

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“CAROL DAVILA” BUCUREȘTI**

**ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL MEDICINĂ**



**Rezumatul tezei de doctorat
Corelații hormonale și moleculare în psoriasis
vulgaris**

Conducător științific,

Prof. Univ. Dr. Călin Giurcăneanu

Doctorand,

Dr. Delia Botezatu

LISTA DE PUBLICAȚII

Articole publicate *in extenso* ca rezultat al cercetării doctorale

1. Botezatu D, Tovar M, Georgescu SR, Leahu OD, Curici A, Giurcăneanu C. Interplay between prolactin and pathogenesis of psoriasis vulgaris. MAEDICA – a Journal of Clinical Medicine, 2016; 11(3):232-240
2. Botezatu D, Tovar M, Georgescu SR, Curici A, Giurcăneanu C. Elevated serum prolactin levels as a marker of inflammation in psoriasis vulgaris – awakened issue. DermatoVenerol. 2018, 63(1):13-22
3. Botezatu D, Tovar M, Georgescu SR, Curici A, Giurcăneanu C. Treatment effects upon prolactin and soluble receptor of interleukin-2 in psoriatic patients. MAEDICA – a Journal of Clinical Medicine, 2018; 13(1):25-33

CUPRINS

LISTA ABREVIERILOR.....	4
INTRODUCERE.....	5

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

1. Aspecte generale în psoriazisul vulgar.....	7
1.1 Date epidemiologice, rolul geneticii.....	8
1.2 Etiopatogeneza	12
1.3 Diagnostic, aspecte clinice, histologice.....	23
1.3.1 Clasificare, manifestări clinice.. ..	23
1.3.2 Diagnosticul pozitiv în psoriazis	28
1.4 Opțiuni terapeutice	30
1.5 Evoluție, prognostic și complicații	37
2. Implicațiile sistemului neuro-imuno-endocrin în psoriazisul vulgar	39

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

3. Motivația alegerii temei	54
3.1 Scopul și obiectivele studiilor	54
4. Metodologie generală.....	55
5. Studiu I – Axul neuro-imuno-endocrin în psoriazis vulgar	57
5.1 Ipoteza de lucru	57
5.2 Material și metode.....	57
5.3 Rezultate	65
5.4 Concluzii	102
6. Studiu II– Impactul terapiei convenționale la pacienții cu psoriazis vulgar pe nivelul seric al prolactinei și al receptorului solubil al interleukinei 2	103
6.1 Ipoteza de lucru	103
6.2 Material si metode	103
6.3 Rezultate	105
6.4 Concluzii	141

7. Discuții	142
8. Limitele studiilor	145
9. Concluzii generale	146
10. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	147
LISTA TABELELOR	149
LISTA FIGURILOR	152
BIBLIOGRAFIE.....	155

Cuvinte cheie: psoriazis, prolactină, RsIL-2, ax neuro-imuno-endocrin cutanat

Stadiul actual al cunoașterii este structurat în două părți. Prima parte a acestuia sintetizează date generale din literatură de specialitate în ceea ce privește patologia psoriazică. Astfel, în această parte sunt sumarizate date epidemiologice, factori genetici implicați în etiopatogeneza psoriazisului vulgar, clasificarea formelor clinice, relevarea aspectului histopatologic, diagnosticul pozitiv, precum și evidențierea diagnosticelor diferențiale, opțiunile terapeutice disponibile în prezent, evoluția, complicațiile și impactul psiho-social în psoriazis vulgar. A doua parte din stadiul cunoașterii reliefează importantă axului neuro-imuno-endocrin la nivel cutanat, sumarizând date din literatură referitoare la aplicabilitatea acestuia în patologia cutanată, dar și puținele date privind rolul și utilitatea sistemului neuro-imuno-endocrin în psoriazis vulgar.

Aspectele prezentate în prima parte a lucrării constituie o bază justificativă pentru cele două studii care fac obiectul celei de-a doua părți a tezei, cea a contribuției personale.

Din acest punct de vedere am considerat că este important să abordez o temă de maximă actualitate, așa cum este psoriazisul vulgar și mai ales, a cerceta rolul sistemului neuro-imuno-endocrin în această dermatoză autoimună. Pornind de la datele existente, markeri biologici pentru diagnosticul și prognosticul psoriazisului vulgar, ne-ar fi utili în a-i stabili severitatea (nu doar din punct de vedere clinic) și a-i monitoriza răspunsul terapeutic. Principalele obiective ale celor două studii efectuate sunt: evidențierea axului neuro-imuno-endocrin în psoriazis vulgar; studierea particularităților hormonale și moleculare în psoriazis vulgar, analiza corelației între manifestările clinice, moleculare și hormonale, înainte și după inițierea terapiei sistemice și topice, precum și elaborarea unor strategii și măsuri pentru optimizarea procesului de diagnostic al acestuia și analiza impactului terapiei convenționale, în eventualitatea găsirii unui biomarker predictiv în psoriazis vulgaris.

În lucrarea de față mi-am propus descrierea la lotul ales, aspectele epidemiologice, clinice și biologice în psoriazis vulgar, reliefând particularitățile specifice din punct de vedere hormonal (nivelul seric al prolactinei) și molecular (nivelul seric al receptorului solubil al IL-2) asociate. Urmărirea biomarkerilor în dinamică, ce s-au modificat în psoriazis vulgar, s-a săvârșit prin două studii observaționale, prospective, nerandomizate: primul, cu măsurători independente (comparativ cu un lot selectat din populația generală) și al doilea, cu măsurători corelate, în care s-au urmărit, pe o perioadă de 12 săptămâni (3 luni) de tratament convențional, efectele produse la nivel clinic, biologic, psiho-emoțional, hormonal (nivelul seric al prolactinei) și molecular

(nivelul seric al receptorului solubil al IL-2). Prin urmare, cele două studii de tip prospectiv își propun îmbunătățirea diagnosticării clinice, biologice, cât și scăderea dificultăților și erorilor de diagnostic, dar mai ales cercetarea unor noi perspective terapeutice prin demonstrarea axului neuro-imuno-endocrin de la nivel cutanat în psoriazis vulgar.

