēšanā lietoto lokālo medikamentu, kas iekļauts arī valsts kompensācijas programmā Latvijā psoriāzes pacientiem. Šis medikaments, domājams, samazina keratinocītu proliferāciju, vienlaikus veicinot to diferenciāciju. Ievērojama apoptotisko keratinocītu palielināšanās tika konstatēta tieši ārstētajos ādas rajonos

(*El-Domyati et al.*, 2007; *Tiberio et al.*, 2009; *Raychaudhuri et al.*, 2014). Arī pēc kombinētas terapijas ar darvas preparātiem un ultravioleto starojumu ir novērota izteiktāka programmēta šūnu nāve ādā (*Ranna et al.*, 2014).

Ir dati par palielinātu apoptozes atradni sarkano kaulu smadzeņu mezenhimālajās cilmes šūnās un vienlaikus arī izmainītu to aktivitāti psoriāzes pacientiem – šīs izmaiņas, iespējams, ir par pamatu izmainītai imūnai atbildei psoriāzes pacientiem kopumā (*Hou et al.*, 2014). Līdzīgi psoriāzes pacientiem asins plazmā ir konstatēta ievērojami palielināta ar apoptozes mehānismu saistītu endotēlija šūnu, trombocītu, monocītu un makrofāgu šūnu membrānu daļiņu klātbūtne, kas ievērojami palielina kardiometabolo risku (*Takeshita et al.*, 2014).

Tādējādi uzskatāmi tiek parādīts, ka apoptoze nav jāvērtē tikai izolēti kā šūnu nāve, bet gan vienlaikus tā tieši ietekmē psoriāzes iekaisuma norisi, gan arī ar psoriāzi bieži asociētas pavadošas saslimšanas. Pašlaik ir zināms, ka psoriāzes pacientiem ģenētiski ir izmainīts arī gēnu sastāvs, kas kodē imūno sistēmu, šūnas ciklu un apoptozi (*Tervaniemi et al.*, 2012; *Filkor et al.*, 2013).

Diskusijas nobeigumā jāmin, ka mūsu pētījumā pirmo reizi tieši ar imūnhistoķīmijas metodi ir kompleksi analizētas ādas morfoloģiskās pārmaiņas psoriāzes pacientiem ar audu parauga iegūšanas brīdī neārstētu iekaisumu. Galvenie procesi saistāmi ar psoriāzes skartā ādas iekaisumā konstatējamu izteiktu antimikrobo peptīdu *hBD-2* un audu deģenerācijas marķieri *MMP-2*-saturšu epidermas un dermas šūnu palielināšanos, neuropeptīdus saturošās inervācijas izmaiņām, kompensatoru apoptotisko šūnu atradni, selektīvām / individuālām iekaisuma citokīnu pārmaiņām. Ādas neiroģenē iekaisuma attīstībā galvenā nozīme ir tieši *CGRP* struktūru klātbūtnei. *TNF-α*, *IL-6* un *IL-8* ir svarīgi iekaisuma citokīni, kamēr *IL-1α* nav galvenais iekaisuma mediators psoriāzes patoģenēzē. Kā absolūti novatora jāmin *TIMP-4* (un ar to saistītā *TIMP-2*) atradne, kas norāda uz kompensatorām

audu remodelācijas iespējām, kamēr no *MMPs* plejādes arī *MMP-2* ir viens no galvenajiem psoriātiskas ādas deģenerācijas faktoriem.

4. SECINĀJUMI

1. Dažāda slimības ilguma un norises psoriāzes pacientu ādā būtiska ir ādas antimikrobo peptīdu, specifiskas neuropeptīdus saturošās inervācijas (sensorās), iekaisuma citokīnu, deģeneratīvo enzīmu un programmētas šūnu nāves aktivācija, kas norāda uz to iesaisti psoriāzes morfoloģiskajās izmaiņās. Vienlaikus minēto faktoru atradne statistiski nozīmīgi nekorelē ar pacientu vecumu, dzimumu, slimības ilgumu un sezonu, izslēdzot šos parametrus no iesaistes slimības patoģenēzē.
2. Vesela cilvēka ādu raksturo neliela antimikrobo proteīnu, iekaisuma mediatoru un proiekaisuma citokīnu klātbūtne, kamēr kopējo citokīnu stimulējošo faktoru (*IL-6* un *IL-8*) ekspresija saglabājas augsta. Vienlaicīgi veselā ādā dominējošā ir sensorā inervācija ar specifisku *CGRP* klātbūtni. Apoptoze ir raksturīgs kompensatorais mehānisms veselās ādas keratinocītu un dermas saistaudu šūnu dzīves cikla regulācijā.
3. Psoriāzes skartu dažāda vecuma pacientu ādā statistiski nozīmīgi palielinātais *hBD-2* norāda uz tā lomu terapijas nemodificētas psoriātiskas ādas lokālajā aizsardzībā.
4. Psoriāzes pacientiem *CGRP* saturošās inervācijas salīdzinošais pārsvars pār *PGP 9.5*-saturošajām nervšķiedrām liecina par kopējo ādas inervācijas kvalitātes pasliktināšanos jeb bojājumu, kas neattiecas uz jušanas nervšķiedrām. Selektīvā *CGRP* izteiktā klātbūtne norāda uz tā, nevis P vielas, kā galvenā neiroģenētiskā iekaisuma faktora lomu un plašākām ar citām ādas norisēm (keratinocītu proliferācija, epidermas sabiezēšana) saistītām funkcijām psoriāzes pacienta ādā.
5. Galvenie citokīni psoriāzes skartā ādā ir citu citokīnu izdales stimulatori *IL-6* un *IL-8*, kas liecina par neizmainītu šo faktoru lomu ādā. *TNF-α*, galvenokārt, skar psoriāzes bojātu dermu, liecinot par galvenajām

