Dijagnostička značajnost topivoga E-selektina kod fibromialgije

Šare, Antonio

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:506744

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Antonio Šare

Dijagnostička značajnost topivoga E-selektina kod fibromialgije

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2016.

Ovaj diplomski rad na temu "Dijagnostička značajnost topivoga E-selektina kod fibromialgije" prijavljen je na predmetu Biokemija 2 Farmaceutsko-biokemijskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i izrađen na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju pod mentorstvom prof. dr. sc. Karmele Barišić.

U prvom redu zahvaljujem svojoj mentorici prof.dr.sc. Karmeli Barišić za iskazano povjerenje, uložen trud i veliko strpljenje tijekom izrade ovog diplomskog rada. Također, hvala dr.sc. Ognjenu Čuliću za iskazanu pomoć i dane savjete tijekom eksperimentalnog dijela rada.

Posvećujem ovaj diplomski rad svojim roditeljima, Blaženki i Svetku, koji su najzaslužniji za moje postignuće. Hvala vam na potpori tijekom studija te bezuvjetnoj ljubavi koju mi pružate tijekom cijelog života. Hvala za svu žrtvu koju ste podnijeli za mene.

Zahvaljujem se svojoj sestri Andrei koja je uvijek bila uz mene i pomagala mi svojim savjetima.

Također, veliko hvala svim mojim prijateljima koji su mi uvijek pružali potporu te uljepšali moje studentsko razdoblje.

Sadržaj

1. UVOD 1

1.1. Fibromialgija 2

1.2. E-selektin 8

1.3. Fibromialgija i E-selektin 13

2. OBRAZLOŽENJE TEME 15

3. MATERIJALI I METODE 17

3.1. Ispitanici i uzorci 18

3.2. Metoda 18

4. REZULTATI I RASPRAVA 20

4.1. Podaci o ispitanicima 21

4.2. Izrada baždarnog dijagrama 23

4.3. Utvrđivanje optimalnoga razrjeđenja seruma 24

4.4. Određivanje koncentracije E-selektina u uzorcima seruma ispitanika 26

4.5. Rasprava 30

5. ZAKLJUČCI 32

6. LITERATURA 34

7. SAŽETAK / SUMMARY 39

7.1. Sažetak 40

7.2. Summary 41

8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA 42

Kratice

ABC	kompleks avidina, biotina i peroksidaze iz hrena
ACR	Odbor Američkog fakulteta reumatologije (engl. American College of Rheumatology)
ACTH	adrenokortikotropni hormon
ARG	arginin
ASN	asparagin
ASP	aspartat
BDNF	moždani neurotrofički faktor (engl. brain derived neurotrophic factor)
BMI	indeks tjelesne mase (engl. body mass index)
CD31	grozd za diferencijaciju 31 (engl. cluster of differentiation 31)
CD54	grozd za diferencijaciju 54 (engl. cluster of differentiation 54)
CD106	grozd za diferencijaciju 106 (engl. cluster of differentiation 106)
CRH	kortikotropin oslobađajući hormon
EGF	epidermalni faktor rasta (engl. epdermal growth facor)
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
ELAM-1	endotelna-leukocitna adhezijska molekula 1
ELISA	enzimska imunokemijska metoda (engl. enzyme-linked immunosorbent assay)
EMNG	elektromioneurografija
ESL-1	E-selektin ligand 1
GLU	glutamat
HCV	ljudski citomegalovirus
HIV	virus humane imunodeficijencije
HLA	leukocitni antgen (engl. human leukocyte antigen)

HPA	hipotalamično-pituitarno-adrenalna os
HRP	hrenova peroksidaza
ICAM-1	međustanična adhezijska molekula (engl. intercellular adhesion molecule)
IL-1	interleukin 1
KKS	kompletna krvna slika
LECAM-1	leukocitna endotelna stanična adhezijska molekula 2
NF-κB	nuklearni čimbenik κB (engl. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
NMDA	N-metil-D-aspartat
PSGL-1	P selektin ligand 1 (engl. P-selectin glycoprotein ligand)
SE	sedimentacija eritrocita
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidin
TNF-α	tumorski nekrotični čimbenik-α (engl. tumor necrosis factor alpha)
TSH	tireostimulacijski hormon
TYR	tirozin
VCAM-1	vaskularna stanična adhezijska molekula-1 (engl. vascular cell adhesion molecule)
WPI	indeks raširenosti boli (engl. widespread pain index)

1. UVOD

1.1. Fibromialgija

Fibromialgija (fibra - vezivo; mys, myos - mišić; algos – bol, ia-ja) je idiopatski, kronični sindrom koji je karakteriziran umjerenom ili ozbiljnijom boli mišićno-skeletnoga sustava te alodinijom. To je stanje dugotrajne, proširene, kronične boli koja mijenja lokaciju i jačinu. Simptomi fibromialgije su još poremećaj spavanja, glavobolja, umor, anksioznost i parestezija. Sindrom je najprije nazvan fibrozitisom, a kasnije se upotrebljava naziv fibromialgija (Chakrabarty i Zoorob, 2007).

Etiologija fibromialgije nije potpuno poznata. Međutim, smatra se da je središnja senzitizacija glavni mehanizam nastanka bolova, a tu su i ostali faktori poput genetike te imunosni i hormonski faktori koji, također, igraju značajnu ulogu u nastanku samoga sindroma. Sindrom može biti povezan s ostalim reumatskim bolestima, psihičkim i neurološkim anomalijama, infekcijama te s dijabetesom (Bellato i sur., 2012).

Fibromialgija je druga najčešća bolest koju dijagnosticiraju reumatolozi. Na prvom se mjestu nalazi osteoartritis. Fibromialgija je naporna i iscrpljujuća bolest koja može imati razarajuće posljedice na život pacijenta, ostavljajući posljedice na njegovu radnu sposobnost, ali i odnose s obitelji i okolinom (Clauw, 2011). Između ostaloga, fibromialgija je i socioekonomski problem jer do 50% bolesnika ima smanjenu radnu sposobnost. Godišnja prevalencija je do 2% u populaciji (Budišin, 2007). Fibromialgija se obično smatra poremećajem kod žena između 20 i 50 godina starosti, ali također pogađa i muškarce, djecu, adolescente i starije osobe. Češća je kod rođaka oboljelih osoba što upućuje na važnu ulogu genskih čimbenika, ali isto tako upućuje i na utjecaj okoline na razvoj same bolesti. Odbor Američkog fakulteta reumatologije (ACR) 1990. godine odredio je kriterije za klasifikaciju fibromialgije. Ti kriteriji su nastali kao rezultat prvih dobro osmišljenih, multicentričnih proučavanja fibromialgije. Kriteriji ACR-a su i danas temelj za dijagnostiku fibromialgije (Chakrabarty i Zoorob, 2007).

Navedeni se kriteriji prvenstveno odnose na osjetljivost na pritisak na minimalno 11 od 18 specificiranih točaka. Osim toga, u njih spada i prisutnost difuzne boli. Difuzna je bol prisutna na obje strane tijela, iznad i ispod struka te isto tako zahvaća aksijalni skelet (Wolfe i sur., 2010). Problem kod fibromialgije predstavlja često neprepoznavanje bolesti, a razlozi za to su između ostaloga i nedovoljno znanje, ignoriranje i podcjenjivanje ove kronične bolesti od medicinskih profesionalaca, ali isto tako i od zdravstvenih autoriteta i šire javnosti (Tomašević-Todorović i sur., 2010).

Etiologija i patofiziologija fibromialgije

Etiologija fibromialgije nije u potpunosti rasvijetljena. Unatoč tome, poznato je da su u nastanak ove bolesti uključeni sljedeći faktori: disfunkcije središnjega i autonomnoga živčanoga i imunosnoga sustava, te genski i psihosocijalni utjecaji. Senzitizacija središnjega živčanoga sustava smatra se najvažnijim mehanizmom u etiologiji fibromialgije. Naime, dolazi do pojačanoga odgovora na stimulaciju središnjega živčanoga sustava. Pojava senzitizacije posljedica je spontane živčane aktivnosti, proširenja receptivnih polja te pojačanoga odgovora nakon početne stimulacije (stimulacija koja se događa prvi put). Amplifikacija osjeta boli nakon ponavljanja stimulacije događa se i kod zdravih osoba, međutim, značajno je intenzivnija kod osoba s fibromialgijom. Ovaj fenomen naziva se neuroplastičnost i uglavnom je posredovan receptorima za N-metil-D-aspartat (NMDA) smještenim u postsinaptičkoj membrani u dorzalnom rogu kralježnične moždine (Bellato i sur., 2012).

Drugi mehanizam uključuje silazni inhibitorni put koji modulira odgovor kralježnične moždine na periferni osjet boli. Izgleda da je kod pacijenata koji boluju od fibromialgije umanjen značaj silaznog inhibitornog puta, što u principu dodatno pomaže senzitizaciji središnjega živčanoga sustava (Bellato i sur., 2012). Činjenica da je razina neurotransmitera koji pojačavaju signal boli povećana kod osoba s fibromialgijom ide u prilog tvrdnji o senzitizaciji kao glavnom mehanizmu. Ti neurotransmiteri su primjerice supstancija P, čimbenik rasta živaca te neurotrofički moždani faktor BDNF (engl. brain derived neurotrophic factor) i svi su pronađeni u povišenim koncentracijama kod pacijenata koji boluju od fibromialgije (Clauw i sur., 2011).

Također i glutamat ima ulogu u sindromu fibromialgije. Glutamat je ekscitacijski neurotransmitor, a veći broj istraživanja ukazuje na njegovu moguću ulogu u fibromialgiji. Naime, razina glutamata u posterior insula te cerebrospinalnom likvoru povećana je kod osoba koje pate od fibromialgije. Isto tako, razina glutamata negativno je proporcionalna s pragom boli kod pacijenata (Harris i sur., 2009). Razina serotonina, dopamina i norepinefrina te njihovih metabolita snižena je kod osoba s fibromialgijom. Ta činjenica ide u prilog tvrdnji o smanjenoj aktivnosti inhibicijskoga puta. S druge strane, opioidni peptidi, endorfini i metaenkefalini pronađeni su u povišenim količinama, međutim, otežano je vezanje za opioidne receptore. Prisutna je povišena opioidna aktivnost, ali bez učinka jer opioidni receptori ih ne vežu iz, za sada nepoznatih razloga. To objašnjava činjenicu da opioidni lijekovi značajno ne pomažu osobama koje pate od fibromialgije (Clauw i sur., 2011).

Pokazalo se također da glija stanice imaju važnu ulogu u patogenezi samoga sindroma. Glija stanice, aktivirane različitim bolnim podražajima, otpuštaju proupalne citokine, dušikov oksid, prostaglandine i reaktivne kisikove spojeve koji stimuliraju i prolongiraju hiperekscitabilnost kralježnične moždine (Bradley, 2009).

Fibromialgija jest sindrom povezan sa stresom pa je u samu etiologiju uključena hipotalamično-pituitarno-adrenalna (HPA) os. Više istraživanja ukazalo je na povišenu razinu kortizola, što posebno dolazi do izražaja navečer. Taj fenomen povezan je i sa samim poremećajem spavanja. Kod pacijenata dokazana je i povišena bazalna koncentracija adrenokortikotropnog hormona (ACTH). Osim toga ACTH je povišen i u odgovoru na stres. Povišena koncentracija ACTH-a najvjerojatnije je posljedica kronične hiposekrecije kortikotropin oslobađajućega hormona (CRH). Ove su promjene vjerojatno povezane s niskom koncentracijom serotonina, zato što serotoninergična vlakna reguliraju funkciju HPA osi (Neeck, 2000).