Rezultatele studiilor vor completa cunoștințele referitoare la particularitățile patogenice din psoriazis vulgar și pot servi drept reper în abordarea și monitorizarea terapeutică din psoriazis vulgar.

Contribuția personală descrie la început ipoteza de lucru generală, obiectivele celor două studii și metodologia generală a acestora. Se menționează obținerea aprobării Comisiei de Etică a Universității de Medicină și Farmacie “Carol Davila”, București, precum și cea a consimțământului informat al subiecților incluși.

Primul studiu, observarea unui ax neuro-imuno-endocrin în psoriazis vulgar, urmărește ca obiectiv principal reliefaarea valorilor crescute ale prolactinei și ale receptorului unei interleukine de tip T helper 1 (IL-2) în lotul pacienților cu psoriazis vulgar, comparativ cu un lot martor, selectat din populația generală (toți subiecții au fost selectați conform criteriilor de includere și excludere întocmite pentru acest tip de cercetare, evidențiate printr-un tabel în teza de față). Primul lot (în număr de 21), format din pacienți nou diagnosticați cu psoriazis vulgar (diagnostic efectuat pe baza examenului clinic și confirmat prin buletin histopatologic), pentru care s-au urmărit incidența bolii, repartiția pe sexe și grupe de vârstă, examenul clinic la prezentarea la consultație, durata de evoluție a bolii până la prezentarea la medic, calcularea scorului clinic PASI, co-existența afectării unghiale și prezența artritei psoriazice, precum și utilizarea chestionarelor de tip DLQI, HAMA, HAMD pentru fiecare pacient în parte. Lotul al doilea (în număr de 20), format din indivizi sănătoși aleși din populația generală ce a constituit lotul martor al studiului. De asemenea, s-au utilizat chestionarele HAMA și HAMD pentru lotul martor.

În urma rezultatelor găsite privind analiza descriptivă, comparativă între cele două loturi putem concludiona prin:

- În primul studiu efectuat în România de genul acesta, nivelurile serice ale prolactinei sunt mai mari dovedite în lotul pacienților cu psoriazis vulgar prin comparație cu cele din lotul din populația generală și pot susține implicarea acesteia în patogeneza dermatozei psoriazice ($r=0.984$, $p<0.0001$);

- Analiza comparativă înalt semnificativ statistică a RsIL-2 ne sugerează rolul acestuia în patogeneză bolii autoimune, prin intermediul căii T helper 1 ($p < 0.0001$).
- Corelațiile clinice, psiho-emoționale cu nivelurile serice ale PRL și RsIL-2 comunicate în studiul nostru susțin, de asemenea, posibilitatea numirii unui ax între sistemul cutanat și neuro-imuno-endocrin în patogenia psoriazisului vulgar (RsIL-2-PRL - ρ Spearman=0.775, $p < 0.0001$; HAMD-PRL - r Pearson=0.520, $p < 0.01$).
- În concordanță cu rezultatele a numeroase studii epidemiologice recente, am arătat că psoriazisul, indiferent de severitate, se asociază cu o prevalență crescută a câtorva factori de risc tradiționali. Pacienții cu psoriazis incluși în studiu au avut un risc semnificativ mai mare de HTA și obezitate.

Al doilea studiu, impactul terapiei convenționale la pacienții cu psoriazis vulgar pe nivelul seric al prolactinei și al receptorului solubil al interleukinei 2 investighează posibila influență a terapiei tradiționale în psoriazis pe nivelurile serice ale prolactinei și ale RsIL-2. Pentru realizarea obiectivelor acestui studiu prospectiv, au fost selectați cei 21 de pacienți diagnosticați cu psoriazis vulgar din lotul A, al primului studiu, format din 11 bărbați și 10 femei cu această dermatoză cronică, ce au fost analizați la 3 luni de terapie convențională. Managementul terapeutic: fiecare pacient a primit tratament conform încadrării clinice după scorul PASI: 16 dintre pacienți au primit terapie mixtă (terapie topică cu dermatocorticoizi potenți și decapante cu acid salicilic și lactic în compoziție, asociată terapiei sistemice convenționale cu Metotrexat – 15mg, doză orală, săptămânală - 0.3mg/kgc/săptămână, divizată în 3 doze/2zile/săptămână în combinație cu Acid folic, 5mg/zi, 5 zile/săptămână); 3 dintre ei au primit doar terapie sistemică cu Metotrexat, refuzând terapia topică, iar doi dintre ei au primit terapie topică convențională.

În acest studiu, durata bolii a variat de la un an la 21 de ani, cu o medie de 8.04 ± 1.29 ani. În ceea ce privește istoricul familial, 2 pacienți din 21 au avut istoric pozitiv familial (9.52%). Ținând cont de scorul clinic PASI, 20 pacienți (95.23 %) au fost clasificați ca psoriazis sever, 13 dintre aceștia au devenit moderat și 6, formă ușoară după terapie, un pacient (4.76%) a fost încadrat ca psoriazis moderat și a devenit ușor; un pacient din grupul celor severi nu a mai venit la evaluarea post-tratament. Există o scădere semnificativă a scorului PASI după cele 12 săptămâni de tratament. Nivelul seric al PRL, înainte de inițierea tratamentului, în grupul pacienților cu PV a variat de la $184 \mu\text{UI/ml}$ la $636 \mu\text{UI/ml}$ ($452.00 \mu\text{UI/mL}$) cu o medie de $362.55 \pm 27.85 \mu\text{UI/ml}$ [324.23 la 440.86]. Post-tratament, nivelul seric al PRL a variat de la $100 \mu\text{UI/ml}$ la $305 \mu\text{UI/ml}$

(205.00 μ UI/ml) cu o medie de 133 ± 10.57 μ UI/ml [110.87 la 155.12], reducându-se semnificativ, în comparație cu valorile inițiale, $p < 0.00001$. Nivelul seric al RsIL-2 înainte de terapie în grupul pacienților cu PV a variat de la 311U/mL la 2766U/mL cu o medie de 710.05 ± 117.88 U/mL [463.31 la 956.78]. La evaluare, după cele 12 săptămâni de tratament, valorile RsIL-2 au variat de la 100U/mL până la 751U/mL, cu o medie de 268.60 ± 33.98 U/mL [197.46 la 339.73]. Și în această situație, s-a observat o scădere importantă a valorilor în urma terapiei instituite, $p < 0.00001$.