iekaisuma norisēm tieši saistaudos, nevis epidermā, kamēr galvenā proiekaisuma citokīna *IL-1 α* atradne tikai daļai pacientu liecina par, iespējams, ļoti individuālu ādas atbildi slimības gaitai.

6. Psoriāzes pacienta ādā izteikta ir deģenerācijas enzīma *MMP-2* ekspresija, kamēr kā *MMP* galvenie inhibitori būtiski palielinās savstarpēji korelējošie *TIMP-2* un *TIMP-4* (īpaši *TIMP-4*). Kopumā audu deģenerācijas faktoru un to nomācēju kopēja (*TIMP-2*) un selektīva (*TIMP-4*) palielināšanās liecina par intensīviem psoriāzes skarta ādas rajona remodelācijas procesiem.
7. Psoriāzes skartās ādas izteiktā apoptotisko šūnu atradne liecina par programmētu šūnu nāvi kā kompleksu mehānismu bojāto šūnu aizvākšanai no ādas bez rētaudu veidošanās.
8. Psoriāzes pacienta diagnostiski prognostiskajā algoritmā ietilpst tādu molekulāro marķieru kā *hBD-2*, *CGRP*, *IL-6*, *IL-8*, *MMP-2* un *TIMP-4* noteikšana.

5. IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. Al'Abadie M. S., Senior H. J., Bleehen S. S. Gawkrödger D. J. Neuropeptides and general neuronal marker in psoriasis – an immunohistochemical study // *Clin Exp Dermatol*, 1995; 20 (5): 384–389.
2. Amatyā B., El-Nour H., Holst M. et al. Expression of tachykinins and their receptors in plaque psoriasis with pruritus // *Br J Dermatol*, 2011; 164 (5): 1023–1029.
3. Aroni K., Grapsa A., Lazaris A. C. et al. Tissue estimation of protein gene product 9.5 (PGP 9.5) expression and apoptosis in vitiligo // *Int J Dermatol*, 2008; 47 (9): 911–917.
4. Asadi S., Alysandratos K. D., Angelidou A. et al. Substance P (SP) induces expression of functional corticotropin-releasing hormone receptor-1 (CRHR-1) in human mast cells // *J Invest Dermatol*, 2012; 132 (2): 324–329.
5. Ashcroft D. M., Wan Po A. L., Williams H. C., Griffiths C. E. Clinical measures of disease severity and outcome in psoriasis: a critical appraisal of their quality // *Br J Dermatol*, 1999; 141 (2): 185–191.
6. Bamias G., Arseneau K. O., Cominelli F. Cytokines and mucosal immunity // *Curr Opin Gastroenterol*, 2014; 30 (6): 547–552.
7. Białecka M., Ostasz R., Kurzawski M. et al. IL6 -174G>C polymorphism is associated with an increased risk of psoriasis but not response to treatment // *Exp Dermatol*, 2015; 24 (2): 146–147.
8. Boca A. N., Talamonti M., Galluzo M. et al. Genetic variations in IL6 and IL12B decreasing the risk for psoriasis // *Immunol Lett*, 2013; 156 (1–2): 127–131.
9. Borkowski A. W., Gallo R. L. The coordinated response of the physical and antimicrobial peptide barriers of the skin // *J Invest Dermatol*, 2011; 131 (2): 285–287.
10. Bowes J., Ho P., Flynn E. et al. Investigation of IL1, VEGF, PPARG and MEFV genes in psoriatic arthritis susceptibility // *Ann Rheum Dis*, 2012; 71 (2): 313–314.
11. Braff M. H., Bardan A., Nizet V., Gallo R. L. Cutaneous defense mechanisms by antimicrobial peptides // *J Invest Dermatol*, 2005; 125 (1): 9–13.
12. Brotas A. M., Lago E. H. J., Carneiro S. C. D. et al. Tumour necrosis factor-alpha and th cytokine network in psoriasis // *An Bras Dermatol*, 2012; 87 (5): 673–683.
13. Buommino E., De Filippis A., Gaudiello F. et al. Modification of osteopontin and MMP-9 levels in patients with psoriasis on anti-TNF- α therapy // *Arch Dermatol Res*, 2012; 304 (6): 481–485.
14. Campanati A., Orciani M., Consales V. et al. Characterization and profiling of immunomodulatory genes in resident mesenchymal stem cells reflect the Th1-Th17/Th2 imbalance of psoriasis // *Arch Dermatol Res*, 2014; 306 (10): 915–920.
15. Chandran V. Soluble biomarkers may differentiate psoriasis from psoriatic arthritis // *J Rheumatol Suppl*, 2012; 89: 65–66.
16. Chandran V., Shen H., Pollock R. A. et al. Soluble biomarkers associated with response to treatment with tumour necrosis factor inhibitors in psoriatic arthritis // *J Rheumatol*, 2013; 40 (6): 866–871.
17. Chapman B. P., Moynihan J. The brain-skin connection: role of psychosocial factors and neuropeptides in psoriasis // *Expert Rev Clin Immunol*, 2009; 5 (6): 623–627.

