

# Folia Medica Lodziensia

tom 38 suplement 2  
2011

Folia Medica Lodziensia, 2011, 38/S2:5-260

## **OCENA ZJAWISK IMMUNOLOGICZNYCH I ENZYMATYCZNYCH W PATOGENEZIE WYBRANYCH PODNASKÓRKOWYCH CHOROÓB PĘCZERZOWYCH**

AGNIESZKA ŻEBROWSKA

Klinika Dermatologii i Wenerologii  
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

### **STRESZCZENIE**

Patogeneza podnaskórkowych chorób pęcherzowych o podłożu autoimmunologicznym, do których należą pemfigoid (ang. *bullous pemphigoid* - BP) i opryszczkowate zapalenie skóry (ang. *dermatitis herpetiformis* - DH, choroba Dühringa), związana jest z destrukcją elementów błony podstawnej, prowadzącą do rozwoju zmian pęcherzowych. Błona podstawna jest złożoną strukturą, której zadaniem jest utrzymanie integralności połączenia skórno-naskórkowego. Proces wiązania się przeciwciał skierowanych przeciwko autoantygenom w błonie podstawnej, aktywuje szereg procesów immunologicznych i enzymatycznych prowadzących do zniszczenia hemidesmosomów i włókien zakotwiczących. Mimo podobnego etapu początkowego: połączenia autoprzeciwciał z autoantygenami będącymi białkami wchodzącymi w skład struktur błony podstawnej, dalsze mechanizmy rozwoju choroby są odmienne. Różnice antygenów i aktywacja innych cytokin, chemokin i enzymów implikuje charakterystyczny obraz histopatologiczny, immunopatologiczny oraz wymaga innego postępowania terapeutycznego. W BP i DH wykazano wpływ zaburzeń ekspresji niektórych cytokin, zwłaszcza prozapalnych i składników dopełniacza, na rozwój nacieków zapalnych oraz formowanie pęcherzy podnaskórkowych. Zjawiska te są przyczyną aktywacji cząsteczek adhezyjnych i kolejnych mediatorów zapalnych, takich jak chemokiny i neuropeptydy oraz enzymów proteolitycznych. Najnowsze badania eksperymentalne wykazały również, że procesy te mogą aktywować czynniki prokoagulacyjne powodujące rozwój zakrzepów, będących najczęstszą przyczyną powikłań u chorych z BP.

Stąd też celem pracy było:

1. Określenie roli składników sieci cytokinowej, takich jak cząsteczki adhezyjne, chemokiny, neuropeptydy oraz markery aktywacji eozynofili i mastocytów w powstawaniu zmian skórnych w pemfigoidzie i opryszczkowatym zapaleniu skóry;
2. Określenie roli wybranych enzymów proteolitycznych: metaloproteinaz i adamalizin oraz ich tkankowych inhibitorów w procesie rozwoju pęcherzy podnaskórkowych;
3. Ocena aktywności czynników prokoagulacyjnych i wywołanej przez nie destrukcji błony podstawnej w pemfigoidzie i opryszczkowatym zapaleniu skóry;
4. Wskazanie parametrów układu krzepnięcia przydatnych w zapobieganiu powikłań leczenia u chorych na BP.

Grupę badaną stanowiło 61 osób, w tym: 27 pacjentów z BP (w wieku od 58 do 84 lat, średnio - 68,5) oraz 14 chorych na DH (w wieku od 18 do 70 lat, średnio - 49,8) w aktywnym okresie choroby. Grupę porównawczą stanowiło 20 osób zdrowych (w wieku od 50 do 80 lat, średnio - 71,6 dla chorych z BP oraz w wieku od 19 do 49 lat, średnio - 42 lata dla chorych z DH). Na wykonanie wszystkich badań uzyskano zgodę Komisji Etyki Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Do określenia ekspresji badanych adhezyn, chemokin i ich receptorów, neuropeptydów, metaloproteinaz i ich inhibitorów oraz adamalizin zastosowano metodę immunohistochemiczną z użyciem pierwotnych przeciwciał monoklonalnych:

1. adhezyny: anty- CD29 ( $\beta$ 1 rodzina), CD61 ( $\beta$ 3 rodzina), CD104 ( $\beta$ 4 rodzina), CD62E (E-selectin), CD62L (L-selectin) firmy Novocastra.
2. chemokiny i receptory dla chemokin: anty- eotaksyna, TARC, MCP-1, CCR-1, CXCR-1, CXCR-2 firmy R&D.
3. neuropeptydy: anty- Neurokinin B, Endothelin B Receptor, CGRP, CRF and Substance P firmy Abcam.
4. metaloproteinazy i ich inhibitory: anty- MMP1, MMP2, MMP9, MMP1, TIMP1, TIMP2, TIMP3 firmy Novocastra.
5. adamalizyny: anty- ADAM8, ADAM10, ADAM15, ADAM17 firmy R&D.
6. anty-TNF  $\alpha$  firmy R&D.
7. czynnik tkankowy: anty- TF firmy American Diagnostica Inc.

Istotnie zwiększoną ekspresję adamalizin ADAM8, ADAM10, ADAM15, ADAM17 w tkankach (ocenioną techniką immunohistochemii) potwierdzono metodą hybrydyzacji in situ i immunoblotu.