Razina hormona rasta normalna je tijekom dana, ali snižena za vrijeme spavanja. Za ovu pojavu postoje dva objašnjenja. Prvo, hormon rasta najviše se luči tijekom četvrte faze spavanja, a ona je kod fibromialgičnih pacijenata poremećena. Drugo, kod ovih pacijenata povišena je razina somatostatina. Somatostatin je inhibitor hormona rasta. Njegovo lučenje inducira ACTH čija je koncentracija povišena. Razina tiroidnih hormona je normalna, čak i kod pacijenata koji pokazuju simptome hipotiroidizma. Isto vrijedi i za gonadotropin, unatoč činjenici da fibromialgija u većem postotku zahvaća žensku populaciju (Bellato i sur., 2012).

Kod osoba s fibromialgijom prisutna je i promjena u autonomnom živčanom sustavu. Dolazi do smanjenja varijabilnosti srčanoga ritma pri čemu dolazi do pojačane aktivnosti srca tijekom noći, što je također povezano s poremećajem spavanja. Anomalije u radu autonomnoga živčanoga sustava temelj su anksioznosti, pseudo-Raynaudovoga fenomena, intestinalnih simptoma, ali i pojačanoga psihološkoga odgovora na stres (Stisi i sur., 2008). Uz to, promjene u autonomnom živčanom sustavu obuhvaćaju i smanjenu vazokonstrikciju mikrocirkulacije i ortostatsku hipotenziju. Umor i vrtoglavica upravo se mogu objasniti ovim procesima kod fibromialgičara (Bradley, 2009).

Psihički problemi smatraju se isto tako relevantnim faktorom pri razvoju samoga sindroma. Značajan broj fibromialgičara pati od anksioznosti, somatizacije, distimije, paničnoga poremećaja, posttraumatskoga stresa i depresije. Depresija pogoršava simptome ove bolesti pa su iz toga razloga antidepresivi sastavni dio terapije. Smatra se također da potencijalnu ulogu u razvoju sindroma imaju vaskularna deregulacija u mišićima, neadekvatan odgovor na

oksidacijski stres, povećan interleukin 1 (IL-1) u kutanom tkivu, već spomenuta povećana supstancija P i fragmentacija DNA u mišićnim vlaknima.

Prema nekim istraživanjima čini se da je genetska predispozicija važna za nastanak i razvoj fibromialgije (Bellato i sur., 2012). Pretpostavlja se da je nasljeđivanje poligensko, međutim ističe se gen za serotoninski transporter. Taj gen je karakteriziran polimorfizmom jednoga nukleotida, pri čemu je 'S' (engl. short) alel mnogo češći kod pacijenata koji boluju od fibromialgije. Osim serotonina, važnim se smatraju i geni za katehol-O-metiltransferazu, D4 dopaminski receptor te regija HLA (engl. human leukocyte antigen) (Bellato i sur., 2012).

Pretpostavlja se da postoji nekoliko okidača za razvoj same fibromialgije. Tako se infekcije ljudskim citomegalovirusom (HCV), virusom ljudske imunodeficijencije (HIV), parvo virusom te borelijom smatraju okidačima bolesti. Traume, cijepljenja i različite kemijske supstance mogu uzrokovati nastanak ili pridonijeti razvoju samoga sindroma (Bellato i sur., 2012). Utjecaji radnoga okoliša, primjerice nezadovoljstvo radnim mjestom, monoton posao te nedostatak ugodne radne atmosfere smatraju se faktorima koji pridonose razvoju fibromialgije. Stres kao takav utječe i na same fibromialgičare, na način da pacijenti koji su pod utjecajem stresa teže podnose bolove, odnosno sama klinička slika i simptomi su ozbiljniji nego kod pacijenata koji nisu pod velikim utjecajem stresa (Bradley, 2009).

Klinička slika fibromialgije

Simptomi fibromialgije obuhvaćaju bolove na više mjesta na tijelu, umor i poremećaj spavanja. Pacijenti se često žale na bol u donjem dijelu leđa koja se širi prema stražnjici i nogama te na bol i ukočenost vrata i ramena. Ukočenost se pojačava tijekom dana. Pacijenti se žale da su iscrpljeni, čak i nakon buđenja. Česta su buđenja tijekom noći pri čemu im je istovremeno otežano ponovno zaspati. Mnogi pacijenti imaju subjektivan osjećaj otečenosti zglobova, iako isto nije prisutno te paresteziju koja se ne može objasniti neurološkim stanjem. Mnogi se pacijenti žale i na kognitivne probleme, poteškoće u pamćenju i smanjen vokabular. Prisutne su glavobolje različitoga intenziteta kao i migrenske glavobolje. Često se kod oboljelih javlja anksioznost i depresija. Pacijenti su i meteoropati pa će tako s ljepšim i suhim vremenom i simptomi biti manje izraženi. Smanjenju simptoma pridonosi fizička aktivnost, adekvatan san te izbjegavanje stresa (Chakrabarty i Zoorob, 2007).

Dijagnostika fibromialgije

Poteškoće kod dijagnostike fibromialgije predstavlja nedostatak specifičnih pokazatelja bolesti. Dijagnoza se uglavnom temelji na ACR-ovim testovima i to tek nakon što se isključe druge bolesti (Wolfe i sur., 2010). Pet najčešćih dijagnoza koje treba razmotriti kod pacijenata sa simptomima fibromialgije su: psihički poremećaji, hipotiroidizam, reumatoidni artritis, adrenalna disfunkcija i multipli mijelom. Simptomi bolesti su nejasni i generalizirani pa je, između ostaloga, i zbog toga teško dijagnosticirati fibromialgiju. Ipak, tri se simptoma pojavljuju kod gotovo svakoga pacijenta, a to su: bol, umor i nesanica (Bellato i sur., 2012).

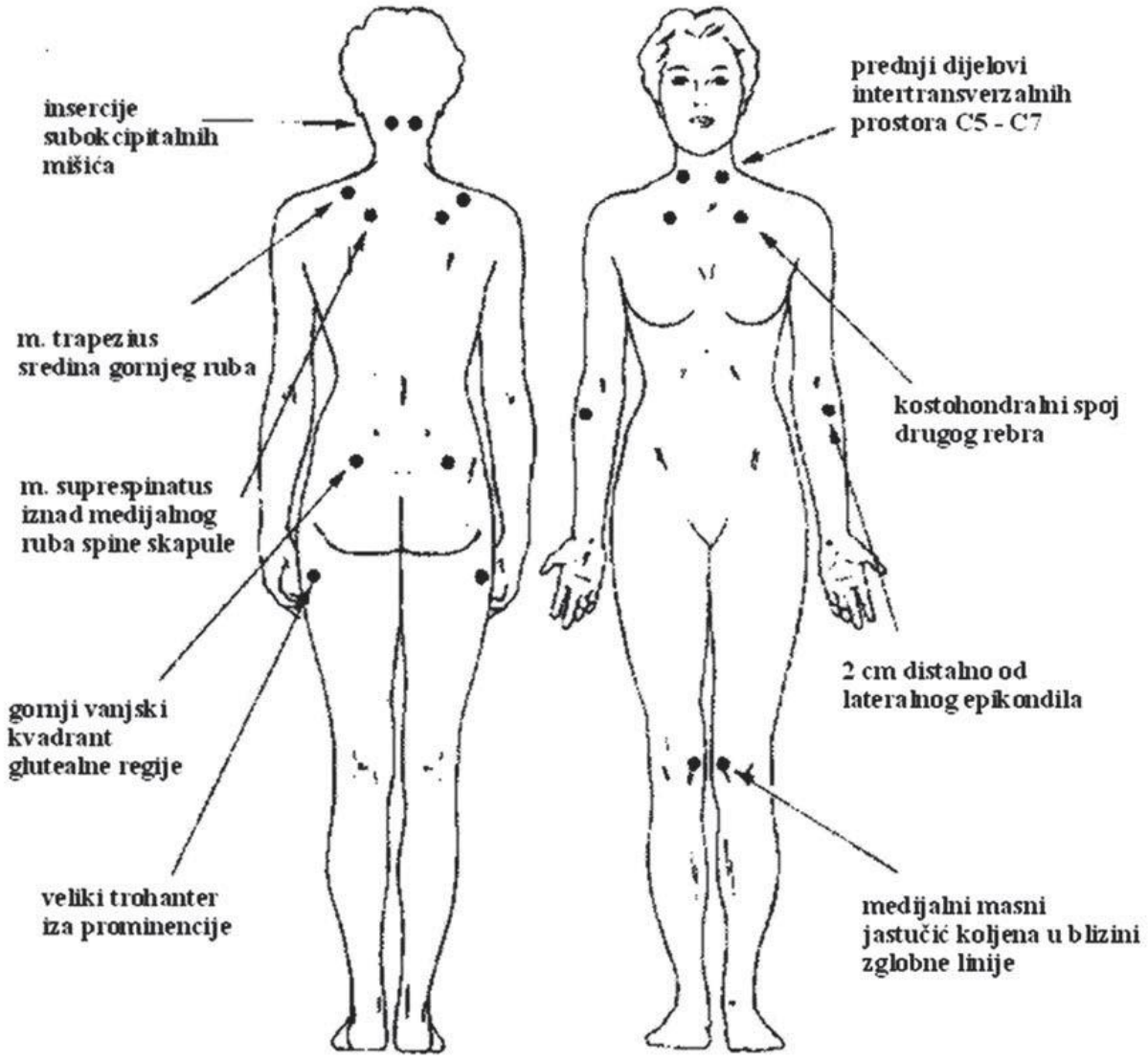
Sama se dijagnoza temelji na prije spomenutim ACR-ovim kriterijima usvojenim 1990. te dopunjenim i modificiranim 2000. i 2011.godine. Prvi kriterij za dijagnozu fibromialgije je difuzna bol koja traje najmanje tri mjeseca, prisutna na lijevoj i desnoj strani tijela, iznad i ispod struka te zahvaća aksijalni skelet. Drugi je kriterij bolnost ll od ukupno l8 specifičnih bolnih točaka. Bol se ispituje digitalnom palpacijom, snagom pritiska od oko 4 kg. Bolesnik pri pregledu i palpaciji bolnih točaka mora reći da osjeća bol, a ne osjetljivost ili nelagodu.

Specifične bolne točke simetrično su poredane na svakoj strani tijela i ima ih devet pari (ukupno 18) (Budišin, 2007).

To su: okcipitalna kost u području insercije subokcipitalnih mišića, donji dio vratne kralježnice u području intertransverzalnih prostora, srednji dio gornjega ruba trapezoidnoga mišića, supraspinatni mišić na polazištu iznad spine skapule blizu medijalnoga ruba skapule, drugo rebro u području neposredno uz kostohondralni spoj i iznad njega, dva centimetra distalno od lateralnog epikondila humerusa, gornji vanjski glutealni kvadrant, stražnji rub velikog trohantera femura i masni jastučić s medijalne strane koljena proksimalno od razine zglobne pukotine (Slika 1). Dijagnoza se postavlja ako su pozitivna oba kriterija (Budišin, 2007).