Teza de față prezintă o serie de aspecte importante referitoare la patologia psoriazică, analizând date epidemiologice, clinice, biologice (moleculare, hormonale), comorbidități și nu în ultimul rând, aspecte legate de percepția și impactul psihologic al pacientului asupra bolii. Rezultatele prezentate în cadrul celor două studii sunt originale, inovative, și pot fi ulterior extinse, pentru o reală relevanță în practica medicală curentă.

Discuții

Psoriazisul vulgar, prototip de boală inflamatorie cutanată, mediată Th-1, Th-17 și Th-22, este o dermatoză autoimună asociată cu inflamație sistemică, având ca rezultat, un risc crescut de comorbidități asociate (178).

Prolactina, un neuropeptid secretat de lobul anterior al glandei pituitare, a fost integrată în comunicarea neuro-endocrină-imună, multiconcentrată de-a lungul axului “creier-piele”, ce acționează ca modulator neuroendocrin, atât în proliferarea epidermică cutanată, cât și în sistemul imunitar al pielii. Este demonstrat faptul că prolactina sporește/augmentează răspunsurile pe căile T helper 1 și 17, rezultând de aici posibilul său rol în patogeniza psoriazisului (165). Stresul, atât un factor declanșator, cât și unul de exacerbare demonstrat în psoriazis vulgar, poate reprezenta o conexiune între prolactină și patogeniza acestei dermatoze autoimune. Dunna și Finlay au observat că, în timpul sarcinii, pacientele cu psoriazis vulgar, tind să fie stabile, iar post-partum, leziunile psoriazice se agravează. Aceasta a condus la presupunerea legăturii dintre hiperprolactinemia fiziologică asociată cu lactația și evoluția exacerbată a leziunilor psoriazice (157).

Această lucrare include rezultatele celor două studii în domeniul patologiei psoriazisului vulgar.

Profilul epidemiologic pe lotul cercetat în psoriazis vulgar, corespunde cu datele întâlnite în cadrul altor studii din literatura de specialitate. Distribuția pe grupele de vârstă a fost conform

cele de specialitate, potrivit căreia în psoriazis vulgar, debutul poate fi oricând în cursul vieții, cu două vârfuri frecvent-întâlnite, între 20-30 de ani și 50-60 de ani (1). În plus, în concordanță cu rezultatele a numeroase studii epidemiologice (77-80) am relevat că psoriazisul, indiferent de severitate, se asociază cu o prevalență crescută a obezității și a HTA.

Cele două studii efectuate și-au propus evidențierea unui posibil rol al prolactinei în patogeneza psoriazisului vulgar, respectiv potențialul rol al axului “creier-piele”, atât comparativ cu lot din populația generală, cât și în dinamică, la 12 săptămâni de la inițierea terapiei clasice sistemice și topice. Astfel, în urma rezultatelor și analizei statistice expuse, putem afirma existența unei asocieri între nivelurile crescute ale prolactinei cu PV, ce sunt direct proporționale cu severitatea clinică a acestuia, dar și cu asocierea inflamației sistemice de tipul artrită psoriazică. Mai mult, am evidențiat prezența și rolul receptorului solubil al IL-2 în psoriazis vulgar (studiul I) și co-relația sa cu activitatea bolii (studiul II). Nivelurile RsIL-2 s-au redus cu 50% în urma terapiei clasice în PV.

În ceea ce privește literatura de specialitate, sunt câteva studii despre RsIL-2 ca marker al severității și sublinierea rolului său în patogeneza psoriazisului vulgar. De Rie și colaboratorii au constatat că nivelurile serice ale RsIL-2 sunt corelate cu activitatea bolii la pacienții cu PV și relația sa directă cu scăderea activității bolii, sub terapia imunosupresiva (179). Duncan și colaboratorii au relevat scăderea direct proporțională a nivelurilor serice ale RsIL-2 după fototerapia PUVA (psoralen asociat fototerapiei cu ultraviolete A) și după terapia sistemică cu Ciclosporina, dar și faptul că nivelurile RsIL-2 nu s-au modificat post-fototerapie cu raze ultraviolete tip B (179, 180).

În cazul studiilor de față, corelațiile dintre prolactină și receptorul solubil al IL-2, înainte și după tratamentul clasic cu Metotrexat și terapiei topice, au fost semnificative din punct de vedere statistic, cu valoarea lui $p < 0.0001$, fapt ce întărește rolul PRL în patogeneza PV prin intermediul căii Th1.

Rezultatele studiilor de față sunt în concordanță cu cele ale lui Dilme-Carreras și colaboratorii (181), precum și cu cele ale lui El-Katheeb și colaboratorii (182) ce au susținut corelațiile între nivelurile serice ale PRL cu severitatea clinică a bolii, calculată prin scorul PASI, precum și răspunsul la terapia topica cu Tacalcitol, unguent, 1 aplicație/zi, timp de 6 săptămâni. De asemenea, El-Katheeb și colaboratorii au evidențiat prezența crescută a PRL la nivel local, lezional, dar și a nivelurile serice înalte ale acesteia(182). Regana și Millet au raportat trei cazuri de PV la paciente de sex feminin ce au dezvoltat prolactinom în evoluția bolii cutanate. Relația

pozitivă, directă, între prolactinom și severitatea clinică a bolii cutanate a fost demonstrată. Cele trei paciente au fost tratate cu Bromocriptină, cu normalizarea nivelului seric al PRL, dar și cu ameliorarea semnificativă clinică a PV. La întreruperea terapiei s-a observat exacerbarea PV (159).