W celu określenia stężeń badanych białek w surowicy zastosowano metodę immunoenzymatyczną przy użyciu gotowych zestawów ELISA:

TARC, MCP-1, eotaksyna ELISA kit firmy R&D;

ECP ELISA Kit for Human firma Uscn Life Science;

PAF ELISA Kit for Human PAF firmy Uscn Life Science;

Tryptaza, ELISA Kit for Human Tryptase firmy Uscn Life Science;

Chymaza ELISA Kit for Human Chymase 1, Mast Cell firmy Uscn Life Science;

TNF $\alpha$  Human TNF $\alpha$  -ELISA Kit firmy Gen-Probe Diaclone;

IL-4 Human IL-4 ELISA Kit firmy Gen-Probe Diaclone;

Neurokinina B, Endotelina B, CGRP, Substancja P firmy R&D;

MMP1, MMP2, MMP9 i TIMP2 firmy Quantikine, R&D;

IMUBIND Tissue Factor ELISA Kit firmy American Diagnostica Inc.

Oznaczenia d-dimerów wykonywano za pomocą metody optycznej testem immunoturbidymetrycznym aparatem STA Compact (Roche Diagnostics). Oznaczenie stężenia fibrynogenu wykonano metodą chronometryczną Clauss'a, jak i metodą turbidymetryczną (podczas oznaczania parametrów koagulologicznych).

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej. Wyniki uznano za statystycznie znamienne przy wartościach  $p < 0,05$ .

Ekspresję cząsteczek adhezyjnych – E-selektyny i L-selektyny stwierdzono w komórkach śródbłonna i neutrofilach. L-selektyna obecna była też na limfocytach. Ocena półilościowa wykazała, że odczyn był słabszy w wycinkach skóry pobranych od chorych na BP, zaś silniejszy w wycinkach skóry pochodzących od chorych na DH. Wyniki analizy statystycznej wykazały znamienne różnice w nasileniu odczynu pomiędzy badanymi grupami (BP vs DH: E selektyna -  $p < 0,04$ , L selektyna -  $p < 0,006$ ). Ekspresja integryny  $\beta 3$  była dodatnia w skórze chorych na BP i DH i obejmowała komórki warstwy podstawnej naskórka lub też ogniskowo komórki pozostałych warstw naskórka. Ekspresję integryny  $\beta 4$  wykryto w hemidesmosomach zarówno w wycinkach pochodzących z grupy kontrolnej, jak też w wycinkach od chorych na BP i DH. Wyniki analizy statystycznej wykazały, że u chorych na DH ekspresja integryny  $\beta 3$  i  $\beta 4$  była znamienne większa niż u chorych na pemfigoid ( $p < 0,05$  i  $p < 0,03$ ). Ekspresja integryny  $\beta 4$  była słaba i regularna w skórze osób zdrowych, w przeciwieństwie do dużo silniejszej i nieregularnej ekspresji zlokalizowanej w dnie pęcherza zarówno w BP jak i DH.

Ekspresję jednej z badanych chemokin - eotaksyny stwierdzono w naskórku i w skupiskach komórek nacieku zapalnego pod naskórkiem. Ekspresja eotaksyny była znamienne wyższa u chorych na BP w stosunku do osób zdrowych, jak też u chorych na DH w stosunku do osób zdrowych (naciek –  $p < 0,02$ , keratynocyty –  $p < 0,03$ ).

U chorych na BP ekspresja chemokiny TARC (ang. *thymus and activation regulated chemokine*) była obecna w keratynocytach dolnych warstw naskórka w obrębie zmian chorobowych oraz w pojedynczych komórkach nacieku zapalnego zlokalizowanego pod naskórkiem. Ekspresja TARC była znamienne wyższa u chorych na BP w stosunku do osób zdrowych (naciek –  $p < 0,001$ , keratynocyty –  $p < 0,006$ ) oraz w zmianach skórnych w stosunku do skóry otoczenia w BP (naciek  $p < 0,009$  i keratynocyty  $p < 0,001$ ). W skrawkach pochodzących ze zmian skórnych w DH obserwowano w większości przypadków średnie nasilenie ekspresji TARC. U chorych na BP i DH w obrębie zmian chorobowych, jak i otoczenia zmian istotnie różniła się ekspresja TARC w keratynocytach ( $p < 0,05$ ). W grupie kontrolnej stwierdzono bardzo słabą, ogniskową ekspresję TARC w pojedynczych keratynocytach zlokalizowanych w dolnej warstwie naskórka.

Ekspresja chemokiny MCP-1 (ang. *monocyte chemoattractant protein-1*) była obecna w zmianach skórnych i w skórze otoczenia zmian u chorych na BP. W żadnym z wycinków pochodzących od osób z DH, a także u żadnej z osób z grupy kontrolnej nie stwierdzono ekspresji MCP-1.

Ekspresja receptora dla chemokin - CCR-1 w zmianach skórnych, jak

i w skórze otaczającej zmiany skórne u chorych na BP była słaba. Nie stwierdzono statystycznie znamiennej różnicy między ekspresją CCR-1 w zmianach skórnych a ekspresją w otoczeniu tych zmian w BP i DH.

Ekspresję receptora dla chemokin CXCR-1 wykazano w biopsjach ze zmian skórnych u chorych na BP. Ekspresja CXCR-1 była istotnie większa w zmianach skórnych w stosunku do skóry otoczenia w BP ( $p < 0,03$ ). We wszystkich przypadkach chorych na DH w zmianach chorobowych stwierdzono komórki z ekspresją CXCR-1. Ekspresja CXCR-1 była znamienne wyższa u chorych na DH w stosunku do osób zdrowych ( $p < 0,001$ ). Chorzy z DH wykazywali większą ekspresję CXCR-1 w wycinkach ze zmian chorobowych w porównaniu do chorych na BP ( $0,67 \pm 0,18$  vs.  $0,15 \pm 0,24$ ;  $p < 0,001$ ).