Novi ACR-ovi kriteriji iz 2000. godine temelje se na kronologiji i distribuciji boli, pri čemu se određuje indeks boli (WPI). Uz to, novi kriteriji uzimaju u obzir prisutnost i jačinu pratećih simptoma putem ljestvice jačine simptoma (SS). Kriteriji su 2011. godine naknadno modificirani. Modificirani kriteriji obuhvaćaju određivanje indeksa boli (WPI) i subjektivnu procjenu specifičnih simptoma, ali je eliminirana liječnikova procjena SS rezultata te zamijenjena s 3 „da/ne“ pitanja o prisutnosti glavobolje, depresije i abdominalne boli u posljednjih 6 mjeseci (Wolfe i sur., 2011).

Laboratorijski testovi ograničeni su na kompletnu krvnu sliku (KKS), rutinske biokemijske parametre u serumu, tiroidni stimulirajući hormon (TSH) te sedimentaciju eritrocita (SE) i/ili C-reaktivni protein (Clauw i sur., 2011). Laboratorijski nalazi u fibromialgiji uglavnom su normalni, uključujući i normalan nalaz mišićnih enzima. Normalan je i nalaz elektromioneurografije (EMNG nalaz). U slučaju smetnji sna, učestalih glavobolja i emocionalnih poremećaja potrebna je i neuropsihijatrijska obrada (Budišin, 2007).



Slika 1.: 18 specifičnih bolnih točaka u fibromialgiji, preuzeto iz Budišin, 2007.

1.2. E-selektin

Selektini su proteini sisavaca koji vežu ugljikohidrate. Otkriveni su 1989. godine te je do danas njihova biološka funkcija prilično jasna. Razlikuju se tri skupine selektina: E-selektini, P-selektini i L-selektini. Sve tri vrste selektina vežu ugljikohidratne strukture koje sadrže sijalinsku kiselinu (Ernst i Magnani, 2009). E-selektin, poznat i kao CD62 pripadnik obitelji selektina te kao endotelna-leukocitna adhezijska molekula 1 (ELAM-1) ili leukocitna endotelna stanična adhezijska molekula 2 (LECAM-2) jest adhezijska molekula eksprimirana pri aktivaciji stanica krvnih žila citokinima (Collins i sur., 1991). E-selektin je 110-kDa velik glikoprotein (Lee, 1996).

Struktura E-selektina

Svi selektini (E-, L- i P-selektini) jesu proteini sastavljeni od sljedećih domena: domene koja veže ugljikohidrate i ovisna je o kalciju, amino-terminalne lektinske domene, domene slične epidermalnom faktoru rasta (EGF), domene koja sadrži 2-9 ponavljajućih sljedova i regulira komplement, transmembranske domene i jedne vrlo kratke citoplazmatske domene. Selektini pripadaju obitelji C-tipa životinjskih lektina. Za tu obitelj karakteristično je da se vežu za ugljikohidratne ligande ovisno o kalciju. (Anostario i Huang, 1995).

Različiti selektini iste vrste vrlo su slični, a prisutna je i visoka homologija između selektina različitih vrsta. To se posebno odnosi na već spomenutu lektinsku domenu. S druge strane, postoje razlike u citoplazmatskoj i transmembranskoj domeni između E-, L-, i P-selektina, međutim, između E-selektina u različitim vrstama organizma te razlike su značajno manje (isto vrijedi za P-selektin i L-selektin). Upravo te su domene odgovorne za vezanje navedenih adhezijskih molekula na različite odjeljke. Tako se P-selektin veže za sekretorne granule, L-selektin za vrhove mikronabora leukocita, dok se E-selektin veže za plazmatsku membranu (Ley, 2003).

Sama adhezija, koja se odvija uz pomoć selektina, je proces ovisan o kalciju (Šimundić, 2001). Ipak, E-selektin, za razliku od ostalih selektina, ima samo jedno vezno mjesto za kalcijeve ione. Kalcijev se ion veže za E-selektin preko koordinativnih veza s karbonilnim skupinama bočnih lanaca Glu80, Asn82, Asn105 i Asp106, koordinativnom vezom s karbonilnom skupinom glavnog lanca Asp106, te sa dvije molekule vode, pri čemu se formira

pentagonalna bipiramidna sfera. Vezanje kalcijevoga iona za E-selektin dovodi do konformacijske promjene proteina pri čemu se sama adhezijska molekula stabilizira (Anostario i Huang, 1995).

Amino-terminalna lektinska domena smatra se odgovornom za vezanje sijaliziranih Lewis X ugljikohidratnih struktura (sLex ili CD15) (Revelle i sur.,1996). Međutim, važno je spomenuti razliku E-selektina od ostalih selektina u pogledu položaja domene koja je slična EGF-u te lektinske domene. Naime, dvije domene nalaze se prilično udaljene jedna od druge, što nije slučaj kod ostalih selektina. Domena koja je slična EGF-u i lektinska domena imaju tek nekoliko izravnih dodirnih točaka. Domena koja je slična EGF-u ne sudjeluje u konformacijskim promjenama lektinske domene, već ima izravnu ulogu pri vezanju liganda za E-selektin (Vestweber, 1997). Upravo su lektinska domena i domena koja je slična EGF-u dvije regije odgovorne za vezanje samih liganada. Domena s 2-9 ponavljajućih sljedova, koja regulira komplement, važna je za osnaživanje veze između liganda i E-selektina (Kawano i sur., 2013). Tyr94 te Arg97 ključni su aminokiselinski ostatci za medijaciju adhezije (Graves i sur., 1994).

Gen za E-selektin prisutan je u ljudskom genomu u samo jednoj kopiji. Sastoji se od 14 eksona koji sveukupno sadržavaju oko 13 tisuća nukleotida. Pozicije razgraničenja eksona i introna koreliraju s pretpostavljenim funkcionalnim odjeljcima samoga proteina. Tako je uočeno da je lektinska domena u potpunosti kodirana jednim eksonom, citoplazmatska eksonima 12 i 13, dok je domena koja je slična EGF-u kodirana s nekoliko eksona (Collins i sur., 1991).

Aktivacija i funkcija E-selektina

Selektini sudjeluju u kretanju stanica imunosnoga sustava, T-limfocita i trombocita.

Nepostojanje selektina ili samih liganada selektina može imati ozbiljne posljedice kod ljudi, jer može dovesti do recidiva bakterijskih infekcija te sklonosti istima, ali i upornoga ponavljanja bolesti (Ley, 2003). Selektini su medijatori prve faze adhezije leukocita, tzv. prijanjanja cirkulirajućih leukocita na endotelne stanice, trombocite ili druge leukocite. Interakcije selektin-ligand, koje su presudne u tom početnom koraku regrutacije cirkulirajućih leukocita do mjesta upale, obuhvaćaju brzo stvaranje veze kako bi se omogućilo prijanjanje, brza disocijacija u svrhu klizanja odnosno kotrljanja uzduž endotela i pogodna slobodna

energija veze za odupiranje leukocita silama protoka krvi. E-selektin se aktivira prvenstveno pod utjecajem nekrotizirajućega tumorskoga faktora alfa (TNF-alfa) i IL-1, ali i djelovanjem imunosnih kompleksa, kisikovih radikala, komponenti komplementa, citokina i dr. (Šimundić, 2001).

Pretpostavljeni mehanizam aktivacije i povećane ekspresije E-selektina pod djelovanjem citokina i TNF-alfa leži u samom genu za E-selektin. Naime, u promotoru gena za E-selektin nalazi se sekvenca GGGGATTTTCC. Ta sekvenca igra važnu ulogu u odgovoru na razinu citokina iz razloga što konformacijski u potpunosti odgovara proteinu NF-κB koji se veže na DNA. Upravo je za taj protein dokazano da sudjeluje kao posrednik u stimulaciji ekspresije E-selektina citokinima (Collins i sur., 1991).

U normalnim, fiziološkim okolnostima, E-selektin je eksprimiran isključivo u mikrovaskularnim žilama kože. U ostalim dijelovima organizma navedena adhezijska molekula nije prisutna kod zdravih osoba (Ley, 2003). Za razliku od, primjerice P-selektina koji se regrutira na površinu stanice iz granula u kojima je skladišten (alfa granule u trombocitima, odnosno Weibel-Paladijeva tjelešca u endotelnim stanicama), E-selektin se sintetizira *de novo* i transportira do stanične površine nakon stimulacije. Maksimalna ekspresija E-selektina događa se otprilike 4-6 sati nakon stimulacije. Ligandi za selektine su glikoproteini sa stanične površine koji posjeduju specifične sijalinizirane Lewis X strukture, koje još nalazimo u antigenima krvnih grupa. Točna uloga tih receptora intenzivno se istražuje. L-selektin ulazi u interakciju s GlyCAM-1 i CD34 (Šimundić, 2001). P-selektin i E-selektin vežu ugljikohidratne ligande na leukocitima. Oni su također posrednici u dovođenju leukocita na aktivirane endotelne stanice. Najvažniji ligand za P-selektin je PSGL-1 (engl. P-selectin glycoprotein ligand) koji ima određeni afinitet i za E-selektin, posebno u ranoj fazi upalnoga procesa (Tingshuang, 2013). Međutim, za E-selektin to nije najvažniji ligand. Pretpostavlja se da E-selektin na leukocitima prepoznaje ESL-1 (engl. E-selectin ligand 1) (Walzog i Gaehtgens, 2000).

U fiziološkim uvjetima, krvni leukociti moraju izaći iz vaskularnoga te ući u perivaskularni upaljeni prostor gdje će doći do izražaja njihova uloga. U tom procesu leukociti usporavaju od svoje brzine tijekom 'plutanja' u krvi do potpunoga usporavanja, odnosno zaustavljanja na endotelu. Upravo ovdje je ključna uloga selektina, posebice E-selekina. Naime, E-selektin je prvenstveno odgovoran za sporo kotrljanje leukocita i granulocita. Čvrstoća vezanja E-selektina s ligandima, odnosno s leukocitima je veća u usporedbi s primjerice P-selektinom. Iz toga razloga vrijeme disocijacije leukocita s E-selektina je duže u odnosu na vrijeme disocijacije leukocita sa ostalih selektina. Upravo zbog usporavanja leukocita, E-selektin je

neizmjerno važan za lokalno usmjeravanje leukocita prema mjestu upale (Kunkel i Ley, 1996). Dapače, nekoliko istraživanja ukazalo je na nužnost prisutnosti E-selektina za pravilno usmjeravanje leukocita na mjesto upale. Također, postoje određene pretpostavke da je E-selektin važan i za inicijaciju čvrste adhezije leukocita (Ley i sur., 1998). Iako je nedvojbena važnost E-selektina, mora se naglasiti isto tako da sama prisutnost E-selektina nije dovoljna za usporavanje i usmjeravanje leukocita. Naime, pokazalo se da su uz E-selektin potrebne i ostale molekule za usporavanje leukocita poput molekule CD18 (Jung i sur., 1998). Selektini i odgovarajući ligandi također imaju ključnu ulogu u širenju hematoloških karcinoma i u povratku leukemičnih matičnih stanica u mikrodomene unutar koštane srži. E-selektin je konstitutivno eksprimiran u koštanoj srži te veže ugljikohidratne ligande pronađene na leukemičnim matičnim stanicama. Kada jednom adheriraju na mikrodomene u koštanoj srži, leukemične matične stanice postaju mirne i manje podložne djelovanju anti-proliferativnih kemoterapeutika (Ernst i Magnani, 2009).