18. Cordiali-Fei P., Bianchi L., Bonifati C. et al. Immunologic biomarkers for clinical and therapeutic management of psoriasis // *Mediators Inflamm*, 2014; 2014: 236060.
19. Decean H., Perde-Schrepler M., Tatomir C. et al. Modulation of the pro-inflammatory cytokines and matrix metalloproteinases production in co-cultivated human keratinocytes and melanocytes // *Arch Dermatol Res*, 2013; 305 (8): 705–714.
20. Doger F. K., Dikicioglu E., Ergin F. et al. Nature of cell kinetics in psoriatic epidermis // *J Cutan Pathol*, 2007; 34 (3): 257–263.
21. Dong J., He Y., Zhang X. et al. Calcitonin gene-related peptide regulates the growth of epidermal stem cells in vitro // *Peptides*, 2010; 31 (10): 1860–1865.
22. Dowlatshahi E. A., van der Voort E. A., Arends L. R., Nijsten T. Markers of systemic inflammation in psoriasis: a systematic review and meta-analysis // *Br J Dermatol*, 2013; 169 (2): 266–282.
23. El-Domyati M., Barakat M., Abdel-Razek R., El-Din Anbar T. Apoptosis, P53 and Bcl-2 expression in response to topical calcipotriol therapy for psoriasis // *Int J Dermatol*, 2007; 46 (5): 468–474.
24. Elias G. J., Ioannis M., Theodora P. et al. Circulating tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-4 (TIMP-4) in systemic sclerosis patients with elevated pulmonary arterial pressure // *Mediators Inflamm*, 2008; 2008:164134.
25. El-Nour H., Santos A., Nordin M. et al. Neuronal changes in psoriasis exacerbation // *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2009; 23 (11): 1240–1245.
26. Enamandram M., Kimball A. B. Psoriasis epidemiology: the interplay of genes and the environment // *J Invest Dermatol*, 2013; 133 (2): 287–289.
27. Filkor K., Hegedűs Z., Szász A. et al. Genome wide transcriptome analysis of dendritic cells identifies genes with altered expression in psoriasis // *PLoS One*, 2013; 8 (9): e73435.
28. Fischer A. H., Jacobson K. A., Rose J., Zeller R. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections // *CSH Protocols*, 2008; doi:10.1101/pdb.prot4986.
29. Fleischmajer R., Kuroda K., Hazan R. et al. Basement membrane alterations in psoriasis are accompanied by epidermal overexpression of MMP-2 and its inhibitor TIMP-2 // *J Invest Dermatol*, 2000; 115 (5): 771–777.
30. Flisiak I., Zaniewski P., Chodyncka B. Plasma TGF-beta1, TIMP-1, MMP-1 and IL-18 as a combined biomarker of psoriasis activity // *Biomarkers*, 2008; 13 (5): 549–556.
31. Gallo R. L., Nakatsuji T. Microbial symbiosis with the innate immune defense system of the skin // *J Invest Dermatol*, 2011; 131 (10): 1974–1980.
32. Gambichler T., Kobus S., Kobus A. et al. Expression of antimicrobial peptides and proteins in etanercept-treated psoriasis patients // *Regul Pept*, 2011; 167 (2-3): 163–166.
33. Gavrieli Y., Sherman Y., Ben-Sasson S. A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation // *J Cell Biol*, 1992; 119 (3): 493–501.
34. Giannelli G., Falk-Marzillier J., Schiraldi O. et al. Induction of cell migration by matrix metalloproteinase-2 cleavage of laminin-5 // *Science*, 1997; 277 (5323): 225–228.