W zmianach skórnych u chorych na BP ekspresja receptora CXCR-2 była wykazana we wszystkich wycinkach i była istotnie większa w stosunku do skóry otoczenia w BP ( $p < 0,02$ ), jak również do ekspresji u osób zdrowych ( $p < 0,04$ ). We wszystkich wycinkach pobranych ze zmian skórnych u osób z DH była obecna ekspresja CXCR-2. U chorych na DH stwierdzono znacznie większą ekspresję CXCR-2 w zmianach skórnych w porównaniu do chorych na BP ( $1,1 \pm 0,87$  vs.  $0,31 \pm 0,24$ ,  $p < 0,001$ ). W żadnym z wycinków pochodzących z grupy kontrolnej nie wykryto ekspresji CCR-1, CXCR-1, CXCR-2.

Stężenie chemokiny MCP-1 w surowicy było statystycznie wyższe u chorych na BP ( $374,8 \pm 30,8$  pg/mL) w porównaniu do chorych na DH ( $282,2 \pm 21$  pg/mL;  $p < 0,05$ ), chociaż nie było statystycznie znamiennej różnicy w porównaniu do grupy kontrolnej. Stężenie ECP ( $66,92 \pm 28,39$  pg/mL) i PAF ( $29,87 \pm 13,69$  pg/mL) w surowicy były znamienne wyższe w BP niż u osób zdrowych i w DH ( $p < 0,05$ ). Stężenie chymazy ( $0,21 \pm 0,98$  pg/mL) było znamienne wyższe u chorych z BP w porównaniu do grupy osób zdrowych i chorych na DH. Nie wykazano różnicy w stężeniach tryptazy, IL-4 i TNF $\alpha$  w grupach badanych.

Ekspresję TNF $\alpha$  wykazano w naciekach zapalnych, jak i keratynocytach oraz w płynie pęcherzowym chorych na BP i DH. Ekspresję TNF $\alpha$  stwierdzono także w skórze otaczającej zmiany. Analiza morfometryczna wykazała wyższą ekspresję TNF $\alpha$  w skórze chorobowo zmienionej w stosunku do skóry otoczenia zmian (BP  $1,59\pm 0,58$  vs.  $1,01\pm 0,43$ , DH  $1,39\pm 0,84$  vs.  $0,69\pm 0,59$ ), jak również w grupach badanych vs. grupa kontrolna ( $p < 0,01$ ).

W grupie kontrolnej nie wykazano ekspresji żadnej z badanych chemokin i ich receptorów.

Ekspresja neuropeptydu – kortykoliberyny (CRF, ang. *corticotrophin releasing factor*) była obecna w keratynocytach, komórkach gruczołów łojowych i potowych oraz komórkach nacieku zapalnego. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono znamienne większą ekspresję CRF w biopsjach pochodzących ze zmian, niż w biopsjach skóry pobranej z otoczenia i dotyczyło to zarówno osób z BP ( $1,58\pm 0,64$  vs.  $1,04\pm 0,48$ ,  $p < 0,001$ ), jak i z DH ( $1,36\pm 0,89$  vs.  $0,71\pm 0,61$ ,  $p < 0,05$ ). Najmniejszą ekspresję CRF wykazano u osób zdrowych ( $0,36\pm 0,15$ ).

Ekspresję receptora Endoteliny B stwierdzono w komórkach śródbłonna, mięśniówce naczyń oraz keratynocytach. Zjawisko wzmożonej ekspresji zaobserwowano dla receptora Endoteliny B u osób chorych na DH. Wartość ta była znamienne większa w zmianach skórnych niż w skórze otoczenia ( $1,24\pm 0,81$  vs.  $0,66\pm 0,43$ ,  $p < 0,04$ ). Nie stwierdzono różnicy w ekspresji receptora dla Endoteliny B w skórze otoczenia zmian u chorych na DH i w grupie kontrolnej ( $0,66\pm 0,43$  vs.  $0,58\pm 0,32$ ).

Ekspresję Substancji P, CGRP (ang. *calcitonin gene related peptide*) i neurokininy B wykazano w zakończeniach nerwowych w naskórku i skórze. Różnice w ekspresji tych neuropeptydów w badanych grupach nie były znamienne statystycznie.

Ekspresję metaloproteinaz - MMP1, 2, 9 i 10 (MMP, ang. *matrix metalloproteinase*) u chorych na BP stwierdzono zarówno w warstwie podstawnej, jak i całym naskórku oraz w płynie pęcherzowym, jak i naciekach zapalnych. W wycinkach z obecnym pęcherzem liniową ekspresję MMPs wykazano w jego dnie. U chorych na DH stwierdzono ekspresję MMPs w keratynocytach warstwy podstawnej we wszystkich wycinkach ze zmian skórnych, w większości biopsji była ona bardzo intensywna. Ekspresja MMPs nie była ograniczona wyłącznie do keratynocytów warstwy podstawnej, ale obecna była także w średnim natężeniu w keratynocytach pozostałych warstw naskórka. Ekspresję tych MMPs stwierdzono także w neutrofilach mikroropni i w płynie pęcherzowym.

W przeciwieństwie do metaloproteinaz, ekspresja ich inhibitorów - TIMPs (ang. *tissue inhibitor of metalloproteinases*) była średnio lub słabo nasiloną. Ekspresję TIMP1, 2, 3 u chorych na BP stwierdzono w całym naskórku. W przypadku obecności pęcherza była stwierdzana w jego dnie. Średnio nasiloną aktywność tych enzymów wykazano w naciekach zapalnych i w płynie pęcherzowym. Ekspresję TIMP1, 2, 3 o średnim natężeniu wykazano we wszystkich wycinkach w całym naskórku u chorych na DH, jak również w mikroropniach neutrofilowych.