Mai mult, în studiul II, am subliniat prin analize statistice, asocierea între nivelurile serice ale prolactinei, semnificativ mai ridicate în rândul pacienților cu PV ce au asociat artrită psoriazică. Husakova și colaboratorii au demonstrat, de asemenea, nivelurile crescute ale PRL prezente în grupul pacienților cu artrită psoriazică comparativ cu pacienții psoriazici, fără afectare sistemică, argument ce susține rolul de marker predictiv al PRL, al bolii articulare inflamatorii la pacienții cu PV(183). Corelațiile pozitive arătate sunt, cel mai probabil, legate de statusul inflamator cronic la pacientul cu PV. Mai mult, în sprijinul acestei ipoteze vine observația că, și nivelul seric al biomarkerilor inflamației, precum VSH, PCR (a fost inclus în calcularea scorului DAPSA) a fost mai mare la pacienții cu psoriazis comparativ cu martorii și a scăzut semnificativ post-tratament în cazul studiului nostru.

Girolomoni și colaboratorii au arătat că prolactina stimulează proliferarea keratinocitelor epidermice umane (184), precum și producția de VEGF în vitro, relevată de Garcia de la Torre și colab. (185) și că, astfel, PRL exercită activități proinflamatorii variate. Pentru a întări acest concept, prolactina poate contribui la dezvoltarea plăcilor psoriazice prin stimularea interferonului -gama, dar simultan poate inhiba funcțiile celulare supresoare T, fapt ce poate servi, de asemenea, pentru a facilita avansarea leziunilor psoriazice (165). După cum s-a menționat, PRL incită producerea anumitor chemokine în keratinocitele umane, facilitând infiltrarea celulelor Th1 în epiderm și susținând dezvoltarea plăcilor psoriazice. Mai mult, Kanda și Watanabe au observat că prin activarea STAT1, NF-kB și IRF-1, PRL intensifică transcripția și secreția indusă de IFN-gama ale chemokinelor cheie (CXCL9, CXCL10, CXCL11), promovând astfel infiltrarea de tip T helper 1 în leziuni psoriazice (177). Prin urmare, ciclosporina A (CsA) este un tratament eficient pentru psoriazis. Hiestand și colab. au arătat că PRL concurează cu CsA pentru un situs de legare comun pe limfocitele T și secreția de prolactină inversează, de asemenea, imunosupresia indusă de CsA (186). Neidhart și colab. au demonstrat că CsA inhibă inducerea mediată de PRL a decarboxilazei ornitinei și, de asemenea, că CsA și bromocriptina au efecte sinergice asupra bolilor autoimune (162). Prin urmare, această idee ar putea permite o terapie cu doză mică de CsA în psoriazis. Este posibil că diferențele dintre nivelurile PRL periferice cutanate și producția pituitară de PRL, să agraveze activitatea bolii la anumiți pacienți. Dintre medicamentele care reduc în prezent

prolactina, cel puțin s-a demonstrat că bromocriptina scade atât producția PRL periferică, cât și pe cea pituitară și poate reprezenta o terapie adjuvantă utilă la anumiți pacienți, în special la cei cu boală refractară (167). Recent, s-a demonstrat că PRL sporește inflamația și producerea de citokine Th1 și Th17 pe un model de șoarece, cu modificări cutanate psoriaziforme induse de imiquimod (187). PRL este totuși supra-exprimată în leziunile pielii psoriazice.

În ceea ce privește statusul psiho-emoțional la pacientul cu PV, am comunicat prin analize statistice, că testele psihometrice HAMA și HAMD au fost semnificativ ridicate la toți pacienții cu PV (față de cei din populația generală), au scăzut sugestiv după terapia instituită și a existat o corelație puternică, statistică, între HAMD și scorul PASI. Aceste rezultate sunt în concordanță cu cele publicate de Verhoeven și colaboratorii ce au găsit o relație importantă între stres și severitatea bolii psoriazice (188). Spre deosebire de acestea, Zachariae și colaboratorii au arătat că pacienții care răspund la stress diferă semnificativ de cei care nu răspund stresului. Cei care răspund la stres au avut tendința de a raporta o severitate mai mare (subiectivă) decât cei care nu au răspuns la acesta, chiar dacă măsurile clinice privind severitatea bolii (PASI) nu au variat între aceste două grupuri. S-a constatat, totuși, ca persoanele care au răspuns la stres au mai multe plăci de psoriazis pe zonele vizibile decât zonele care nu sunt vizibile (189). Astfel, am arătat că impactul terapeutic pe statusul psiho-emoțional, clinic și paraclinic a fost important, cu ameliorarea semnificativă a bolii în lotul studiat.

Concluzii generale

Analiza rezultatelor fiecărei etape ale studiilor personale privind spectrul corelațiilor epidemiologice, clinice, psiho-emoționale și biologice la pacientul cu psoriazis vulgaris a permis formarea următoarelor concluzii:

1. Profilul epidemiologic al pacientului cu PV pe lotul studiat corespunde cu datele din literatură. Repartiția pe grupe de vârstă a prezentat de asemenea, o distribuție ce susține datele din literatura de specialitate, la pacienții din lotul nostru a fost prezent un vârf frecvent-întâlnit, între 50-60 de ani.
2. În concordanță cu rezultatele a numeroase studii epidemiologice, am expus că psoriazisul, indiferent de severitate, se asociază cu o prevalență crescută a câtorva factori de risc tradiționali. Pacienții cu psoriazis incluși în primul studiu au avut un risc semnificativ mai mare de HTA și obezitate.