35. Gündüz K., Demireli P., Vatansever S., Inanir I. Examination of bcl-2 and p53 expressions and apoptotic index by TUNEL method in psoriasis // *J Cutan Pathol*, 2006; 33 (12): 788–792.
36. Hagforsen E., Nordlind K., Michaëlsson G. Skin nerve fibres and their contacts with mast cells in patients with palmoplantar pustulosis // *Arch Dermatol Res*, 2000; 292 (6): 269–274.
37. Hollox E. J., Huffmeier U., Zeeuwen P. L. et al. Psoriasis is associated with increased beta-defensin genomic copy number // *Nat Genet*, 2008; 40 (1): 23–25.
38. Hou R., Liu R., Niu X. et al. Biological characteristics and gene expression pattern of bone marrow mesenchymal stem cells in patients with psoriasis // *Exp Dermatol*, 2014; 23 (7): 521–523.
39. Hsu S. M., Raine L., Fanger H. The use of antiavidin antibody and avidin-biotin peroxidase complex in immunoperoxidase technics // *Am J Clin Pathol*, 1981; 75: 816–821.
40. Jansen P. A. M., Rodijk-Olthuis D., Hollox E. J. et al. Beta-defensin-2 protein is a serum biomarker for disease activity in psoriasis and reaches biologically relevant concentrations in lesional skin // *PloS One*, 2009; 4 (3): e4725.
41. Joachim R. A., Handjiski B., Blois S. M. et al. Stress-induced neurogenic inflammation in murine skin skews dendritic cells towards maturation and migration: key role of intercellular adhesion molecule-1/leukocyte function-associated antigen interactions // *Am J Pathol*, 2008; 173 (5): 1379–1388.
42. Johansson O., Han S. W., Enhamre A. Altered cutaneous innervation in psoriatic skin as revealed by PGP 9.5 immunohistochemistry // *Arch Dermatol Res*, 1991; 283 (8): 519–523.
43. Jongh G. J., Zeeuwen P. L. J. M., Kucharekova M. et al. High expression levels of keratinocyte antimicrobial proteins in psoriasis compared with atopic dermatitis // *J Invest Dermatol*, 2005; 125 (6): 1163–1173.
44. Johnston A., Gudjonsson J. E., Aphale A. et al. EGFR and IL-1 signaling synergistically promote keratinocytes antimicrobial defenses in a differentiation-dependent manner // *J Invest Dermatol*, 2011; 131 (2): 329–337.
45. Johnston A., Xing X., Guzman A. M. et al. IL-1F5, -F6, -F8, and -F9: a novel IL-1 family signaling system that is active in psoriasis and promotes keratinocyte antimicrobial peptide expression // *J Immunol*, 2011; 186 (4): 2613–2622.
46. Kamsteeg M., Jansen P. A., van Vlijmen-Willems I. M. et al. Molecular diagnostics of psoriasis, atopic dermatitis, allergic contact dermatitis and irritant contact dermatitis // *Br J Dermatol*, 2010; 162 (3): 568–578.
47. Kanda M., Kamata M., Tada Y. et al. Human β -defensin-2 enhances IFN- γ and IL-10 production and suppresses IL-17 production in T cells // *J Leukoc Biol*, 2011; 89 (6): 935–944.
48. Kawashima K., Doi H., Ito Y. et al. Evaluation of cell death and proliferation in psoriatic epidermis // *J Dermatol Sci*, 2004; 35 (3): 207–214.
49. Kim S. K., Park S., Lee E. S. Toll-like receptors and antimicrobial peptides expressions of psoriasis: correlation with serum vitamin D level // *J Korean Med Sci*, 2010; 25 (10): 1506–1512.
50. Kwak I. S., Choi Y. H., Jang Y. C., Lee Y. K. Immunohistochemical analysis of neuropeptides (protein gene product 9.5, substance P and calcitonin gene-related