W badanej surowicy chorych na DH i BP wartości stężeń MMP1, MMP2 i TIMP2 mieściły się w granicach normy. Pojedyncze wartości stężeń MMP9 były podwyższone u chorych z BP, u pozostałych osób z grup badanych były w normie. W grupie porównawczej nie stwierdzono w surowicy podwyższonych stężeń wyżej wymienionych enzymów.

Ekspresję adamalizyn - ADAM8, 10, 15 i 17 (ADAM, ang. *a disintegrin and metalloproteinases domain*) stwierdzono w komórkach warstwy podstawnej i w pozostałych warstwach naskórka, jak i skórze właściwej w BP i DH. Naciek eozynofilowo-neutrofilowy w zmianach skórnych u chorych na BP wykazywał średnie nasilenie ekspresji. Wykazano też ekspresję dla adamalizyn w mikroropniach i naciekach wokółnaczyniowych w DH. W grupie kontrolnej ekspresję ADAM8, 10, 15 i 17 stwierdzono jedynie w pojedynczych keratynocytach.

Analiza morfometryczna wykazała wyższą ekspresję ADAM8, 10, 15 i 17 w zmianach skórnych w porównaniu do skóry otoczenia zmian, w keratynocytach, nacieku zapalnym zarówno w grupie chorych na BP, jak i DH. Analiza morfometryczna wykazała ekspresję ADAM15 znacząco wyższą w zmianach skórnych w BP i skórze otaczającej zmiany w porównaniu do chorych na DH ( $p < 0,001$ ). W badaniu metodą immunoblotu stwierdzono znamienne wyższą ekspresję ADAM17 u chorych na BP w porównaniu do chorych na DH ( $p = 0,007$  i  $p = 0,007$  odpowiednio), jak i grupy kontrolnej ( $p = 0,007$  i  $p = 0,006$  odpowiednio). Wyniki badań immunohistochemicznych potwierdzono metodą hybrydyzacji *in situ*.

Ekspresję czynnika tkankowego (TF, ang. *tissue factor*) wykazano w komórkach nacieku zapalnego i keratynocytach oraz w płynie pęcherzowym u chorych na BP. Ekspresję TF stwierdzano także w skórze otaczającej zmiany. Analiza morfometryczna wykazała wyższą ekspresję TF w skórze chorobowo zmienionej w stosunku do skóry otoczenia zmian u chorych na BP ( $p < 0,02$ ). Badania u chorych na DH nie wykazały znaczącej ekspresji czynnika w tkankach chorobowo zmienionych, jak i pozornie zdrowych. TF był także stwierdzany w wycinkach od osób zdrowych. Ekspresja jednak w tej grupie była znamienne niższa niż w zmianach chorobowych w BP i porównywalna do zmian chorobowych w DH.

W grupie chorych na BP stężenie TF w surowicy wynosiło  $847,2 \pm 402,7$  pg/mL, u chorych na DH  $285,7 \pm 187,7$  pg/mL, a w grupie porównawczej dla BP -  $252,6 \pm 169,3$  pg/mL, a dla DH  $221,9 \pm 153,3$  pg/mL. Wyniki te wskazują na statystycznie istotną różnicę w zakresie wartości TF między grupą chorych na BP a DH i BP a grupą porównawczą ( $p < 0,001$ ).

U większości chorych na BP, przed rozpoczęciem leczenia, wartości d-dimerów mieściły się w górnych granicach normy i wynosiły średnio:  $0,49 \pm 0,40$   $\mu\text{g/mL}$  ( $0,33 - 2,9$   $\mu\text{g/mL}$ ). U siedmiu chorych wartości były podwyższone i mieściły się w zakresie między 1,2 a 2,9  $\mu\text{g/mL}$ . Wartości te były wyższe niż w grupie chorych na DH i grupie porównawczej. U wszystkich chorych na DH wartości d-dimerów odpowiadały normie i średnia ich wartość wynosiła  $0,31 \pm 0,19$   $\mu\text{g/mL}$  ( $0,26 - 0,36$   $\mu\text{g/mL}$ ). W grupie kontrolnej dla chorych na BP u jednej osoby stężenie d-dimerów przekroczyło wartości prawidłowe, u pozostałych odpowiadało normie -  $0,29 \pm 0,3$   $\mu\text{g/mL}$  ( $0,24 - 0,67$   $\mu\text{g/mL}$ ), w grupie porównawczej dla chorych na DH wszystkie wartości były w normie - średnio -  $0,34 \pm 0,6$   $\mu\text{g/mL}$ . Istnieją statystycznie istotne różnice między grupą chorych na BP a DH i BP a grupą porównawczą w zakresie wartości d-dimerów ( $p < 0,05$ ).

Przy normie stężenia fibrynogenu 2,0-5,0 g/L - średnie wartości tego parametru przedstawiały się następująco: u chorych na BP -  $4,50 \pm 0,18$  g/L, u chorych na DH -  $2,80 \pm 0,14$  g/L, w grupie porównawczej dla BP -  $2,60 \pm 0,3$  g/L a w grupie porównawczej dla DH -  $2,45 \pm 0,26$  g/L. Istnieją

statystycznie istotne różnice w wynikach między grupami chorych na BP i DH oraz między grupą chorych na BP a grupą porównawczą ( $p < 0,05$ ).