Iz svega navedenoga razvidna je velika fiziološka važnost E-selektina. Značaj uloge selektina, kao posrednika u procesu regrutacije cirkulirajućih leukocita do mjesta upale, prepoznat je nakon što je ustanovljeno da postoji čitav niz bolesnika koji pate od teških bakterijskih infekcija od rođenja, grešaka u razvoju, te naposljetku abnormalnosti u profilu krvnih grupa zbog poremećaja u funkciji selektina (Šimundić, 2001). Isto tako, razina E-selektina povišena je kod određenih patofizioloških procesa pa prema tome može biti zanimljiv i u dijagnostici te predviđanju, odnosno praćenju tijeka bolesti kod određenih pacijenata.

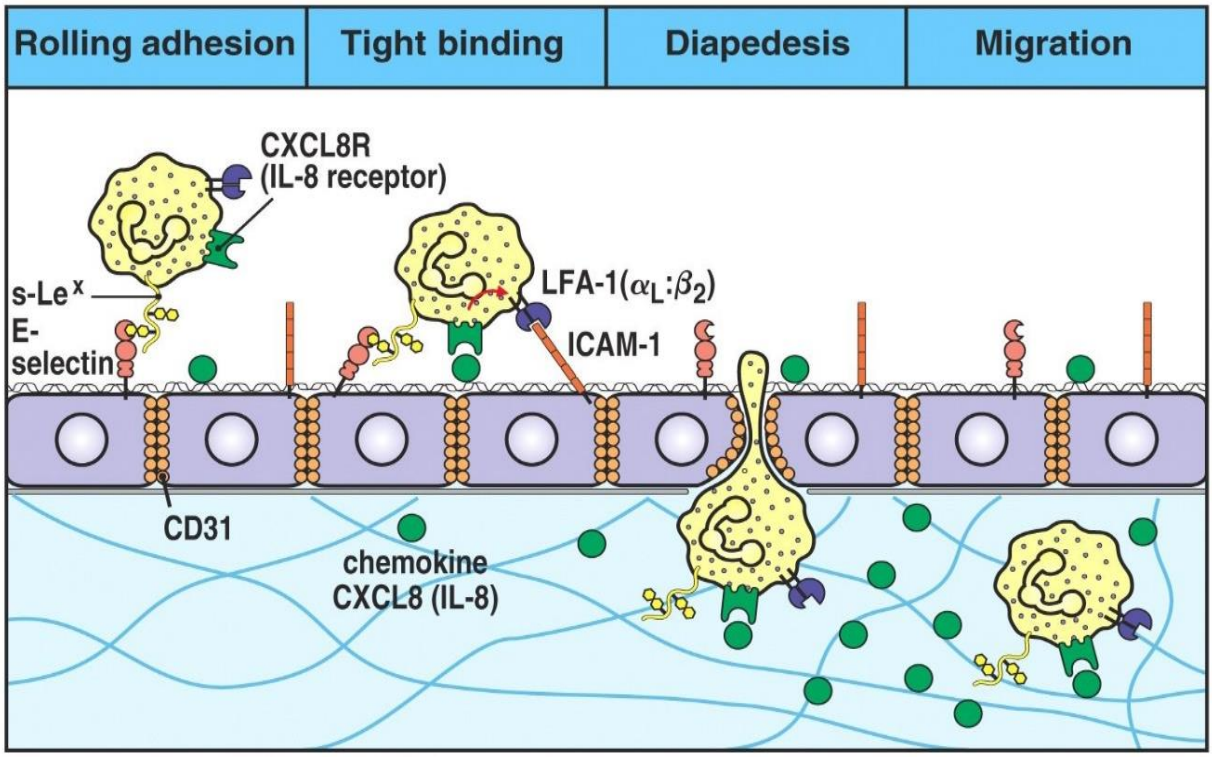


Figure 2-44 part 3 of 3 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Slika 2.: Funkcija E-selektina pri adheziji, vezanju i migraciji leukocita (preuzeto s http://www.bio.davidson.edu)

E-selektin kao biomarker

E-selektin se pojavljuje u prenatalnom periodu. Njegova se sinteza inducira najmanje dva mjeseca prije rođenja. Od svih selektina, E-selektin se pojavljuje posljednji tijekom razvoja ljudskog organizma (Auvinen i sur., 2014). Kod djece, razina E-selektina, ali i ostalih adhezijskih molekula, smanjuje se u razdoblju od četvrte do sedamnaeste godine života. S druge strane, kod odraslih osoba razina E-selektina nije povezana s dobi ili eventualno spolom. Međutim, koncentracija E-selektina povezana je s BMI-jem (engl. body mass index), leukocitima, trombocitima, eritrocitima, i glukozom. Njegova koncentracija u krvi smanjuje se kod korištenja oralnih kontraceptiva (Ponthieux i sur., 2004).

Povišena koncentracija E-selektina zapažena je kod upalnih procesa. Kod mnogih bolesti s upalnom komponentom poput ateroskleroze, dijabetesa, reumatoidnoga artritisa, karcinoma i dr. zapaža se povišena koncentracija ove adhezijske molekule (Laviola i sur., 2013). Također,

povećana razina E-selektina može značiti i povećani rizik za dobivanje vaskularnih bolesti te Chronove bolesti (Ley, 2003).

Povišeni E-selektin prati dijabetes tipa dva. Pretpostavlja se da razlog povišenim vrijednostima leži u hiperglikemiji, hiperinzulinemiji te otpornosti stanica na inzulin. Osim toga, serumska je koncentracija E-selektina povećana i kod pretilih osoba, što se dovodi u vezu s adiponektinom. Adiponektin je specifični adipocitni-sekretorni protein koji je snižen u pretilih pacijenata (Matsumoto i sur., 2002).

Pacijenti koji boluju od karcinoma želuca nemaju povišenu razinu E-selektina u odnosu na zdrave osobe, međutim pokazalo se da razina adhezijskih molekula VCAM-1, ICAM-1 te E-selektina koreliraju sa stadijom bolesti, prisutnosti metastaza u želučanom zidu, limfnim čvorovima ili udaljenim tkivima. Isto tako, serumska koncentracija tih istih molekula značajno opada nakon operacije te uklanjanja cijelog ili većeg dijela tumora (Alexiou i sur., 2003).

Kod kolorektalnog tumora povisuje se koncentracija E-selektina te adhezijskih molekula ICAM-1 te VCAM-1. Razina tih adhezijskih molekula u korelaciji je i s razinom tumorskoga biljega karcinoembrionalnoga antigena (Alexiou i sur., 2001). Neke su studije pokazale da se koncentracija E-selektina može upotrijebiti i za prognozu bolesti. Kao i kod karcinoma želuca, serumska koncentracija E-selektina opada nakon operacije samoga tumora (Sato i sur., 2010). Očigledno, E-selektin ima određenu ulogu kod metastaziranja samoga karcinoma. Na mišjim modelima pokazalo se da ELAM-1 potiče metastaziranje, te čak usmjerava metastaze na jetra. E-selektin ulazi u interakcije s cirkulirajućim tumorskim stanicama. Pretpostavlja se da pomaže tumorskim cirkulirajućim stanicama u inicijalnom pristajanju i čvrstoj adheziji na stanice u udaljenim tkivima (Gakhar i sur., 2013).

1.3. Fibromialgija i E-selektin

Dolazak krvnih stanica u tkiva kritični je korak u razvoju imunoga odgovora, a posredovan je interakcijama leukocita s endotelnim stanicama putem adhezijskih molekula. Doza glukokortikoida ili akutno oslobađanje kortizola nakon stresa snažno utječe na leukocite i to tako što utječe prvenstveno na ekspresiju citokina i staničnih adhezijskih molekula. Kako je i prethodno naznačeno, selektini (E, P, i L-selektin), ali i α4 (CD49d) i P2 integrini (CD11/CD18) posreduju u kotrljanju i pričvršćivanju leukocita na aktivirani endotel

povezivanjem sa odgovarajućim ligandima. Povišene koncentracije adhezijskih molekula i njihovih topivih izoformi karakteristične su za neke bolesti imunosnoga sustava poput reumatoidnoga artritisa, multiple skleroze, lupusa erythematosusa, Sjogrenovoga sindroma te stanja pretilosti, dijabetesa, ali i hipertenzije.

Inhibicija adhezijskih molekula inducirana glukokortiokoidima manje je izražena kod pacijenata s jakom depresijom. To ukazuje da bi razina adhezijskih molekula kod takvih pacijenata mogla biti povišena upravo zbog smanjenoga intenziteta inhibicije adhezijskih molekula glukokortikoidima. Pretpostavka je da se slično događa i kod fibromialgije, s obzirom na visoku učestalost depresivnih simptoma i komorbiditeta s velikim depresivnim epizodama kod pacijenata koji pate od teške depresije. Isto tako, neka istraživanja ukazuju na povišenu vrijednost L-selektina u krvi kod pacijenata sa fibromialgijom u odnosu na kontrolnu skupinu (Macedo i sur., 2007).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Fibromialgija je druga najčešća bolest koju dijagnosticiraju reumatolozi. Riječ je o idiopatskom sindromu koji najčešće zahvaća žene u dobi između 20 i 50 godina, ali se također pojavljuje i kod muškaraca te kod žena ostalih dobnih skupina. Najznačajniji simptom fibromialgije jest alodinija. Alodinija je stanje kronične boli koja mijenja intenzitet i lokaciju. Uz alodiniju, prisutni su simptomi poput poremećaja spavanja, anksioznosti, umora, glavobolje i dr. Etiologija fibromialgije još uvijek nije u potpunosti rasvijetljena. Samo dijagnosticiranje fibromialgije popraćeno je poteškoćama zbog nedostatka specifičnih pokazatelja bolesti.

E-selektin je molekula koja pripada obitelji selektina. Poznata je još kao kao CD62 pripadnik obitelji selektina te kao endotelna-leukocitna adhezijska molekula 1 (ELAM-1) ili leukocitna endotelna stanična adhezijska molekula 2 (LECAM-2). Ova se adhezijska molekula eksprimira pod utjecajem citokina, IL-1, imunosnih kompleksa, kisikovih radikala i dr. Najvažnija funkcija E-selektina je aktivacija stanica imunosnoga sustava, T-limfocita i trombocita.

Cilj diplomskoga rada bio je utvrditi značajnost serumske koncentracije E-selektina za dijagnostiku fibromialgije. U tu svrhu određene su koncentracije E-selektina u uzorcima seruma dviju skupina, kontrolne skupine, koju su činili zdravi dobrovoljci, i skupine osobe oboljelih od fibromialgije.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitanici i uzorci

Istraživanje provedeno u okviru izrade ovoga diplomskoga rada obuhvatilo je dvije skupine ispitanika, skupina pacijenata kojima je dijagnosticirana fibromialgija (26 ispitanika), te kontrolna skupina koju su činili zdravi dobrovoljci (31 ispitanik). Svi su ispitanici ženskoga spola. Uzorci seruma od navedenih skupina korišteni su za određivanje koncentracije E-selektina. Serumi su prikupljeni i stavljeni na raspolaganje od strane dr. sc. Mario D. Cordera (Universidad de Sevilla, Research Laboratory, Oral Medicine Deparment, Španjolska).

3.2. Metoda

Za mjerenje koncentracije E-selektina korišten je komercijalno dostupan ELISA (engl. enzyme-linked immunosorbent assay) test komplet (Human E-selectin ELISA Kit, AbbexaLtd., Cambridge, UK). ELISA je posredna imunokemijska metoda koja kombinira specifičnost reakcije antigen-antitijelo i osjetljivost jednostavne enzimske reakcije, što ovoj tehnici osigurava visoku osjetljivost i specifičnost (Dodig, 2015).