- peptide) in hypertrophic burn scar with pain and itching // *Burns*, 2014; 40 (8): 1661–1667.
51. Lande R., Chamilos G., Ganguly D. et al. Cationic antimicrobial peptides in psoriatic skin cooperate to break innate tolerance to self-DNA // *Eur J Immunol*, 2015; 45 (1): 203–213.
 52. Lauria G., Cornblath D. R., Johansson O. et al. EFNS guidelines on the use of skin biopsy in the diagnosis of peripheral neuropathy // *Eur J Neurol*, 2005; 12 (10): 747–758.
 53. Lee S. E., Lew W. The increased expression of matrix metalloproteinase-9 messenger RNA in the non-lesional skin of patients with large plaque psoriasis vulgaris // *Ann Dermatol*, 2009; 21 (1): 27–34.
 54. Lillie R. D. *Histopathologic Technic and Practical Histochemistry*. – 3rd. – New York: McGraw–Hill Book Co., 1965.
 55. Lo Y. H., Torii K., Saito C. et al. Serum IL-22 correlates with psoriatic severity and serum IL-6 correlates with susceptibility to phototherapy // *J Dermatol Sci*, 2010; 58 (3): 225–227.
 56. Lönn Dahl L., Lonne-Rahm S. B., Nordlind K. et al. Decreased innervation of eczematous skin in NC/Nga atopic mice during chronic mild stress // *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2010; 32 (1): 147–152.
 57. Lotti T., D’Erme A. M., Hercogová J. The role of neuropeptides in the control of regional immunity // *Clin Dermatol*, 2014; 32 (5): 633–645.
 58. Mann H. B., Whitney D. R. On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other // *Ann Math Statist*, 1947; 18 (1): 50–60.
 59. Mayer P. *Mitt. zool. Stn. Neapel*, 1896; 12: 303.
 60. Menter A., Feldman S. R., Weinstein G. D. et al. A randomized comparison of continuous vs. intermittent infliximab maintenance regimens over 1 year in the treatment of moderate-to-severe plaque psoriasis // *J Am Acad Dermatol*, 2007; 56 (1): 31.e1–15.
 61. Metz-Boutigue M. H., Shooshtarizadeh P., Prevost G. et al. Antimicrobial peptides present in mammalian skin and gut are multifunctional defence molecules // *Curr Pharm Des*, 2010; 16 (9): 1024–1039.
 62. Morizane S., Gallo R. L. Antimicrobial peptides in the pathogenesis of psoriasis // *J Dermatol*, 2012; 39 (3): 225–230.
 63. Nakajima A., Matsuki T., Komine M. et al. TNF, but not IL-6 and IL-17, is crucial for the development of T cell-independent psoriasis-like dermatitis in Il1rn^{-/-} mice // *J Immunol*, 2010; 185 (3): 1887–1893.
 64. Natsuaki Y., Egawa G., Nakamizo S. et al. Perivascular leukocyte clusters are essential for efficient activation of effector T cells in the skin // *Nat Immunol*, 2014; 15 (11): 1064–1069.
 65. Negoescu A., Lorimier P., Labat-Moleur F. et al. In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations // *J Histochem Cytochem*, 1996; 44: 959–968.
 66. Noronha S. A., Noronha S. M., Lanziani L. E. et al. Innate and adaptive immunity gene expression of human keratinocytes cultured of severe burn injury // *Acta Cir Bras*, 2014; Suppl 3: 60–67.

67. Ostrowski S. M., Belkadi A., Loyd C. M. et al. Cutaneous denervation of psoriasiform mouse skin improves acanthosis and inflammation in a sensory neuropeptide-dependent manner // *J Invest Dermatol*, 2011; 131 (7): 1530–1538.
68. Pilmane M., Luts A., Sundler F. Changes in neuroendocrine elements in bronchial mucosa in chronic lung disease in adults // *Thorax*, 1995; 50: 551–554.
69. Pincelli C., Fantini F., Romualdi P. et al. Substance P is diminished and vasoactive intestinal peptide is augmented in psoriatic lesions and these peptides exert disparate effects on the proliferation of cultured human keratinocytes // *J Invest Dermatol*, 1992; 98 (4): 421–427.
70. Portugal-Cohen M., Horev L., Ruffer C. et al. Non-invasive skin biomarkers quantification of psoriasis and atopic dermatitis: cytokines, antioxidants and psoriatic skin auto-fluorescence // *Biomed Pharmacother*, 2012; 66 (4): 293–299.
71. Potten C. S. What is an apoptotic index measuring? A commentary // *Br J Cancer*, 1996; 74 (11): 1743–1748.
72. Rahman P., Sun S., Peddle L. et al. Association between the interleukin-1 family gene cluster and psoriatic arthritis // *Arthritis Rheum*, 2006; 54 (7): 2321–2325.
73. Ranna D., Andrys C., Krejsek J. et al. Elevated levels of circulating biomarkers of cell death (nucleosomes) in the patients with plaque psoriasis treated with the Goeckerman regimen // *Bratisl Lek Listy*, 2014; 115 (4): 229–232.
74. Raychaudhuri S., Mitra A., Datta-Mitra A. Immunomodulatory mechanisms of action of calcitriol in psoriasis // *Indian J Dermatol*, 2014; 59 (2): 116–122.
75. Roggenkamp D., Köpnick S., Stäb F. et al. Epidermal nerve fibers modulate keratinocyte growth via neuropeptide signaling in an innervated skin model // *J Invest Dermatol*, 2013; 133 (6): 1620–1628.
76. Roosterman D., Goerge T., Schneider S. W. et al. Neuronal control of skin function: the skin as a neuroimmunoendocrine organ // *Physiol Rev*, 2006; 86 (4): 1309–1379.
77. Sato K., Takaishi M., Tokuoka S., Sano S. Involvement of TNF- α converting enzyme in the development of psoriasis-like lesions in a mouse model // *PLoS One*, 2014; 9 (11): e112408.
78. Sato N., Kitahara T., Fujimura T. Age-related changes of stratum corneum functions of skin on the trunk and the limbs // *Skin Pharmacol Physiol*, 2014; 27 (4): 181.
79. Schaubert J., Gallo R. L. Expanding the roles of antimicrobial peptides in skin: alarming and arming keratinocytes // *J Invest Dermatol*, 2007; 127 (3): 510–512.
80. Shi X., Wang L., Clark J. D., Kingery W. S. Keratinocytes express cytokines and nerve growth factor in response to neuropeptide activation of the ERK1/2 and JNK MAPK transcription pathways // *Regul Pept*, 2013; 186: 92–103.
81. Singh T. P., Schon M. P., Wallbrecht K. et al. Involvement of IL-9 in Th17-associated inflammation and angiogenesis of psoriasis // *Plos One*, 2013; 8 (1): e51752.
82. Spearman C. “General Intelligence,” Objectively Determined and Measured // *Am J Psychol*, 1904; 15 (2): 201–292.
83. Stefanini M., De Martino C., Zamboni L. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy // *Nature*, 1967; 216 (5111): 173–174.
84. Stuart P. E., Hüffmeier U., Nair R. P. et al. Association of β -defensin copy number and psoriasis in three cohorts of European origin // *J Invest Dermatol*, 2012; 132 (10): 2407–2413.