Uzyskane wyniki pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków:

1. Różnice w ekspresji cząsteczek adhezyjnych oraz chemokin i ich receptorów są przyczyną odmiennego składu nacieku zapalnego w opryszczkowatym zapaleniu skóry i pemfigoidzie, w którym szczególną rolę aktywującą czynnik tkankowy odgrywają eozynofile.
2. Wzrost ekspresji neuropeptydów jest jednym z czynników rozwoju neuroimmunologicznego zapalenia skóry i uwarunkowanego nim świądu w DH i BP.
3. Podwyższona aktywność metaloproteinaz i adamalizin jak i ich tkankowych inhibitorów oraz zaburzenie ich równowagi są przyczyną aktywacji cytokin oraz destrukcji tkanek w przebiegu BP i DH. Dane te stwarzają nowe perspektywy terapeutyczne BP i DH.
4. Wzrost ekspresji czynnika tkankowego w zmianach skórnych oraz surowicy u chorych na BP wskazuje na aktywację kaskady procesu koagulacji, a współistnienie podwyższenia stężenia d-dimerów i fibrynogenu, wskazuje na szczególną predyspozycję do powikłań zakrzepowozatorowych glikokortykosteroidoterapii.
5. Oznaczanie parametrów koagulologicznych powinno być standardem przed planowaną terapią glikokortykosteroidami u chorych na pemfigoid.

# THE ROLE OF SELECTED IMMUNE CELL POPULATIONS IN PLASMA EXCHANGE TREATMENT OF MULTIPLE SCLEROSIS RELAPSES

AGNIESZKA ŻEBROWSKA

## SUMMARY

The pathogenesis of subepidermal autoimmune blistering diseases, such as pemphigoid (BP, ang. *bullous pemphigoid*) and dermatitis herpetiformis (DH, ang. *dermatitis herpetiformis*, morbus Duhring) is connected with the destruction of basement membrane components and blister formation.

Ultrastructural studies confirmed the basement membrane zone as a structure responsible for the integrity of dermo-epidermal junction. The binding of autoantibodies in BMZ zone leads to the activation of immunological and enzymatic mechanisms leading to the destruction of hemidesmosomes and anchoring fibres.

Despite a similar initial stage: the connection of autoantibodies with autoantigens, which are the proteins of the basement membrane structures, the further development of the disease mechanisms is different. The Differences of antigens and the activation of other cytokines, chemokines and enzymes imply the characteristic histological immunological picture, and require a different therapy.

In BP and DH the impact of the disorders of certain cytokines expression, especially proinflammatory and complement components, on the development of inflammatory infiltrates and the formation of subepidermal blisters was shown. These phenomena are the cause of the activation of adhesion molecules and subsequent inflammatory mediators such as chemokines, neuropeptides and proteolytic enzymes. Recent experimental studies have also shown that these processes can activate procoagulant factors causing the development of blood thrombus, which is the most common cause of complications in patients with BP.

The goal of the study was:

1. The assessment of the role of cytokine network components, such as adhesion molecules, chemokines, neuropeptides, and markers of activation of eosinophils and mast cells in the formation of skin lesions in pemphigoid and dermatitis herpetiformis.
2. The assessment of the role of selected proteolytic enzymes: metalloproteinases, adamalysins and their tissue inhibitors in the development of subepidermal blisters.
3. The assessment of procoagulation factors activity and basement membrane destruction caused by them in pemphigoid and dermatitis herpetiformis.
4. The indication of coagulation parameters useful in the prevention of complications in therapy of BP patients.

The study included 61 persons: 27 untreated patients with BP (range: 58 to 84 years, average - 68,5) and 14 with DH (range: 18 to 70 years, average – 49,8) in an active stage of the disease. A Control group consisted of 20 healthy individuals (range:50 to 80 years, average – 71,6 for BP patients and ranged:19 to 49, average – 42 for DH patients).



All the study subjects gave their consent before entering the study and the study protocol was approved by The Local Ethical Committee of Medical University of Lodz.

Paraffin-embedded sections were used for routine staining and for immunohistochemistry to assess the expression of adhesion molecules, chemokines and their receptors, neuropeptides, metalloproteinases and their inhibitors and adamalysines. The following primary monoclonal antibodies were used:

1. adhesive molecules: anty- CD29 ( $\beta$ 1 family), CD61 (GPIII) ( $\beta$ 3 family), CD104 ( $\beta$ 4 family) CD 62E (E-selectin), CD62L (L-selectin) from Novocastra
2. chemokines and their receptors: anty- eotaksyna, TARC, MCP-1, CCR-1, CXCR-1, CXCR-2 from R&D.
3. neuropeptides: anty- Neurokinin B antibody, Endothelin B Receptor, CGRP, Corticotropin Releasing Factor and Substance P, from Abcam.
4. metalloproteinases: anty- MMP1, MMP2, MMP9, MMP1, TIMP1, TIMP2, TIMP3 from Novocastra.
5. adamalysins: anty- ADAM8, ADAM10, ADAM15, ADAM17 from R&D.
6. anty- TNF  $\alpha$  from R&D.
7. tissue factors: anty- TF from American Diagnostica Inc.

The Significantly increased expression of adamalysines: ADAM8, ADAM10, ADAM15, ADAM17 in the tissues (immunohistochemistry technique assessed) was confirmed by in situ hybridization and immunoblotting.