Sama se metoda temelji na nastanku kompleksa antigen-protutijelo (protutijelo je vezano na površinu jažica mikrotitarske pločice). Nakon nastanka navedenoga kompleksa dodaju se sekundarna protutijela konjugirana s biotinom. U sljedećem koraku dodaje se kompleks avidina, biotina i peroksidaze (hrenova peroksidaza, HRP). Detekcijska reakcija jest enzimska reakcija potaknuta dodatkom tetrametilbenzidina (TMB), supstrata za HRP. Dolazi do nastanka obojenoga produkta, a intenzitet obojenja proporcionalan je koncentraciji E-selektina (Štraus i sur., 1997).

Postupak

Poliklonsko protutijelo anti-E-selektin imobilizirano je na mikrotitarskim pločicama. U jažice se dodaju slijepa proba (dva puta), otopine standarda (svaka koncentracija u duplikatu; 62.5, 125, 250, 500, 1000, 2000 i 4000 pg/ml) i uzorci (serum) te inkubiraju 90 minuta na 37°C.

Jažice se potom isperu puferom za ispiranje. Nakon toga dodaje se konjugat anti-E selektin-biotin i inkubira 60 minuta na 37°C. Nakon inkubacije jažice se ispiru puferom za ispiranje. Potom se dodaje ABC (avidin-biotin-HRP kompleks). Nakon inkubacije od 60 minuta na 37°C nevezani konjugati se isperu puferom za ispiranje. U završnoj fazi dodaje se TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin), supstrat za HRP, i inkubira 30 minuta u odsutnosti svjetla. HRP prevodi TMB u plavo obojeni produkt. U ovoj reakciji TMB služi kao donor vodika za redukciju H_2O_2 peroksidazom, a TMB se pri tome oksidira u 3,3',5,5'-tetrametilbenzidindiimin. U konačnici dodaje se otopina za zaustavljanje reakcije pri čemu dolazi do promjene plave boje u žutu čija se apsorbancija mjeri kod 450 nm. Intenzitet žute boje proporcionalan je koncentraciji E-selektina u uzorku. Izmjerene apsorbancije standardnih otopina služe za izradu baždarnoga dijagrama iz kojega se, potom, očitavaju koncentracije E-selektina u uzorcima seruma.

Aparati, pribor i kemikalije

Sva mjerenja izvršena su na spektrofotometru VICTOR^{3}Wallac 1420 multilabel counter, proizvođača PerkinElmer, Inc. (USA). Osim toga, korišten je termostat za mikrotitarske pločice s mogućnošću inkubiranja pri 37°C i miješanja, pipete i odgovarajući nastavci, epruvetice od 1.5 ml, pokrivač pločica, apsorpcijski filter papir i laboratorijske čaše.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Podaci o ispitanicima

Kako je navedeno u poglavlju 3. 1, u sklopu ovoga diplomskoga rada, koncentracije E-selektina određene su u dvije skupine ispitanika. Kontrolnu skupinu činili su zdravi dobrovoljci, a drugu skupine osobe oboljele od fibromialgije. Sve osobe uključene u ispitivanje bile su ženskoga spola. Podaci o ispitanicima koji se odnose na dob, spol, duljinu bolesti i broj osjetljivih točaka prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1. Podaci o ispitanicima I. dio

Kontrolna skupina				***Fibromialgija***				
Uzorak	Spol	Dob		*Uzorak*	*Spol*	*Dob*	*Broj osjetljivih točaka*	*Trajanje bolesti*
K1	Ž	51		*F1*	*Ž*	*41*	*16*	*17*
K2	Ž	55		*F2*	*Ž*	*63*	*18*	*12*
K3	Ž	54		*F3*	*Ž*	*53*	*15*	*12*
K4	Ž	43		*F4*	*Ž*	*28*	*14*	*6*
K5	Ž	56		*F5*	*Ž*	*53*	*12*	*3*
K6	Ž	55		*F6*	*Ž*	*56*	*13*	*31*
K8	Ž	58		*F8*	*Ž*	*61*	*18*	*22*
K9	Ž	54		*F9*	*Ž*	*46*	*11*	*20*
K10	Ž	44		*F11*	*Ž*	*47*	*16*	*6*
K11	Ž	54		*F12*	*Ž*	*58*	*11*	*12*
K12	Ž	44		*F15*	*Ž*	*64*	*11*	*32*
K13	Ž	52		*F16*	*Ž*	*44*	*12*	*4*
K14	Ž	53		*F17*	*Ž*	*30*	*13*	*11*
K15	Ž	44		*F20*	*Ž*	*50*	*11*	*11*
K16	Ž	53		*F21*	*Ž*	*56*	*18*	*32*
K17	Ž	45		*F22*	*Ž*	*31*	*18*	*2,5*

Tablica 1. Podaci o ispitanicima II. dio

Kontrolna skupina				***Fibromialgija***				
Uzorak	Spol	Dob		*Uzorak*	*Spol*	*Dob*	*Broj osjetljivih točaka*	*Trajanje bolesti*
K19	Ž	54		*F24*	*Ž*	*41*	*12*	*20*
K20	Ž	44		*F25*	*Ž*	*51*	*10*	*16*
K21	Ž	45		*F26*	*Ž*	*40*	*18*	*12*
K22	Ž	59		*F27*	*Ž*	*44*	*18*	*6*
K24	Ž	46		*F28*	*Ž*	*58*	*18*	*30*
K25	Ž	46		*F29*	*Ž*	*57*	*14*	*11*
K26	Ž	54		*F30*	*Ž*	*54*	*18*	*4*
K28	Ž	47		*F31*	*Ž*	*54*	*18*	*10*
K29	Ž	55		*F33*	*Ž*	*55*	*18*	*10*
K30	Ž	40		*F34*	*Ž*	*71*	*18*	*10*
K31	Ž	48						
K32	Ž	40						
K33	Ž	60						
K34	Ž	48						
K35	Ž	47						

Skupina ispitanika oboljelih od fibromialgije:

Broj ispitanika: 26

Dob (godine): 50,03 ±9.93

Broj osjetljivih točaka: 15,38 ± 2,87

Trajanje bolesti (godine): 14,96 ± 9,54

Kontrolna skupina (zdravi ispitanici):

Broj ispitanika: 31

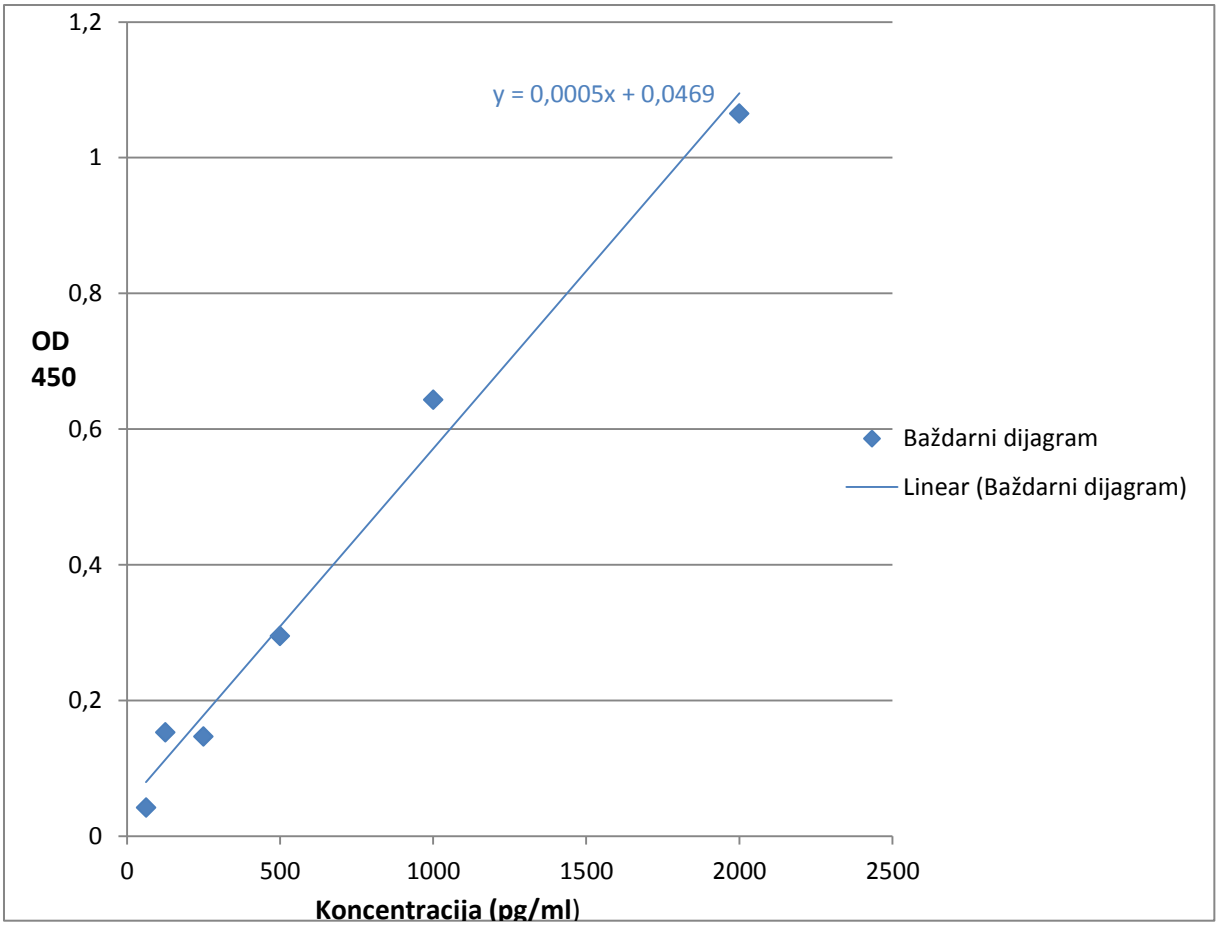
Dob (godine): 49,94 ± 5,66

4.2. Izrada baždarnog dijagrama

Za izradu baždarnoga dijagrama korištene su standardne otopine koncentracija 62.5, 125, 250, 500, 1000 i 2000 pg/ml E-selektina. Postupak je naveden u poglavlju 3.2.1. Nakon mjerenja apsorbancija standardnih otopina dobili smo rezultate prikazane u tablici 2.

Tablica 2. Podaci za izradu baždarnog dijagrama

Koncentracija (pg/ml) E-selektina	Apsorbancija
62,5	0,042
125	0,153
250	0,147
500	0,295
1000	0,643
2000	1,065
4000	1,634



Slika 3. Baždarni dijagram za E-selektin konstruiran prema izmjerenim apsorbancijama za standarde otopine sljedećih koncentracija: 62.5, 125, 250, 500, 1000, 2000 pg/ml

4.3. Utvrđivanje optimalnoga razrjeđenja seruma

Pool seruma korišten je za utvrđivanje optimalnoga razrjeđenja seruma za mjerenje E-selektina. U tu svrhu pripremljena su četiri razrjeđenja poola seruma: nerazrijeđeni pool seruma te razrijeđenja 1:2, 1:10 i 1:100 s odgovarajućim puferom iz test kompleta.

Naposljetku se na temelju izmjerenih apsorbancija za gore navedena razrjeđenja poola seruma iz baždarnoga dijagrama očitaju pripadne koncentracije. U Tablici 3. prikazane su aritmetičke sredine apsorbancija i koncentracija za serumska razrjeđenja.