3. Nivelurile serice ale prolactinei sunt mai mari, dovedite în lotul pacienților cu psoriazis vulgar prin comparație cu cele din lotul din populația generală și pot susține implicarea acesteia în patogeneza dermatozei psoriazice.
4. Analiza comparativă înalt semnificativ statistică a RsIL-2 ne sugerează rolul acestuia în patogeneza bolii autoimune, prin intermediul căii T helper 1.
5. Corelațiile clinice, psiho-emoționale cu nivelurile serice ale PRL și RsIL-2 expuse în primul studiu susțin, de asemenea, numirea unui ax între sistemul cutanat și neuro-imuno-endocrin în patogenia psoriazisului vulgar.
6. Rezultatele celui de-al doilea studiu au decelat că nivelurile serice ale prolactinei au fost crescute la pacienții psoriazici, înainte de inițierea terapiei și s-au redus semnificativ după aceasta. O corelație pozitivă a fost găsită între scorul clinic PASI și nivelul de prolactină.
7. De asemenea, am comunicat că în psoriazis vulgar, nivelurile receptorului solubil ale IL-2 sunt important crescute, scad semnificativ după terapia clasică cu Metotrexat și sunt corelate cu ameliorarea clinică a scorului PASI.
8. Corelațiile între prolactină și receptorul solubil al IL-2, înainte și după tratament, au fost semnificative și pozitive din punct de vedere statistic, cu o valoare $p < 0.0001$, ceea ce accentuează rolul important și posibil al prolactinei în stimularea citokinelor de tip Th1 în psoriazis vulgar – axul “creier-piele”.
9. În cel de-al doilea studiu, am arătat că, rezultatele obținute sunt consistente cu ipotezele formulate la începutul studiului și că, nivelurile serice ale prolactinei au fost, într-adevăr, semnificativ mai mari la pacienții cu artrită psoriazică, față de cei ce nu au prezentat afectare sistemică.
10. În ceea ce privește statusul psiho-emoțional la pacientul cu PV, rezultatele obținute par a susține ipotezele anterioare, prin analize statistice, că testele psihometrice HAMA și HAMD au fost semnificativ ridicate la toți pacienții cu PV (față de cei din populația generală), au scăzut sugestiv după terapia instituită și a existat o corelație puternică, statistică, între HAMD și scorul PASI.
11. Impactul terapeutic pe statusul psiho-emoțional, clinic și paraclinic a fost important, cu scăderea tuturor parametrilor măsurați cu 50% din valorile inițiale.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Teza de față își validează originalitatea prin următoarele realizări:

1. Am colectat, centralizat și analizat pentru prima dată în România, date pe baza testelor psihometrice HAMA și HAMD efectuate la pacientul cu psoriazis vulgar.
2. Am raportat pentru prima dată în România, asocierea hiperprolactinemiei la pacientul cu psoriazis vulgar, direct proporțională cu severitatea clinică a bolii, măsurată prin scorul PASI.
3. Am raportat pentru prima dată în România, asocierea nivelurilor crescute ale receptorului solubil al interleukinei 2, la pacientul cu psoriazis vulgar, direct proporțională cu severitatea clinică a bolii, măsurată prin scorul PASI.
4. Am raportat pentru prima dată în România, corelațiile pozitive clinice, psiho-emoționale cu nivelurile serice ale PRL și RsIL-2 dovedite, atât înainte, cât și după terapia tradițională în PV, fapt ce contribuie la numirea unui ax între sistemul cutanat și neuro-imuno-endocrin în patogenia psoriazisului vulgar.
5. Am făcut un pas în direcția depistării unui posibil biomarker predictiv în PV, precum și în cercetarea unor noi perspective terapeutice, prin relevarea axului neuro-imuno-endocrin de la nivel cutanat în psoriazis vulgar.

**“CAROL DAVILA” UNIVERSITY OF MEDICINE
AND PHARMACY BUCHAREST**

DOCTORAL SCHOOL/ FIELD OF MEDICINE



PhD Thesis Summary
**Hormonal and molecular correlations in psoriasis
vulgaris**

Scientific Coordinator,
Prof. Univ. Dr. Călin Giurcăneanu

PhD Student,
Dr. Delia Botezatu

LIST OF PUBLICATIONS

Articles published *in extenso* from the PhD Thesis

1. Botezatu D, Tovar M, Georgescu SR, Leahu OD, Curici A, Giurcăneanu C. Interplay between prolactin and pathogenesis of psoriasis vulgaris. MAEDICA – a Journal of Clinical Medicine, 2016; 11(3):232-240
2. Botezatu D, Tovar M, Georgescu SR, Curici A, Giurcăneanu C. Elevated serum prolactin levels as a marker of inflammation in psoriasis vulgaris – awakened issue. DermatoVenerol. 2018, 63(1):13-22
3. Botezatu D, Tovar M, Georgescu SR, Curici A, Giurcăneanu C. Treatment effects upon prolactin and soluble receptor of interleukin-2 in psoriatic patients. MAEDICA – a Journal of Clinical Medicine, 2018; 13(1):25-33

CONTENTS

ABBREVIATIONS LIST.....	4
INTRODUCTION.....	5

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

1. General aspects in psoriasis vulgaris.....	7
1.1 Epidemiologic data, role of genetics.....	8
1.2 Etiopathogenesis	12
1.3 Diagnostic, clinical and histological aspects	23
1.3.1 Classification, clinical manifestations	23
1.3.2 Positive diagnosis in psoriasis	28
1.4 Therapeutic options	30
1.5 Evolution, prognostic and complications	37
2. Role of neuro-immune-endocrine system in psoriasis vulgaris	39

PERSONAL CONTRIBUTION

3. Background of the theme.....	54
3.1 Objectives of the studies.....	54
4. General Methodology.....	55
5. Study I – The axis neuro-immune-endocrine in psoriasis vulgaris.....	57
5.1 Overview - background and objectives.....	57
5.2 Materials and methods.....	57
5.3 Results.....	65
5.4 Conclusions.....	102
6. Study II – Treatment effects upon prolactin and soluble receptor of interleukin-2 in psoriatic patients	103
6.1 Overview - background and objectives.....	103
6.2 Materials and methods	103
6.3 Results	105
6.4 Conclusions.....	139

7. Discussions	140
8. Limitations of the study	143
9. General conclusions	144
10. Originality and innovative contributions of the thesis.....	145
TABLES LIST	147
FIGURES LIST	150
REFERENCES	153

Key words: psoriasis, prolactin, RsIL-2, “brain-skin” axis

The current state of knowledge is structured in two parts. The first part summarizes key data from literature about psoriasis pathology. It includes epidemiological data, genetic factors involved in the etiopathogenesis of psoriasis vulgaris, the classification of clinical forms, the histopathological appearance, the positive diagnosis as well as the emphasis of the differential diagnoses, the currently available therapeutic options, the evolution, complications and the psychosocial impact in psoriasis vulgaris. The second part of the knowledge stage highlights the role of neuro-immuno-endocrine shaft/axis on the cutaneous level, summarizing data from the literature about its applicability in cutaneous pathology, as well as the few data reported on the role and usefulness of the neuro-immuno-endocrine system in psoriasis vulgaris.