In order to determine the concentrations of the examined protein in the serum the enzyme-linked immunoassay method was used using ELISA kits:

TARC, MCP-1, eotaxin from R&D  
ECP – ELISA Kit for Human Ribonuclease A3 from Uscn Life Science;  
PAF ELISA Kit for Human Platelet Activating Factor (PAF from Uscn Life Science,  
Tryptaza, ELISA Kit for Human Tryptase) from Uscn Life Science,  
Chymaza ELISA Kit for Human Chymase 1 Mast Cell from Uscn Life Science,  
TNF $\alpha$  Human TNF $\alpha$  -ELISA Kit from Gen-Probe Diaclone,  
IL-4 Human IL-4 ELISA Kit from Gen-Probe Diaclone,  
Neurokinin B, Endotelin B, CGRP, Substance P ELISA kit from R&D,  
MMP1, MMP2, MMP9 i TIMP2 ELISA kit from Quantikine, R&D Systems,  
IMUBIND Tissue Factor ELISA Kit from American Diagnostica Inc.

The Indications of d-dimers were performed using the method of optical test apparatus Turbidity STA Compact (Roche Diagnostics). The Determination of the concentration of fibrinogen was performed using chrometric Clauss and Turbidity method (during the determination coagulation parameters). The results were statistically analyzed. The Results were considered statistically significant with  $p < 0.05$ .

The localization and expression of adhesive molecules: E- and L-selectins and  $\beta$ 1,  $\beta$ 3,  $\beta$ 4 integrins was studied by immunohistochemistry. The Expression of selectins was detected in the epithelium and skin leukocytes in all DH and BP samples. The expression of  $\beta$ 1,  $\beta$ 3 integrins was detected mainly

in basal keratinocytes as well as focally in the other layers of the epidermis. The expression of  $\beta 4$  integrin was irregular and detected mainly in the blister. In the control group only weak expression of the examined molecules was detected.

The expression of one of the chemokines: eotaxin was found in the epidermis and in the cells of inflammatory infiltrate in the epidermis.

The expression of eotaxin was significantly higher in the patients with BP compared to the healthy subjects, as well as in the patients with DH compared to the healthy subjects (infiltration -  $p < 0.02$ , keratinocytes -  $p < 0.03$ ).

In the patients with BP TARC (thymus and activation regulated chemokine) expression was present in keratinocytes of the lower layers of the epidermis around lesions in individual cells and the inflammatory infiltrate located in the epidermis. TARC expression was significantly higher in the patients with BP compared to the healthy subjects (infiltration -  $p < 0.001$ , keratinocytes -  $p < 0.006$ ) and skin lesions in relation to the perilesional skin in BP (infiltration  $p < 0.009$  and keratinocytes,  $p < 0.001$ ). In the biopsies from the skin lesions in DH the average intensity of expression TARC was observed in most cases. In keratinocytes within the lesions it differed significantly between the patients with expression of BP and DH ( $p < 0.05$ ), as well as in keratinocytes of the perilesional skin ( $p < 0.05$ ). In the control group there was very weak, focal expression of TARC of single keratinocytes located in the lower layer of the epidermis.

The expression of chemokine MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) was present in skin lesions and the perilesional skin in the patients with BP. There was no expression of MCP-1 in DH patients and the control group.

The expression of chemokine receptor: CCR-1 in skin lesions and the perilesional skin of the patients with BP was similarly weak. There was no statistically significant difference between the expression of CCR-1 in skin lesions and the perilesional skin in BP and DH.

The expression of receptor for chemokines CXCR-1 was present in the biopsies of skin lesions in the patients with BP. CXCR-1 expression was significantly higher in the skin lesions in relation to the perilesional skin in BP ( $p < 0.03$ ). In all the cases of patients with DH cells expressing CXCR-1 were found in lesions. CXCR-1 expression was significantly higher in the patients with DH compared to the healthy subjects ( $p < 0.001$ ). The Patients with DH showed higher expression of CXCR-1 in the biopsies of lesions compared to the patients with BP ( $0.67 \pm 0.18$  vs.  $0.15 \pm 0.24$ ,  $p < 0.001$ ).

In the skin lesions in BP patients, receptor for chemokines CXCR-2 expression was demonstrated in all specimens and was significantly higher compared to the perilesional skin in BP ( $p < 0.02$ ) as well as the expression in the healthy subjects ( $p < 0.04$ ). In the biopsies taken from the blisters in DH patients in all cases the expression of CXCR-2 was present. The Patients with DH showed significantly higher expression of CXCR-2 in skin lesions compared to the patients with BP ( $1.1 \pm 0.87$  vs.  $0.31 \pm 0.24$ ,  $p < 0.001$ ). There was no expression of CCR-1, CXCR-1, CXCR-2 in the control group. The concentrations of MCP-1 levels were statistically higher in the patients with BP ( $374.8 \pm 30.8$  pg/mL) compared to the patients with DH ( $282.2 \pm 21$  pg/mL,  $p < 0.05$ ), although there was no statistically significant difference in comparison to the control group. The concentration of ECP ( $283.9 \pm 66.92$  pg/mL) and PAF ( $136.9 \pm 29.87$  pg/mL) levels was significantly higher in BP than in the healthy subjects and the patients with DH ( $p < 0.05$ ). The Concentration of chymase

( $0.21 \pm 0.98$  pg/mL) was significantly higher in the patients with BP compared to the healthy subjects and the patients with DH. There was no difference in the concentrations of tryptase, IL-4 and TNF in the treatment groups.

The expression of TNF $\alpha$  was demonstrated in inflammatory infiltrates and keratinocytes and in blister liquid of BP and DH patients. The Expression of TNF $\alpha$  was also confirmed in the perilesional skin. Morphometric analysis showed a higher expression of TNF $\alpha$  in the skin lesions as amended in relation to the perilesional skin ( $1.59 \pm 0.58$  BP vs.  $1.01 \pm 0.43$ , DH  $1.39 \pm 0.84$  vs.  $0.69 \pm 0.59$ ) as well as in the control groups vs. the control group ( $p < 0.01$ ).