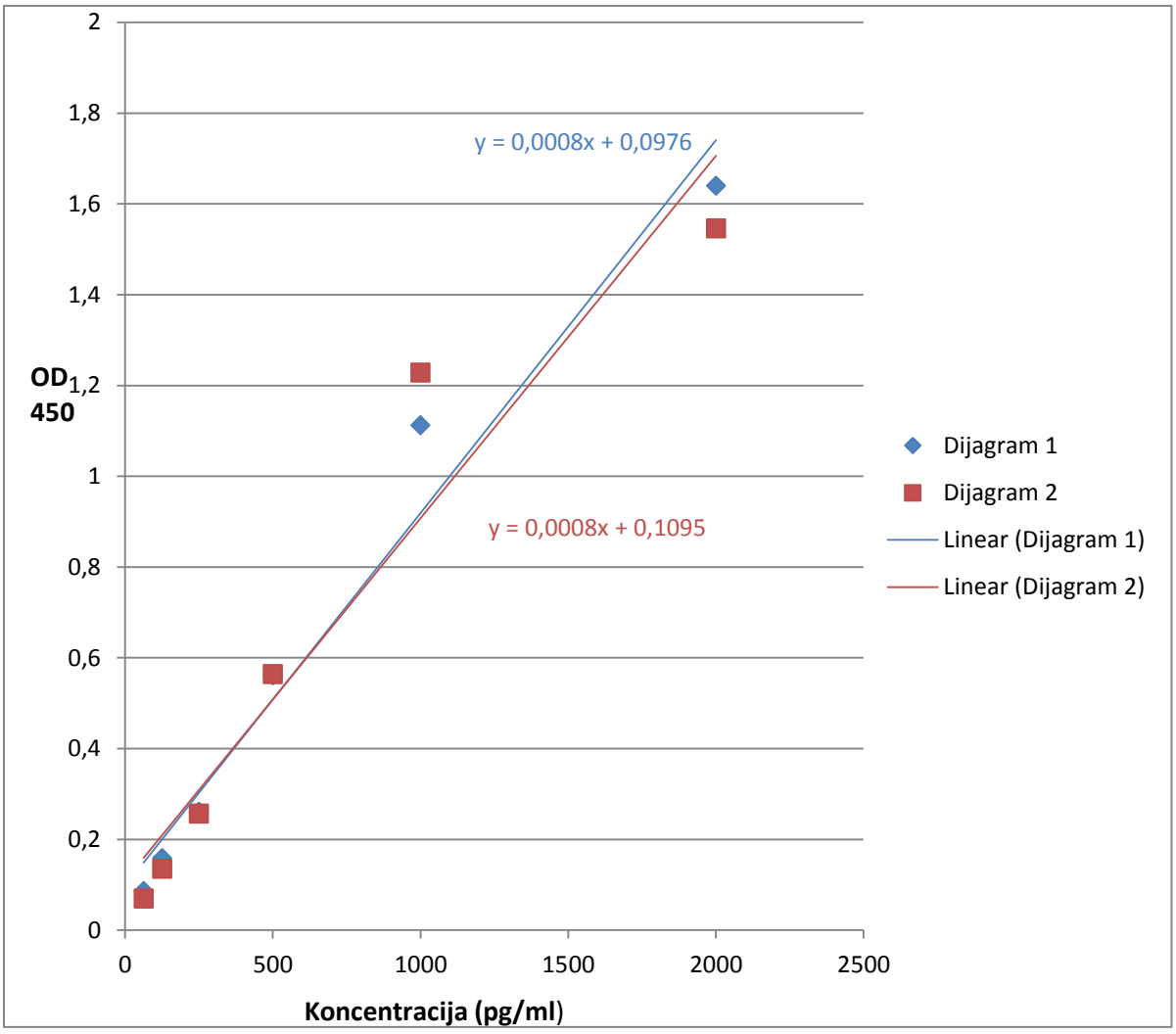
Tablica 3. Koncentracije otopina dobivenih iz baždarnog dijagrama

	Apsorbancija	**Koncentracija (pg/ml)**
pool seruma	0,821	1548,2
razrjeđenje 1:2	1,125	2156,2
razrjeđenje 1:10	0,827	1560,2
razrjeđenje 1:100	0,159	224,2

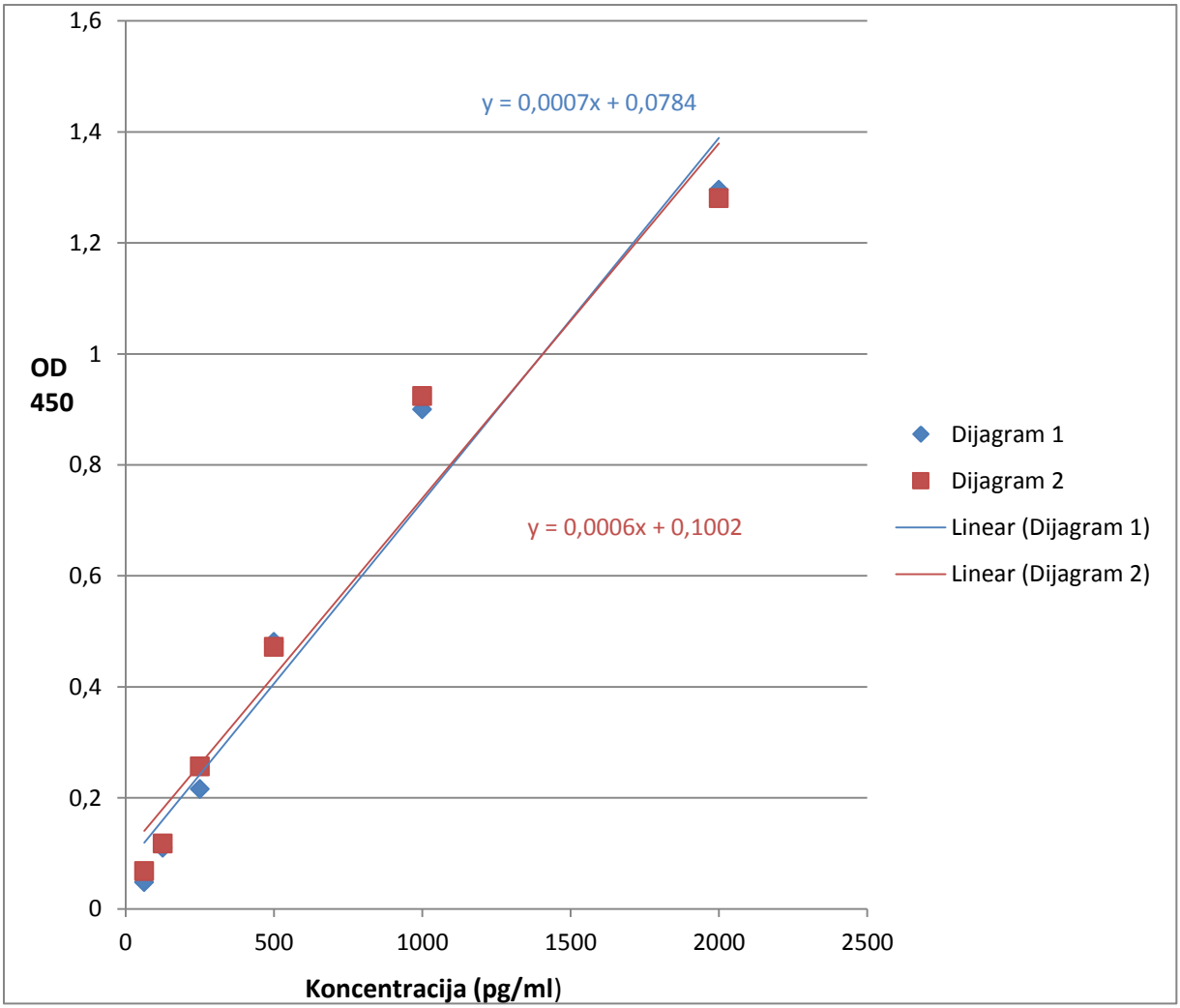
Prema dobivenim podacima u daljnjem radu korišteno je razrjeđenje uzoraka seruma 1:40.

4.4. Određivanje koncentracije E-selektina u uzorcima seruma ispitanika

Postupkom koji je opisan ranije (poglavlje 3.2.1) određene su koncentracije E-selektina u uzorcima seruma ispitanika. Za svaku skupinu mjerenja konstruiran je baždarni dijagram. Baždarni dijagrami prikazani su na na slikama 4. i 5.



Slika 4. Baždarni dijagram 1) ovisnost apsorbancije o koncentraciji E-selektina



Slika 5. Baždarni dijagram 2) ovisnosti apsorbancije o koncentraciji E-selektina

Iz odgovarajućih baždarnih dijagrama određene su koncentracije E-selektina u kontrolnim uzorcima i uzorcima pacijenata s fibromialgijom. S obzirom da su sva mjerenja izvedena u duplikatu u Tablici 4. (I i II dio) prikazane su srednje vrijednosti određenih koncentracija E-selektina.

Tablica 4. Koncentracije E-selektina u kontrolnim uzorcima (zdravi ispitanici) i osoba oboljelih od fibromialgije I.dio

Kontrolna skupina		***Fibromialgija***	
Uzorak	Koncentracija E-selektina (pg/ml)	*Uzorak*	*Koncentracija E-selektina (pg/ml)*
K1	27922,5	*F1*	*16522,5*
K2	55722,5	*F2*	*15672,5*
K3	49397,5	*F3*	*16070*
K4	12822,5	*F4*	*25047,5*
K5	15447,5	*F5*	*12872,5*
K6	31472,5	*F6*	*18072,5*
K8	22522,5	*F8*	*11025*
K9	13472,5	*F9*	*42497,5*
K10	40297,5	*F11*	*26247,5*
K11	4947,5	*F12*	*11825*
K12	30220	*F15*	*15425*
K13	16072,5	*F16*	*16377,14*
K14	8470	*F17*	*11124,765*
K15	16020	*F20*	*15567,62*
K16	14220	*F21*	*23837,46*
K17	29947,5	*F22*	*17291,43*
K19	46743,81	*F24*	*16034,29*
K20	14191,43	*F25*	*11748,57*
K21	3786,67	*F26*	*5315,235*
K22	34786,67	*F27*	*5177,145*
K24	17634,29	*F28*	*19810,48*

Tablica 4. Koncentracije E-selektina u kontrolnim uzorcima (zdravi ispitanici) i uzorcima osoba oboljelih od fibromialgije II.dio

Kontrolna skupina		***Fibromialgija***	
Uzorak	Koncentracija E-selektina (pg/ml)	*Uzorak*	*Koncentracija E-selektina (pg/ml)*
K25	5034,285	*F29*	*21115,235*
K26	40662,86	*F30*	*45977,14*
K28	7005,71	*F31*	*10439,05*
K29	18720	*F33*	*17286,665*
K30	23986,665	*F34*	*41462,86*
K31	27177,14		
K32	20091,43		
K33	16786,665		
K34	60062,855		
K35	28458,095		

Medijan koncentracija E-selektina u uzorcima dobivenim od zdravih osoba iznosi 20091,43 pg/ml. S druge strane, medijan koncentracija E-selektina kod osoba koje su oboljele od fibromialgije je niži i iznosi 16377,14 pg/ml (Tablica 5., Slika 6.).