The information presented in the first part of the paper constitutes a justification for the two studies that are the subject of the second part of the thesis, that of the personal contribution. From this point of view, I consider it important to approach a theme of maximal interest, like psoriasis vulgaris, and moreover, to investigate the role of the neuro-immuno-endocrine system in this autoimmune dermatosis. Starting from existing data, biological markers for the diagnosis and prognosis of psoriasis would be useful to determine its severity (not only from a clinical point of view) and to monitor its therapeutic response. The main objectives of the two studies are: highlighting the neuro-immuno-endocrine axis in psoriasis vulgaris; the study of hormonal and molecular particularities in this dermatosis, analysis of the correlation between clinical, molecular and hormonal manifestations before and after the initiation of systemic and topical therapy, as well as elaboration of strategies and measures for optimizing its diagnosis process and analysis of the impact of conventional therapy in the event finding a possible predictive biomarker in psoriasis vulgaris.

In this paper, I proposed the description of the selected group, the epidemiological, clinical and biological aspects of psoriasis vulgaris, highlighting the specific hormonal (serum levels of prolactin) and molecular (serum levels of IL-2 receptor) modifications. The follow-up of biomarkers in dynamics, which was altered in this research, was done through two observational, prospective, non-randomized studies: the first one with independent measurements (compared to a selected group from the general population) and the second, with correlated measurements, in dynamic, in which a clinical, biological, psycho-emotional, hormonal (serum prolactin levels) and molecular effects (serum IL-2 receptor serum levels) were observed over a period of 12 weeks (3

months). The aim of the two prospective studies is to improve clinical and biological diagnosis, as well as the reduction of difficulties and errors, but furthermore, the research of new possible therapeutic perspectives by demonstrating the neuro-immune-endocrine system in psoriasis vulgaris.

The results of the studies will complete the knowledge of the psoriasis pathogenesis and may serve as a reference in its treatment and supervise.

The personal contribution describes the general work hypothesis, the objectives of the two studies and their general methodology. The approval of the Ethics Commission of the "Carol Davila" University of Medicine and Pharmacy in Bucharest, as well as the informed consent of the subjects included are mentioned.

The first study, the observation of a neuro-immuno-endocrine spindle in psoriasis vulgaris, aims to highlight the elevated levels of prolactin and the receptor of a T helper 1 (IL-2) interleukin in the group of psoriasis compared to a control group, selected from the general population (all subjects were selected according to inclusion and exclusion criteria for this type of research, highlighted in a table in this thesis). For the first group (21) of patients newly diagnosed with psoriasis vulgaris (diagnosis based on clinical examination and confirmed by histopathological bulletin) was measured the incidence of the disease, the distribution by sex and age groups, the clinical examination, the duration of disease progression until the physician presentation, the PASI clinical score, co-existence of nails disease and the presence of psoriatic arthritis. We used questionnaires of DLQI, HAMA, and HAMD for each individual patient. The second lot, control group of the study (20) was constituted of healthy individuals chosen from the general population. Also, HAMA and HAMD questionnaires were used for this one group.

Based on the results found on the descriptive, comparative analysis between the two groups we can conclude by:

- In the first study conducted in Romania of this type, serum levels of prolactin are higher in the group of patients with psoriasis vulgaris compared to those in the general population group and can support its involvement in the pathogenesis of psoriatic dermatitis ($r = 0.984$, $p < 0.0001$);
- The statistically significant comparative analysis of RsIL-2 suggests its role in the pathogenesis of this autoimmune disease through T helper 1 pathway ($p < 0.0001$).
- Clinical, psycho-emotional correlations with the serum levels of PRL and RsIL-2 reported in our study also support the possibility of a spindle between the cutaneous and neuro-immuno-endocrine

system in the pathogenesis of psoriasis (RsIL-2-PRL- = 0.775, $p < 0.0001$; HAMD-PRL- r Pearson = 0.520, $p < 0.01$).

- In line with the results of many recent epidemiological studies, we have shown that psoriasis, independent of its severity, is associated with an increased prevalence of some traditional risk factors. Patients with psoriasis included in this study had a significantly higher risk of arterial hypertension and obesity.

The second study, the impact of conventional therapy in patients with psoriasis vulgaris on serum levels of prolactin and soluble receptor of interleukin 2 investigates the possible influence of traditional psoriasis therapy on serum levels of prolactin and RsIL-2. To achieve the objectives of this prospective study, the 21 patients diagnosed with vulgar psoriasis from group A of the first study formed by 11 men and 10 women with this chronic dermatosis were selected for monitoring after 3 months of conventional therapy. Therapeutic management: each patient received treatment according to the PASI score: 16 of the patients received mixed therapy (topical therapy with potent dermatocorticoids and creams with scavengers like salicylic acid and lactic acid in the composition, associated with conventional systemic therapy with Methotrexate - 15mg, oral dose, weekly - 0.3mg / kg / week, divided into 3 doses / 2 days / week in combination with Folic Acid, 5mg / day, 5 days / week); 3 of them received only systemic therapy with Methotrexate, refusing topical therapy, and two of them received conventional topical therapy.