85. Suarez E., Syed F., Alonso-Rasgado T., Bayat A. Identification of biomarkers involved in differential profiling of hypertrophic and keloid scars versus normal skin // *Arch Dermatol Res*, 2015; 307 (2): 115–133.
86. Suomela S., Kariniemi A. L., Snellman E., Saarialho-Kere U. Metalloelastase (MMP-12) and 92-kDa gelatinase (MMP-9) as well as their inhibitors, TIMP-1 and -3, are expressed in psoriatic lesions // *Exp Dermatol*, 2001; 10 (3): 175–183.
87. Suttle M. M., Nilsson G., Snellman E., Harvima I. T. Experimentally induced psoriatic lesion associates with interleukin (IL)-6 in mast cells and appearance of dermal cells expressing IL-33 and IL-6 receptor // *Clin Exp Dermatol*, 2012; 169 (3): 311–319.
88. Takeshita J., Mohler E. R., Krishnamoorthy P. et al. Endothelial cell-, platelet-, and monocyte/macrophage-derived microparticles are elevated in psoriasis beyond cardiometabolic risk factors // *J Am Heart Assoc*, 2014; 3 (1): e000507.
89. Tamilselvi E., Haripriya D., Hemamalini M. et al. Association of disease severity with IL-1 levels in methotrexate-treated psoriasis patients // *Scan J Immunol*, 2013; 78 (6): 545–553.
90. Tervaniemi M. H., Siitonen H. A., Söderhäll C. et al. Centrosomal localization of the psoriasis candidate gene product, CCHCR1, supports a role in cytoskeletal organization // *PLoS One*, 2012; 7 (11): e49920.
91. Thompson R. J., Doran J. F., Jackson P. et al. PGP 9.5 – a new marker for vertebrate neurons and neuroendocrine cells // *Brain Res*, 1983; 278 (1–2): 224–228.
92. Tiberio R., Bozzo C., Pertusi G. et al. Calcipotriol induces apoptosis in psoriatic keratinocytes // *Clin Exp Dermatol*, 2009; 34 (8): e972–974.
93. Tokura Y., Mori T., Hino R. Psoriasis and other Th17-mediated diseases // *J UOEH*, 2010; 32 (4): 317–328.
94. Vaalamo M., Leivo T., Saarialho-Kere U. Differential expression of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1, -2, -3, and -4) in normal and aberrant wound healing // *Hum Pathol*, 1999; 30 (7): 795–802.
95. Vasku V., Bienertova Vasku J., Slonkova V. et al. Matrix metalloproteinase-2 promoter variability in psoriasis // *Arch Dermatol Res*, 2009; 301 (6): 467–473.
96. Wilson P. O., Barber P. C., Hamid Q. A. et al. The immunolocalization of protein gene product 9.5 using rabbit polyclonal and mouse monoclonal antibodies // *Br J Exp Pathol*, 1988; 69 (1): 91–104.
97. Wu T., Du R., Hong Y. et al. IL-1 alpha regulates CXCL1, CXCL10 and ICAM1 in network form in oral keratinocytes // *Clin Lab*, 2013; 59 (9–10): 1105–1111.
98. Yamamoto-Tanaka M., Makino T., Motoyama A. et al. Multiple pathways are involved in DNA degradation during keratinocyte terminal differentiation // *Cell Death Dis*, 2014; 5:e1181.
99. Yu X. J., Li C. Y., Xu Y. H. et al. Calcitonin gene-related peptide increases proliferation of human HaCaT keratinocytes by activation of MAP kinases // *Cell Biol Int*, 2009; 33 (11): 1144–1148.
100. Zhang P., Zhao M., Liang G. et al. Whole-genome DNA methylation in skin lesions from patients with psoriasis vulgaris // *J Autoimmun*, 2013; 41: 17–24.
101. Zimmermann M., Koreck A., Meyer N. et al. TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) and TNF- α cooperate in the induction of keratinocyte apoptosis // *J Allergy Clin Immunol*, 2011; 127 (1): 200–207.