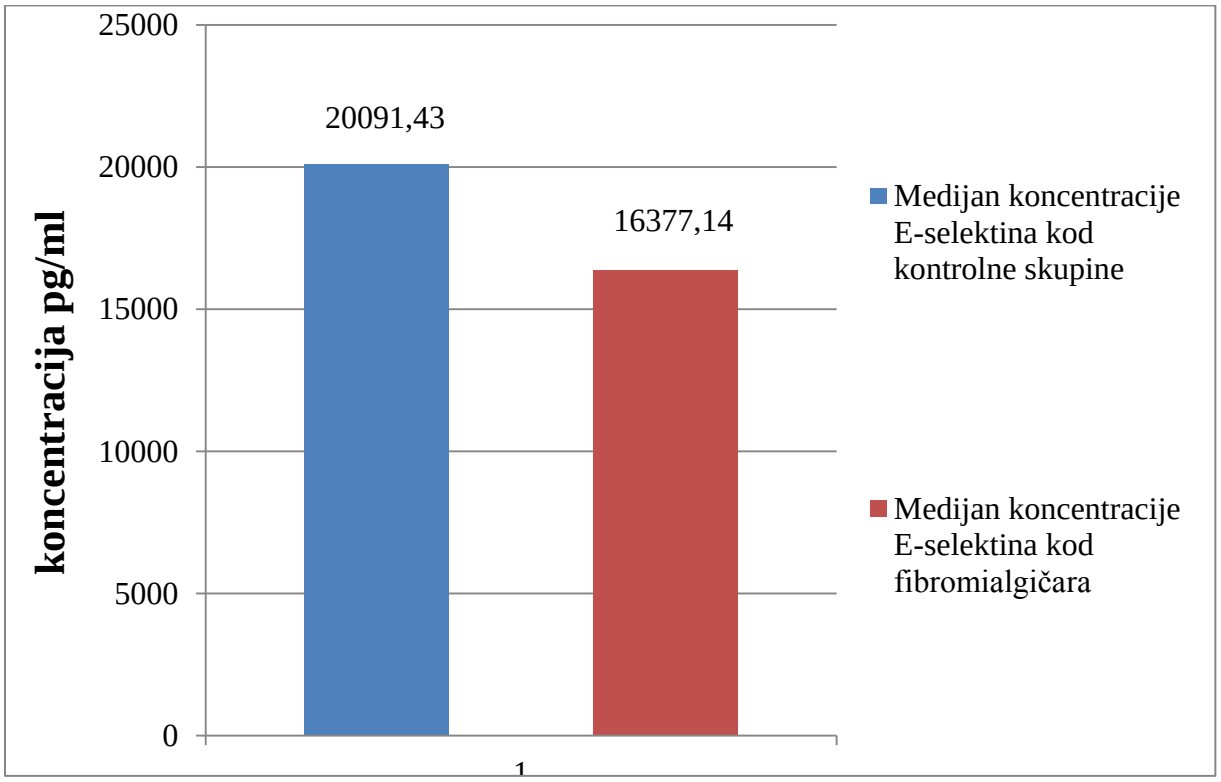
Dobiveni podaci podvrgnuti su statističkoj obradi. Za usporedbu koncentracija dviju ispitivanih skupina korišten je Mann-Whitney-ev neparametrijski test. Iako su koncentracije E-selektina kod pacijenata s fibromialgijom niže u odnosu na kontrolnu skupinu to sniženje nije statistički značajno (P=0,186).

Tablica 5. Rezultati statističke obrade podataka

	Medijan	25%	75%
Kontrolna skupina	20091,430	14198,573	31159,375
Uzorci pacijenata	16377,140	12086,875	21308,083

T=1071,000

P = 0,186



Slika 6. Grafički prikaz izmjerenih koncentracija E-selektina izraženih kao medijan

4.5. Rasprava

Cilj ovoga istraživanja bio je procijeniti relevantnost koncentracije E-selektina za dijagnostiku fibromialgije. U skladu s postavljenim ciljem izmjerene su koncentracije E-selektina u serumu pacijenata s fibromialgijom i kod zdravih dobrovoljaca. Nakon odgovarajuće statističke obrade rezultata dobiveni su podaci za medijan koncentracije E-selektina u kontrolnoj skupini te skupini pacijenata koji su oboljeli od fibromialgije. Kako je već navedeno, vrijednost medijana koncentracije E-selektina za kontrolnu skupinu iznosi 20091,43 pg/ml, a za ispitanike s fibromialgijom iznosi 16377,14 pg/ml. Iako pacijenti s fibromialgijom imaju niže serumske koncentracije E-selektina to sniženje nije statistički značajno, P=0,186.

Nekoliko istraživanja pokazalo je da kod osoba s fibromialgijom dolazi do povišenja koncentracije nekih adhezijskih molekula. Naime, kod osoba s depresijom primijećena je manja inhibicija adhezijskih molekula inducirana glukokortikoidima (Macedo i sur., 2007). Pretpostavlja se da se slično događa i kod fibromialgije, zbog često prisutne depresije kod oboljelih osoba. Osim toga, Macedo i suradnici utvrdili su da je kod osoba s fibromialgijom povišena koncentracija L-selektina (Macedo i sur., 2007). S obzirom da su L-selektin i E-selektin pripadnici iste proteinske obitelji te da je njihova ekspresija regulirana na sličan način, za očekivati je da su kod pacijenata s fibromialgijom povišene koncentracije E-selektina. Rezultati prikazani u ovom diplomskom radu ukazuju da koncentracije E-selektina kod pacijenata s fibromialgijom nisu povišene, upravo obrnuto, snižene su. Međutim, iz rezultata ovoga istraživanja ne proizlazi da je to sniženje koncentracije E-selektina kod pacijenata s fibromialgijom statistički značajno.

5. ZAKLJUČCI

U ovom diplomskom radu određene su koncentracije serumskoga E-selektina kod osoba oboljelih od fibromialgije i zdravih dobrovoljaca. Uspoređivanjem dobivenih podataka o serumskim koncentracijama E-selektina dviju ispitivanih skupina utvrđeno je da ne postoje statistički značajne razlike između njih.

Zaključci:

1. Medijan serumskih koncentracija E-selektina kod zdravih dobrovoljaca iznosi 20091,43 pg/ml;
2. Medijan serumskih koncentracija E-selektina kod osoba oboljelih od fibromialgije iznosi 16377,14 pg/ml;
3. Usporedba medijana dviju ispitivanih skupina (Mann-Whitney-ev test) pokazuje da se koncentracije serumskoga E-selektina kod osoba s fibromialgijom i zdravih dobrovoljaca statistički značajno ne razlikuju, P=0,186;
4. Provedeno istraživanje pokazuje da se E-selektin ne bi mogao koristiti kao specifični biomarker za fibromialgiju.

6. LITERATURA

Alexiou D, Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Zbar A, Sekara E, Michail P, Rosenberg T, Diamantis T. Clinical significance of serum levels of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in gastric cancer patients. *Am J Gastroenterol*, 2003, 98, 478-485.

Alexiou D, Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Zbar A, Kremmyda A, Bramis I, Tsigris C. Serum levels of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 in colorectal cancer patients: Correlations with clinicopathological features, patient survival and tumour surgery. *Eur J Cancer*, 2001, 37, 2392-2397.

Anostario M Jr, Huang K. Modulation of E-selectin Structure/Function by Metal Ions. *J Biol Chem*. 1995, 270, 8138-8144.

Auvinen K, Jalkanen S, Salmi M. Expression and function of endothelial selectins during human development. *Immunology*, 2014, 143, 406-415.

Bellato E, Marini E, Castoldi F, Barbasetti N, Mattei L, Bonasia DE, Blonna D. Fibromyalgia syndrome: Etiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Pain Res Treat*, 2012, 2012.

Bradley LA. Pathophysiology of Fibromyalgia. *Am J Med*, 2009, 122, 22-30.

Budišin Vesna. Dijagnostički kriteriji, terapija i edukacija bolesnika s fibromialgijom. *Fiz Rehabil Med*, 2007, 21, 131-138.

Chakrabarty S, Zoorob R. Fibromyalgia. *Am Fam Physician*, 76, 2, 247-254.

Clauw DJ, Arnold LM, McCarberg BH. The science of fibromyalgia. *Mayo Clin Proc*, 2011, 86, 907-911.

Collins T, Williams A, Johnston GI, Kim J, Eddy R, Shows T, Gimbrone MA Jr, Bevilacqua MP. Structure and chromosomal location of the gene for endothelial-leukocyte adhesion molecule 1. *J Biol Chem*. 1991, 266, 2466-2473.

Dodig S. Imunokemija. Zagreb, Medicinska naklada, 2015.

Ernst B, Magnani JL. From carbohydrate leads to glycomimetic drugs. *Chem Biol*, 2014, 21, 16-31.

Funkcija E-selektina http://www.bio.davidson.edu, pristupljeno 18.3.2016.

Gakhar G, Navarro VN, Jurish M, Lee GY, Tagawa ST, Akhtar NH, Seandel M, Geng Y, Liu H, Bander NH, Giannakakou P, Christos PJ, King MR, Nanus. Circulating tumor cells from prostate cancer patients interact with E-selectin under physiologic blood flow. *Plos One*, 2013, 8, 12.

Graves BJ, Crowther R, Chandran C, Rumberger J, Li S, Huang KS, Presky DH, Familletti PC, Wolitzky BA, Burns DK. Insight into E-selectin/ligand interaction from the crystal structure and mutagenesis of the lec/EGF domains. *Nature*, 1994, 367, 532-538.

Harris RE, Sundgren PC, Craig AD, Kirshenbaum E, Sen A, Napadow V, Clauw DJ. Elevated insular glutamate in fibromyalgia is associated with experimental pain. *Atrhritis Rheum*, 2009, 60, 3146-3152.

Jung U, Norman KE, Scharffetter-Kochanek K, Beaudet AL, Ley K. Transit time of leukocytes rolling through venules controls cytokine- induced inflammatory cell recruitment in vivo. *J Clin Invest*, 1998, 102, 1526-1533.

Kawano S, Iyaguchi D, Okada C, Sasaki Y, Toyota E. Expression, purification, and refolding of active recombinant human E-selectin lectin and EGF domains in escherichia coli. *Protein J*, 2013, 32, 386-391.

Kunkel EJ, Ley K. Distinct phenotype of E-selectin-deficient mice: E-selectin is required for slow leukocyte rolling in vivo. *Circ Res*, 1996, 79, 1196-1204.

Laviola L, Orlando MR, Incalza MA, Caccioppoli C, Melchiorre M, Leonardini A, Cignarelli A, Tortosa F, Labarbuta R, Martemucci S, Pacelli C, Cocco T, Perrini S, Natalicchio A, Giorgino F. TNFa signals via p66Shcto induce E-selectin, promote leukocyte transmigration and enhance permeability in human endothelial cells. *Plos One*, 2013, 8(12).

Lee AG. Biomembranes; Receptor of cell adhesion and cellular recognition. Jai press inc, str. 191.

Ley K. The role of selectins in inflammation and disease. *Trends Mol Med*, 2003, 9, 263-268.

Ley K, Allietta M, Bullard DC, Morgan S. Importance of E-selectin for firm leukocyte adhesion in vivo. *Circ Res*, 1998, 83, 287-94.

Macedo JA, Hesse J, Turner JD, Ammerlaan W, Gierens A, Hellhammer DH, Muller CP. Adhesion molecules and cytokine expression in fibromyalgia patients: Increased L-selectin on monocytes and neutrophils. *J Neuroimmunol*, 2007, 188, 159-166.

Matsumoto K, Sera Y, Abe Y, Tominaga T, Horikami K, Hirao K, Ueki Y, Miyake S. High serum concentrations of soluble E-selectin correlate with obesity but not fat distribution in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*, 2002, 51, 932-934.