In this study, the duration of the disease varied from one year to 21 years, with an average of 8.04 ± 1.29 years. As far as family history is concerned, 2 patients out of 21 had a positive family history (9.52%). Taking into account the PASI clinical score, 20 patients (95.23%) were classified as severe psoriasis, 13 of them became moderate and 6 were mild after therapy, one patient (4.76%) was classified as moderate psoriasis and became mild; a patient in the severe group did not come to the post-treatment evaluation. There is a significant decrease in the PASI score after the 12 weeks of treatment. The PRL serum level in the PV patients ranged from 184 μ U / ml to 636 μ U / mL (452.00 μ UI / mL) before the initiation of treatment with an average of 362.55 ± 27.85 μ U / ml [324.23 at 440.86]. Post-treatment, serum PRL ranged from 100 μ U / ml to 305 μ U / ml (205.00 μ U / ml) with an average of 133 ± 10.57 μ U / ml [110.87 to 155.12], decreasing significantly, compared to initial values, $p < 0.00001$. The serum level of RsIL-2 prior to therapy in the PV patients ranged from 311U / mL to 2766U / mL with an average of 710.05 ± 117.88 U / mL [463.31 to 956.78]. On evaluation, after 12 weeks of treatment, RsIL-2 ranged from 100U /

mL to 75UU / mL, averaging $268.60 \pm 33.98\text{U} / \text{mL}$ [197.46 to 339.73]. And in this situation, there was a significant decrease in values following the established therapy, $p < 0.00001$.

This thesis presents a number of important aspects of psoriasis pathology, analyzing epidemiological, clinical, biological (molecular, hormonal) data, comorbidities and, last but not least, aspects related to the perception and psychological impact of the patient on the disease. The results presented in the two studies are original, innovative, and can then be extended, for real relevance in current medical practice.

Discussions

Psoriasis vulgaris, a Th-1, Th-17 and Th-22-mediated inflammatory cutaneous disease prototype, is an autoimmune dermatosis associated with systemic inflammation, resulting in an increased risk of associated co-morbidities (178).

Prolactin, a neuropeptide secreted by the anterior lobe of the pituitary gland, has been integrated into neuro-endocrine-immune, multi-center communication along the "brain-skin" axis, acting as neuroendocrine modulator, in both epidermal skin proliferation and the immune system of the skin. It is demonstrated that prolactin enhances/augments T helper 1 and 17 responses, resulting in its possible role in the pathogenesis of psoriasis (165). Stress, both a triggering factor and an exacerbation factor demonstrated in psoriasis vulgaris, may be a connection between prolactin and the pathogenesis of this autoimmune dermatosis. Dunna and Finlay have noticed that during pregnancy, patients with psoriasis tend to be stable, and post-partum, psoriatic lesions worsen. This led to the assumption of the possible link between the physiological hyperprolactinemia associated with lactation and the exacerbated evolution of psoriatic lesions (157).

This paper includes the results of the two studies in the field of psoriasis vulgaris.

The epidemiological profile of the group investigated in psoriasis corresponds to the dates found in the other studies in the literature. The age distribution was according to the specialty, according to which in psoriasis vulgaris, onset may be at any time during life, with two commonly encountered peaks between 20-30 years and 50-60 years (1). In addition, consistent with the results of numerous epidemiological studies (77-80), we have found that psoriasis, irrespective of severity, is associated with an increased prevalence of obesity and HTA.

The two studies have highlighted the possible role of prolactin in the pathogenesis of psoriasis vulgaris, respectively the potential role of the brain-skin axis, both in comparison to the batch of the general population and in dynamic, 12 weeks after initiation of classical systemic and topical therapy. Thus, based on the results and statistical analysis, we can state the association between elevated levels of prolactin with PV, which are directly proportional to its clinical severity, but also with the association of psoriatic arthritis systemic inflammation. Furthermore, we highlighted the presence and role of the soluble IL-2 receptor in psoriasis vulgaris (study I) and its co-relationship to disease activity (study II). RsIL-2 levels were reduced by 50% following classical PV therapy.

Regarding the literature, there are some studies of RsIL-2 as a marker of severity and emphasizing its role in the pathogenesis of psoriasis vulgaris. De Rie et al. found that serum levels of RsIL-2 are correlated with disease activity in patients with PV and its direct relationship to decreased disease activity under immunosuppressive therapy (179). Duncan et al. reported a direct proportional decrease in serum levels of RsIL-2 after PUVA phototherapy (psoralen associated with ultraviolet A phototherapy) and after systemic therapy with Cyclosporine, but also the fact that RsIL-2 levels did not alter post-phototherapy with ultraviolet rays type B (179, 180).

In the present studies, the correlations between prolactin and the soluble IL-2 receptor before and after classical treatment with Methotrexate and topical therapy were statistically significant with $p < 0.0001$, which reinforces the role of PRL in PV pathogenesis via the Th1 pathway.

The results of these studies are consistent with those of Dilme-Carreras et al. (181), as well as those of El-Katheeb et al. (182) which supported correlations between serum levels of PRL with the clinical severity of the disease, calculated by the PASI score, and the response to topical therapy with Tacalcitol, ointment, 1 application/day for 6 weeks. El-Katheeb et al. also highlighted the increased presence of PRL at local, lesional levels, but also high serum levels (182). Regana and Millet reported three cases of PV in female patients who developed prolactinoma in the course of skin disease. The positive direct relationship between prolactinoma and the clinical severity of skin disease has been demonstrated. The three patients were treated with Bromocriptine, normalizing the serum levels of PRL, but also with clinically significant improvement in PV. Discontinuation of PV exacerbation (159) was observed.

Furthermore, in study II, we have underlined by statistical analysis the association between serum levels of prolactin, significantly higher among patients with PV associated with psoriatic arthritis. Husakova et al. also demonstrated the elevated levels of PRL present in psoriatic arthritis patients compared to psoriatic patients without systemic damage, an argument supporting the role of the PRL predictor marker, inflammatory joint disease in patients with PV (183). The positive correlations shown are most likely related to the chronic inflammatory status in the PV patient. Moreover, in support of this hypothesis is the observation that the serum level of inflammatory biomarkers, such as VSH, PCR (included in the calculation of DAPSA score) was higher in patients with psoriasis compared to controls and decreased significantly post-treatment in the case of our study.