6. PUBLIKĀCIJAS UN PREZENTĀCIJAS PAR PĒTĪJUMA TĒMU

Zinātniskie raksti (7)

1. **Mozeika E.**, Pilmane M., Kisis J. Role of Human Skin Antimicrobial Peptides in Psoriasis // Acta Chirurgica Latviensis, 2010 (10/2): 69–75.
2. **Mozeika E.**, Pilmane M., Kisis J. Distribution of human β -defensin 2, TNF-alpha, IL-1 alpha, IL-6 and IL-8 in psoriatic skin // Papers on Anthropology XX, 2011: 289–302.
3. **Mozeika E.**, Jemec G.B., Nürnberg B.M. Hedgehog pathway does not play a role in hidradenitis suppurativa pathogenesis // Exp Dermatol., 2011 Oct; 20(10): 841–842.
4. **Mozeika E.**, Pilmane M., Nürnberg B.M., Jemec G.B. Tumour Necrosis Factor-alpha and Matrix Metalloproteinase-2 are Expressed Strongly in Hidradenitis Suppurativa // Acta Derm Venereol., 2013 May; 93(3): 301–304.
5. **Sidhom E.**, Pilmane M., Kisis J. Morphological Picture of Psoriatic Skin // RSU Research Articles in Medicine and Pharmacy, 2013: 36–42.
6. **Sidhom E.**, Pilmane M., Kisis J. The Distribution of Matrix Metalloproteinase-2, Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-4 in Psoriatic Skin // Br J Med Med Res., 2015; 8(10): 883–890.
7. **Sidhom E.**, Pilmane M., Kisis J. Local antimicrobial, protease and cytokine defense systems in psoriatic skin – pieņemts publicēšanai Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology.

Monogrāfiju daļas (1)

1. Kīsis J., Hartmane I., Žīgure S., Karls R., Karpoviča I., **Sidhoma E.**, Kažociņa Z. – Rīga Stradiņš University, Department of Infectology and Dermatology work group. Psoriasis clinical guidelines. Published in homepage of the National Health Service, registered 23.04.2013. No. KV 03 – 2013, 2012, 109 pp.

Tēzes un prezentācijas starptautiskās konferencēs (8)

1. **Mozeika E.**, Pilmane M., Kīsis J. “Antimicrobial peptides in psoriatic skin lesions – an immunohistochemical study”, Baltijas Dermatovenerologu Asociācijas (BADV) 9. Kongresa tēzes, Tartu 2010, publicētas kongresa mājaslapā. (Mutisks ziņojums).
2. **Mozeika E.**, Pilmane M., Kīsis J. “Immunohistochemical analysis of inflammatory markers and neuropeptides in psoriasis”, 3. Starptautiskā Psoriāzes Kongresa tēzes, Parīze 2010, JEADV (2010) 24 (Suppl. 4), 7. (Stenda refāts un mutisks ziņojums).
3. **Mozeika E.**, Pilmane M., Kīsis J. “Distribution of human β -defensin 2, TNF-alpha, IL-1 alpha, IL-6 and IL-8 in psoriatic skin”, 6. Baltijas Morfoloģijas konferences tēzes, Tartu 2011, Tēžu grāmata 28. lpp. (Mutisks ziņojums).
4. **Mozeika E.**, Pilmane M., Kīsis J. “Distribution and appearance of antimicrobial peptides, neuropeptides and inflammatory markers in psoriatic lesions”, 6. Starptautiskā Psoriāzes Kongresa (“From Gene to Clinic”) tēzes, Londona 2011, Tēžu grāmata 66. lpp. un British Journal of Dermatology 12.2011. pielikums. (Stenda referāts).