Neeck G. Neuroendocrine and hormonal perturbations and relations to the serotonergic system in fibromyalgia patients. *Scand J Rheumatol*, 2000, 29, 8-12.

Ponthieux A, Herbeth B, Droesch S, Haddy N, Lambert D, Visvikis S. Biological determinants of serum ICAM-1, E-selectin, P-selectin and L-selectin levels in healthy subjects: The Stanislas study. *Atherosclerosis*, 2004, 172, 299-308.

Revelle BM, Scott D, Beck PJ. Single Amino Acid Residues in the E- and P-selectin Epidermal Growth Factor Domains Can Determine Carbohydrate Binding Specificity. *J Biol Chem*, 1996, 271, 16160-16170.

Sato H, Usuda N, Kuroda M, Hashimoto S, Maruta M, Maeda K. Significance of serum concentrations of E-selectin and CA19-9 in the prognosis of colorectal cancer. *Jpn J Clin Oncol*, 2010, 40, 1073-1080.

Stisi S, Cazzola M, Buskila D, Spath M, Giamberardino MA, Sarzi-Puttini P, Arioli G, Alciati A, Leardini G, Gorla R, Marsico M, Ceccherelli F, Bazzichi L, Carignola R, Gracely RH, Salaffi F, Altomonte L, Atzeni F. Etiopathogenetic mechanisms of fibromyalgia syndrome. *Reumatismo*, 2008, 60, 25-35.

Štraus B, Stavljenić-Rukavina A, Plavšić F i suradnici. Analitičke tehnike u kliničkom laboratoriju, Medicinska naklada, Zagreb, 1997.

Tingshuang X, Wenai L, Jixian L, Chunfeng L, Xueqing B, Khamal KA, X W, Yong J, Xianlu Z. Lipid raft is required for PSGL-1 ligation induced HL-60 cell adhesion on ICAM-1. *Plos One*, 2013, 8, 12.

Tomašević-Todorović S, Pjević M, Bošković K. Fibromyalgia: Up to date aspects of patophysiology, diagnosis, and treatment. *Medicinski pregled*, 2010, 63, 507-511.

Vestweber D. The selectins: Initiators of leukocyte endothelial adhesion. Harwood academic publishers, 1997, str. 5-31.

Šimundić AM: Struktura i funkcija adhezijskih molekula; Uloga adhezijskih molekula u aterogenezi. *Biochem Med*, 2001, 11, 1-2.

Walzog B, Gaehtgens P. Adhesion Molecules: The Path to a New Understanding of Acute Inflammation. *News Physiol Sci*, 2000, 15, 107-113.

Wolfe F, Clauw DJ, Fitzcharles MA, Goldenberg DL, Katz RS, Mease P, Russell AS, Russell IJ, Winfield JB, Yunus MB. The American College of Rheumatology preliminary diagnostic criteria for fibromyalgia and measurement of symptom severity. *Arthrit Care Res*, 2010, 62, 600-61.

7. SAŽETAK / SUMMARY

7.1. Sažetak

Fibromialgija je česti, idiopatski, i kompleksni kronični sindrom koji je karakteriziran alodinijom. Češće obolijevaju žene u dobi 20-50 godina, ali se bolest javlja i kod muškaraca te žena ostalih dobnih skupina. Etiologija fibromialgije je nejasna. Brojna, istraživanja ukazuju na razne faktore koji utječu na nastanak samoga sindroma, poput: disfunkcije središnjega i autonomnoga živčanoga i imunosnoga sustava te genski i psihosocijalni utjecaji. Primarni simptom fibromialgije jest kronična bol na više mjesta na tijelu. Osim toga simptoma često su prisutni još umor, poremećaj spavanja, glavobolje, parestezija i dr. Trenutno ne postoje specifični pokazatelji fibromialgije. Iz tog razloga, fibromialgija se dijagnosticira pomoću ACR-ovih kriterija.

E-selektin je protein koji pripada obitelji selektina. Selektini vežu ugljikohidrate. E-selektin je glikoprotein koji se aktivira pod utjecajem citokina, IL-1, TNF-a i dr. E-selektin je uključen u aktivaciju stanica imunosnoga sustava, T-limfocita i trombocita. Nedostatak selektina može imati ozbiljne posljedice kod ljudi, poput primjerice sklonosti određenim bolestima te povećanoj vjerojatnosti recidiva bakterijskih infekcija. Razina E-selektina povećana je kod određenih patoloških stanja, posebice kod tumora i nekih upalnih bolesti. Neka istraživanja ukazuju da su koncentracije E-selektina kod osoba koje boluju od fibromialgije povišene.

Glavni cilj ovoga diplomskog rada bio je utvrditi značajnost koncetracije E-selektina za dijagnostiku fibromialgije. Metoda koja je korištena u ovom diplomskom radu je imunokemijska ELISA-metoda.

Dobiveni rezultati ukazuju da je koncentracija E-selektina u skupini oboljelih od fibromialgije niža u odnosu na skupinu zdravih dobrovoljaca. S obzirom da to sniženje nije statistički značajno može se zaključiti da se E-selektin ne bi mogao koristiti kao specifični biomarker za fibromialgiju.

7.2. Summary

Fibromyalgia is an idiopathic, common and complex chronic syndrome characterized by allodynia. It occurs more frequently in women aged 20-50 years, but also occurs in men. The etiology of fibromyalgia is unclear, but some studies have been indicated various factors that influence the occurrence of the syndrome, such as: dysfunctions of the central and autonomic nervous system, dysfunctions of the immune system and the genetic and psychosocial influences. The primary symptom of fibromyalgia is a chronic pain in several places at the body. Besides that, other symptoms include fatigue, sleep disturbances, headaches, paresthesia and others. Recently, fibromyalgia has been diagnosed by ACR criteria, because there is no laboratory or objective tests for its diagnosis.

E-selectin is a protein that belongs to selectin family of proteins. Selectins bind carbohydrates. E-selectin is a glycoprotein activated by cytokines, IL-1, TNF-a, etc. E-selectin is involved in activation of immune cells, T-lymphocytes, and platelets. Lack of selectins could have serious consequences, such as the tendency to certain diseases, and increased chance for recurrence of bacterial infections. The level of E-selectin is increased in certain pathological conditions, particularly in some types of carcinoma and some inflammatory diseases. There are studies that suggest the possibility of increased concentrations of E-selectin in people who suffer from fibromyalgia.

The main objective of this master thesis was to determine the significance of the concentration of E-selectin for the diagnosis of fibromyalgia. The method that was used in this thesis was ELISA method.

The results indicate that the concentration of E-selectin is not relevant for the diagnosis of fibromyalgia.

8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Dijagnostička značajnost topivoga E-selektina kod fibromialgije

Antonio Šare

SAŽETAK

Fibromialgija je česti, idiopatski, i kompleksni kronični sindrom koji je karakteriziran alodinijom. Češće obolijevaju žene u dobi 20-50 godina, ali se bolest javlja i kod muškaraca te žena ostalih dobnih skupina. Etiologija fibromialgije je nejasna. Brojna, istraživanja ukazuju na razne faktore koji utječu na nastanak samoga sindroma, poput: disfunkcije središnjega i autonomnoga živčanoga i imunosnoga sustava te genski i psihosocijalni utjecaji. Primarni simptom fibromialgije jest kronična bol na više mjesta na tijelu. Osim toga simptoma često su prisutni još umor, poremećaj spavanja, glavobolje, parestezija i dr. Trenutno specifični pokazatelji fibromialgije. Iz tog razloga, fibromialgija se dijagnosticira pomoću ACR-ovih kriterija. E-selektin je protein koji pripada obitelji selektina. Selektini vežu ugljikohidrate. E-selektin je glikoprotein koji se aktivira pod utjecajem citokina, IL-1, TNF-a i dr. E-selektin je uključen u aktivaciju stanica imunosnog sustava, T-limfocita i trombocita. Nedostatak selektina može imati ozbiljne posljedice kod ljudi, poput primjerice sklonosti određenim bolestima te povećanoj vjerojatnosti recidiva bakterijskih infekcija. Razina E-selektina povećana je kod određenih patoloških stanja, posebice kod tumora i nekih upalnih bolesti. Neka istraživanja ukazuju da su koncentracije E-selektina kod osoba koje boluju od fibromialgije povišene. Glavni cilj ovoga diplomskog rada bio je utvrditi značajnost koncetracije E-selektina za dijagnostiku fibromialgije. Metoda koja je korištena u ovom diplomskom radu je imunokemijska ELISA-metoda. Dobiveni rezultati ukazuju da je koncentracija E-selektina u skupini oboljelih od fibromialgije niže u odnosu na skupinu zdravih dobrovoljaca. S obzirom da to sniženje nije statistički značajno može se zaključiti da se E-selektin ne bi mogao koristiti kao specifični biomarker za fibromialgiju.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži:	44 stranica, 4 grafička prikaza, 5 tablica i 37 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.
Ključne riječi:	fibromialgija, E-selektin, ekspresija selektina, apsorbancija, imunokemijska ELISA-metoda, E-selektin kao biomarker, dijagnostika fibromialgije
Mentor:	**Dr. sc. Karmela Barišić**, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Ocjenjivači:	**Dr. sc. Karmela Barišić**, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.* **Dr. sc. József Petrik**, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.* **Dr. sc. Sandra Šupraha Goreta**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: svibanj 2016.

Basic documentation card

University of Zagrebu
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Medical Biochemistry and Haemmatology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Diagnostic significance of soluble E-selectin at fybromyalgia

Antonio Šare

SUMMARY

Fibromyalgia is an idiopathic, common and complex chronic syndrome characterized by allodynia. It occurs more frequently in women aged 20-50 years, but also occurs in men. The etiology of fibromyalgia is unclear, but some studies have been indicated various factors that influence the occurrence of the syndrome, such as: dysfunctions of the central and autonomic nervous system, dysfunctions of the immune system and the genetic and psychosocial influences. The primary symptom of fibromyalgia is a chronic pain in several places at the body. Besides that, other symptoms include fatigue, sleep disturbances, headaches, paresthesia and others. Recently, fibromyalgia has been diagnosed by ACR criteria, because there is no laboratory or objective tests for its diagnosis. E-selectin is a protein that belongs to selectin family of proteins. Selectins bind carbohydrates. E-selectin is a glycoprotein activated by cytokines, IL-1, TNF-a, etc. E-selectin is involved in activation of immune cells, T-lymphocytes, and platelets. Lack of selectins could have serious consequences, such as the tendency to certain diseases, and increased chance for recurrence of bacterial infections. The level of E-selectin is increased in certain pathological conditions, particularly in some types of carcinoma and some inflammatory diseases. There are studies that suggest the possibility of increased concentrations of E-selectin in people who suffer from fibromyalgia. The main objective of this master thesis was to determine the significance of the concentration of E-selectin for the diagnosis of fibromyalgia. The method that was used in this thesis was ELISA method. The results indicate that the concentration of E-selectin is not relevant for the diagnosis of fibromyalgia.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 44 pages, 4 figures, 5 tables and 37 references. Original is in Croatian language.

Keywords: fibromyalgia, E – selectin, expression of selectins, absorbance, ELISA immunochemical method, E-selectin as biomarker, diagnosis of fibromyalgia

Mentor: **Karmela Barišić**, **Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Karmela Barišić**, **Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

József Petrik, **Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Sandra Šupraha Goreta, **Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: May 2016.