The expression of neither the examined chemokines nor their receptors was observed in the biopsies from the healthy people.

The expression of the neuropeptide: corticoliberin CRF (corticotrophin releasing factor) was present in keratinocytes, cells of the sebaceous glands and sweat glands, and the infiltration of inflammatory cells. The results had significantly higher expression of CRF in the biopsies derived from the skin lesions than in the skin biopsies taken from the perilesional skin, and this applied both to the individuals with BP ( $1.58 \pm 0.64$  vs.  $1.04 \pm 0.48$ ,  $p < 0.001$ ) and with the DH ( $1.36 \pm 0.89$  vs.  $0.71 \pm 0.61$ ,  $p < 0.05$ ). The lowest expression of CRF was demonstrated in the healthy subjects ( $0.36 \pm 0.15$ ).

The expression of endothelin receptor B was found in the endothelial cells, vascular muscle and keratinocytes. This phenomenon was observed for the increased expression of endothelin receptor B in the individuals with DH. This value was significantly higher in the skin lesions than in the perilesional skin ( $1.24 \pm 0.81$  vs.  $0.66 \pm 0.43$ ,  $p < 0.04$ ). There was no difference in the expression of endothelin B receptor in the perilesional skin in DH patients and the control group ( $0.66 \pm 0.43$  vs.  $0.58 \pm 0.32$ ). The Expression of Substance P, CGRP and neurokinin B was demonstrated in the nerve endings in the epidermis and the skin. The expression of these neuropeptides in the groups was not statistically significant.

The expression of metalloproteinases - MMP1, 2, 9 and 10 (MMP, matrix metalloproteinase) in patients with BP was found both in the basal layer and the whole epidermis and in the fluid blister and inflammatory infiltrates. In biopsies from the skin lesions with the blister the linear expression of MMPs has been shown in the bottom of the blister. In patients with DH MMPs expression was found in the basal layer of keratinocytes in all the biopsies from the lesion, in most biopsies it was very intense. The Expression of MMPs is not limited to the basal layer of keratinocytes, but was also present in medium intensity in the other layers of epidermal keratinocytes. The expression of these MMPs was also found in neutrophils, blister fluid and microabscesses. In contrast to the MMPs, the expression of their inhibitors - TIMPs (tissue inhibitor of matrix metalloproteinases) was moderately or poorly pronounced. The expression of TIMP1, 2, 3 in the patients with BP was found throughout the epidermis. In the presence of the blister it was ascertained at its bottom. Moderate activity of these enzymes was demonstrated in inflammatory infiltrates and blister fluid. The expression of TIMP1, 2, 3 of medium intensity in all specimens was demonstrated throughout the epidermis of the patients with DH, as well as in neutrophilic microabscesses.

In the studied serum of the patients with DH and BP the concentrations of MMP1, MMP2 and TIMP2 are within normal limits. Individual values of MMP9 concentrations were elevated in the patients with BP, in the remaining members of the studied groups they were normal. In the comparison group they were not elevated in the serum concentrations of these enzymes.

The expression of adamalysins: ADAM8, 10, 15 and 17 (ADAM, a disintegrin and metalloproteinases domain) was found in the cells of the basal layer and other layers of the epidermis and dermis in BP and DH. Eosinophilic and neutrophilic infiltration in the skin lesions of patients with BP showed a mean intensity expression. The Expression of ADAMs was also shown in perivascular influx and microabscesses in DH. The Expression of ADAM8, 10, 15 and 17 in the control group in all the biopsies was detected only in single keratinocytes. Morphometric analysis showed a higher expression of ADAM8, 10, 15 and 17 in the skin lesions compared to the perilesional skin in keratinocytes, inflammatory infiltration in both the group of patients with BP and DH. Morphometric analysis showed a significantly higher expression of ADAM15 in the skin lesions in BP and in the perilesional skin compared to the patients with DH ( $p < 0.001$ ). In a study by immunoblotting a significantly higher expression of ADAM17 was detected in the patients with BP compared to the patients with DH ( $p = 0.007$  and  $0.007$ , respectively) and the control group ( $p = 0.007$  and  $p = 0.006$  respectively). The Immunohistochemical study was confirmed by in situ hybridization.

The expression of tissue factor (TF, tissue factor) was demonstrated in the neutrophils in inflammatory infiltrates and keratinocytes and blisters fluid of the patients with BP. TF expression was also shown in the perilesional skin. Morphometric analysis showed a higher expression of TF in the skin lesions in comparison to the perilesional skin in the patients with BP ( $p < 0.02$ ).

The studies of the patients with DH showed no significant expression of the tissue factor in pathologically changed, and normal appearing skin. TF was also detected in the specimens from the healthy individuals. The Expression, however, in this group was significantly lower than in the lesions in BP and comparable to the lesions in DH.

In the group of the patients with BP serum TF concentration was  $847.2 \pm 402.7$  values, in the patients with DH  $285.7 \pm 187.7$  pg/mL, and the comparison group for BP -  $252.6 \pm 169.3$  pg/mL, and for DH  $221.9 \pm 153.3$  pg/mL. These results indicate a statistically significant difference in the TF values between the group of patients with BP and DH and BP and the control group ( $p < 0.001$ ).