5. **Možeika E.**, Pilmane M. “Local immune response in the skin of psoriasis patients”, mutisks ziņojums Ikgadējā Somijas Anotomu konferencē, Tampere 2012.
6. **Sidhoma E.**, Pilmane M., Ķīsis J. “Role of Local Antimicrobial Response and Apoptosis in Psoriatic Skin”, 7. Baltijas Morfoloģijas konferences tēzes, Rīga 2013, Tēžu grāmata 59. lpp. (Mutisks ziņojums).
7. **Sidhoma E.**, Pilmane M., Kīsis J. “Role of antimicrobial peptides, proteases, neuropeptides and apoptosis in the inflammatory events of psoriasis”, European Workshop on “Skin Immune Mediated Inflammatory Diseases (SIMID)” tēzes, Verona 2014, tēžu grāmata un Clinical Dermatology 2014; 2 (Suppl 1): 35. (Stenda referāts).
8. **Sidhom E.**, Pilmane M., Kīsis J. “The role of antimicrobial defense and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in psoriatic inflammation”, Eiropas Dermatoloģijas un Veneroloģijas Akadēmijas (EADV) 12. Pavasara Simpozija tēzes, Valensija 2015. (Stenda referāts).

Tēzes un prezentācijas vietēja mēroga konferencēs Latvijā (7)

1. **Možeika E.**, Pilmane M., Ķīsis J. “Cilvēka ādas dabīgie antimikrobiē peptīdi pacientiem ar psoriāzi”, Rīgas Stradiņa universitātes 2010. gada Zinātniskās konferences Tēžu grāmata 111. lpp. (Stenda referāts)
2. **Možeika E.**, Pilmane M., Ķīsis J. “Psoriāzes slimnieku ādas dabīgā imūnā atbilde”, Rīgas Stradiņa universitātes 2011. gada Zinātniskās konferences Tēžu grāmata 134. lpp. (Stenda referāts).
3. **Možeika E.**, Pilmane M., Ķīsis J. “Human antimicrobial peptides in skin of patients with psoriasis in ontogenetic aspects”, Rīgas Stradiņa universitātes 2012. gada Zinātniskās konferences Tēžu grāmata 134. lpp. (Stenda referāts).

4. **Sidhoma E.**, Pilmane M., Ķīsis J., Sidhom T. “Antimikrobo peptīdu un iekaisuma citokīnu izvērtējums psoriāzes pacienta ādā”, Rīgas Stradiņa universitātes 2013. gada Zinātniskās konferences Tēžu grāmata 159. lpp. (Stenda referāts).
5. **Sidhoma E.**, Pilmane M., Ķīsis J., Sidhom T. “Dermatožu neskartas ādas imūnā atbilde”, Rīgas Stradiņa universitātes 2014. gada Zinātniskās konferences Tēžu grāmata 69. lpp. (Stenda referāts).
6. **Sidhoma E.**, Pilmane M., Ķīsis J. “Dermatožu neskartas ādas audu remodelācijas raksturojums”, Rīgas Stradiņa universitātes 2015. gada Zinātniskās konferences Tēžu grāmata 59. lpp. (Stenda referāts).
7. **Sidhoma E.**, Pilmane M., Ķīsis J. “Neuropeptīdu sadalījums psoriāzes pacienta ādā”, Latvijas Ārstu 7. kongress, tēzes publicētas kongresa mājaslapā: <http://arstukongress.lv/?&s=1361881321&fu=read&id=28> (Stenda referāts).

PATEICĪBAS

Vislielākā pateicība mana darba vadītājai *Dr. habil. med.*, profesorei Mārai Pilmanei par neatsveramo palīdzību un konsultācijām darba tapšanas gaitā, milzīgo apjomu ziedotā laika un vērtīgajiem padomiem. Darba tapšanas laikā Rīgas Stradiņa universitātes Anatomijas un antropoloģijas institūts kļuva ne tikai par manu studiju un darba vietu, bet arī par manām otrajām mājām.

Šis darbs nebūtu tapis arī bez otra mana darba vadītāja *Dr. med.*, asociētā profesora Jāņa Ķīša iedrošinājuma, plašā redzējuma un palīdzības.

Liels paldies visam Rīgas Stradiņa universitātes Anatomijas un antropoloģijas institūta kolektīvam par atbalstu, bet jo īpaši Morfoloģijas laboratorijas laborantei Natālijai Morozai par nepagurstošu palīdzību histoloģisko preparātu sagatavošanā.

Pateicos *Dr. oec.*, asociētajam profesoram Edgaram Brēķim (Latvijas Universitātes Ekonomikas un vadības fakultātes Ekonometrijas un biznesa informātikas katedra) par palīdzību un konsultācijām statistikas aprēķinos.

Pateicos arī savai *Alma mater* Rīgas Stradiņa universitātei par doto iespēju studēt doktorantūrā un sniegto finansiālo atbalstu, piešķirot ESF stipendiju.

Protams, vislielākais paldies manai ģimenei par sapratni, atbalstu un palīdzību. Paldies vecākiem par iedrošinājumu izvēlēties medicīnu par savu ceļu un rasto iespēju to realizēt. Paldies vīram Tamer Sidhom par palīdzību un sapratni, īpaši pētniecisko darbu nobeidzot.