Girolomoni et al. have shown that prolactin stimulates the proliferation of human epidermal keratinocytes (184) as well as the production of VEGF in vitro, as reported by Garcia de la Torre et al. (185) and that, therefore, the PRL has various pro-inflammatory activities. To reinforce this concept, prolactin may contribute to the development of psoriatic plaques by stimulating interferon-gamma, but can simultaneously inhibit T cell suppressor functions, which can also serve to facilitate psoriasis lesions (165). As mentioned, PRL induces the production of certain chemokines in human keratinocytes, facilitating the infiltration of Th1 cells into the epidermis and supporting the development of psoriatic plaques. Moreover, Kanda and Watanabe have observed that by activating STAT1, NF-kB and IRF-1, PRL enhances IFN-gamma-induced transcription and secretion of key chemokines (CXCL9, CXCL10, CXCL11), thus promoting T helper 1 infiltration in psoriatic lesions (177).

Therefore, cyclosporin A (CsA) is an effective treatment for psoriasis. Hiestand et al. showed that PRL competes with CsA for a common T lymphocyte binding site, and prolactin secretion also reverses CsA-induced immunosuppression (186). Neidhart et al. have demonstrated that CsA inhibits PRL mediated induction of ornithine decarboxylase and also that CsA and bromocriptine have synergistic effects on autoimmune diseases (162).

As a consequence, this idea could allow low-dose CsA therapy in psoriasis. It is possible that the differences between PRL peripheral skin levels and pituitary production of PRLs aggravate the disease activity in some patients. Of the drugs currently reducing prolactin, at least bromocriptine has been shown to decrease both peripheral and pituitary PRL production and may be useful adjuvant therapy in some patients, particularly those with refractory disease (167).

Recently, PRLs have been shown to increase the inflammation and production of Th1 and Th17 cytokines in a mouse model, with imiquimod-induced psoriasiform skin changes (187). PRL is however over-expressed in psoriatic skin lesions.

Regarding the psycho-emotional status of the PV patient, I have communicated through statistical analysis that HAMA and HAMD psychometric tests were significantly elevated in all PV patients (compared to those in the general population), suggestively decreased after the established therapy and there was a strong statistical correlation between HAMD and the PASI score. These results are in line with those published by Verhoeven et al. who found an important relationship between stress and the severity of psoriatic disease (188). In contrast, Zachariae et al. showed that patients responding to stress differ significantly from those who do not respond to stress. Those responding to stress tended to report a higher (subjective) severity than those who did not respond to it, even if clinical disease severity measures (PASI) did not vary between these two groups. It has been found, however, that people who respond to stress have more psoriasis plaque on visible areas than areas that are not visible (189). Thus, we showed that the therapeutic impact on the psycho-emotional, clinical and paraclinic status was important, with the significant improvement of the disease in the studied group.

General Conclusions

The analysis of the results of each study on the spectrum of epidemiological, clinical, psycho-emotional and biological correlations in the psoriasis vulgaris paradigm allowed the following conclusions:

1. The epidemiological profile of the PV patient on the studied group corresponds to data exposed in the literature. The age-related group has a frequent peak between the ages of 50-60 years in the patients in our group.
2. In line with the results of numerous epidemiological studies, we have shown that psoriasis, independent of its severity, is associated with an increased prevalence of several traditional risk factors. Patients with psoriasis included in the first study had a significantly higher risk of hypertension and obesity.
3. Serum levels of prolactin are higher in the group of patients with psoriasis compared to those in the general population and may support its involvement in the pathogenesis of psoriatic dermatosis.

4. The highly statistically significant comparative analysis of RsIL-2 suggests its role in the pathogenesis of this autoimmune disease through the T helper 1 pathway.
5. Clinical, psycho-emotional correlations with serum levels of PRL and RsIL-2 exposed in the first study also support the role of a spindle between the skin and neuro-immuno-endocrine system in the pathogenesis of vulgar psoriasis.
6. The results of the second study revealed that serum levels of prolactin were increased in psoriatic patients before initiating therapy and significantly reduced afterwards. A positive correlation was found between the PASI clinical score and the prolactin level.
7. Also, we have reported that in psoriasis, soluble receptor of IL-2 levels are significantly elevated, decreases significantly after classical therapy with Methotrexate and are correlated with clinical improvement of PASI score.
8. The correlations between prolactin and the soluble receptor of IL-2 before and after treatment were significant and statistically positive with a p value of less than 0.0001, which emphasized the important and possible role of prolactin in stimulating Th 1 cytokines in psoriasis vulgaris - the "brain-skin" axis.
9. In the second study, we have shown that the results obtained are consistent with the hypotheses formulated at the beginning of the study and that serum levels of prolactin were indeed significantly higher in patients with psoriatic arthritis compared to those that did not show systemic damage.
10. Regarding the psycho-emotional status of the PV patient, the results seem to support the previous hypotheses, by statistical analysis, that the HAMA and HAMD psychometric tests were significantly elevated in all PV patients (compared to those in the general population) , decreased suggestively after the established therapy and there was a strong statistical correlation between HAMD and the PASI score.
11. The therapeutic impact on psycho-emotional, clinical and laboratory status was important, with all parameters measured dropped by 50% from baseline.

Originality and innovative contributions of the thesis

This thesis validates its originality through the following achievements:

1. I have collected, centralized and analyzed for the first time in Romania data based on HAMA and HAMD psychometric tests performed in patients with psoriasis vulgaris.

2. I have reported for the first time in Romania the association of hyperprolactinemia in the patient with psoriasis, directly proportional to the clinical severity of the disease, as measured by the PASI score.
3. I have reported for the first time in Romania the association of elevated levels of the soluble receptor of interleukin 2 in the patient with psoriasis vulgar, directly proportional to the clinical severity of the disease, as measured by the PASI score.
4. I have reported for the first time in Romania, the positive clinical, psycho-emotional correlations with proven serum levels of PRL and RsIL-2, both before and after traditional PV therapy, which contributes to the nomination of an axis between the skin and neuro-immuno-endocrine system in the pathogenesis of psoriasis vulgar.
5. I have taken a step towards finding a possible predictive biomarker in PV, as well as investigating new therapeutic perspectives by revealing the neuro-immune-endocrine axle in psoriasis vulgaris.