The values of d-dimers in the group of patients with BP before the treatment, most patients were in the upper limits of normal and averaged:  $0.49 \pm 0.40$  mg/mL (0.33-2.9 mg/mL). In 7 patients the values were elevated and had a range between 1.2 and 2.9  $\mu$ g/mL. These values were higher than in the group of patients with DH and the comparison group. In all patients with DH values of d-dimers correspond to the standard dimers and their average value was  $0.31 \pm 0.19$  mg/mL (0.26-0.36 g/mL). In the control group for patients with BP in an individual d-dimer values exceeded the normal in the other corresponded to the standard  $0.29 \pm 0.3$  mg/mL (0.24-0.67 g/mL), the comparison group for all patients with DH values were normal - mean:  $0.34 \pm 0.6$  mg/mL. There is a statistically significant difference between the group of patients with BP and DH and BP and a group comparison of the value of d-dimers ( $p < 0.05$ ).

In the patients with BP the value of fibrinogen is an average  $4.50 \pm 0.18$  g/L at normal 2.0-5.0 g/L. The Patients with DH had a mean fibrinogen value  $2.80 \pm 0.14$  g/L in the control group for BP -  $2.60 \pm 0.3$  g/L and for DH -  $2.45 \pm 0.26$  g/L. There is a statistically significant difference between the group of patients with BP and DH and BP and the comparison group in the value of fibrinogen ( $p < 0.05$ ).

The obtained results allowed to formulate the following conclusions:

1. Differences in the expression of adhesion molecules and chemokines and their receptors are the cause of a different composition of the inflammatory infiltrate in dermatitis herpetiformis and pemphigoid, in which a special role is played by tissue factor activating eosinophiles.
2. Increase in expression of neuropeptides is one of the factors of development neuroimmunological inflammation and itching in the DH and BP.
3. The increased activity of metalloproteinases and adamalysines and their tissue inhibitors and their balance disorder is the cause of the activation of cytokines and tissue destruction in the course of BP and DH. These data offer new prospects for therapeutic BP and DH.
4. The increase in tissue factor expression in skin lesions and the serum of patients with BP indicates the activation of the coagulation cascade and the coexistence of elevated levels of d-dimer and fibrinogen, points to the particular predisposition to thromboembolic complications of glicocorticosteroids in therapy.
5. The determination of coagulation parameters should be the standard before the planned treatment with glicocorticosteroids in patients with pemphigoid.

## SPIS TREŚCI

<b>1. WSTĘP</b> .....	<b>13</b>
1.1. Patogeneza pemfigoidu i opryszczkowego zapalenia skóry .....	13
1.1.1. Pemfigoid pęcherzowy - <i>bullous pemphigoid</i> .....	13
1.1.2. Opryszczkowe zapalenie skóry - <i>dermatitis herpetiformis</i> .....	16
1.2. Funkcja błony podstawnej .....	22
1.3. Składniki błony podstawnej (BMZ) .....	23
1.3.1. Kompleks hemidesmosomalny ( <i>Hemidesmosomal adhesion complex</i> ) .....	23
1.3.2. Laminina 5 .....	25
1.3.3. Kolagen VII i XVII .....	26
1.3.4. Nidogen i kolagen IV .....	27
1.3.5. Integryny naskórkowe i Tenascyna-C .....	27
1.4. Rola wybranych cząsteczek adhezyjnych w patogenezie pemfigoidu pęcherzowego i opryszczkowego zapalenia skóry .....	28
1.5. Rola chemokin i ich receptorów oraz markerów aktywacji eozynofików i mastocytów w patogenezie pemfigoidu pęcherzowego i opryszczkowego zapalenia skóry .....	37
1.6. Udział neuropeptydów w patogenezie pemfigoidu pęcherzowego i opryszczkowego zapalenia skóry .....	43
1.7. Rola metaloproteinaz i ich receptorów w patogenezie pemfigoidu pęcherzowego i opryszczkowego zapalenia skóry .....	46
1.8. Rola adamalizyn w patogenezie pemfigoidu pęcherzowego i opryszczkowego zapalenia skóry .....	51
1.9. Rola czynników prokoagulacyjnych w patogenezie pemfigoidu pęcherzowego i opryszczkowego zapalenia skóry .....	56
1.9.1. Czynniki predysponujące do wystąpienia powikłań zakrzepowo-zatorowych w przebiegu pemfigoidu pęcherzowego .....	57
1.9.2. Wpływ zapalenia na układ krzepnięcia .....	57

A. Żebrowska

1.9.3.	Glikokortykosteroidy a układ homeostazy .....	60
1.9.4.	Powikłania zakrzepowo-zatorowe w przebiegu pemfigoidu pęcherzowego .....	61
<b>2.</b>	<b>ZAŁOŻENIA I CELE PRACY .....</b>	<b>63</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIAŁ I METODY .....</b>	<b>65</b>
3.1.	Materiał .....	65
3.1.1.	Charakterystyka kliniczna chorych .....	65
3.1.2.	Diagnostyka immunologiczna chorych na pemfigoid .....	66
3.1.3.	Diagnostyka immunologiczna chorych na opryszczkowe zapalenie skóry .....	67
3.2.	Metody .....	68
3.2.1.	Badania immunohistochemiczne ekspresji cząsteczek adhezyjnych .....	66
3.2.2.	Badania immunohistochemiczne i immunoenzymatyczne ekspresji wybranych chemokin i ich receptorów .....	69
3.2.3.	Badania markerów eozynofilów i mastocytów .....	70
3.2.4.	Badania immunohistochemiczne ekspresji neuropeptydów .....	71
3.2.5.	Badania immunohistochemiczne i immunoenzymatyczne ekspresji metaloproteinaz i ich inhibitorów .....	72
3.2.6.	Badania ekspresji adamalizyn .....	73
3.2.7.	Badania czynników prokoagulacyjnych .....	76
3.2.8.	Metoda badań ilościowych. Morfometria. Metody statystyczne .....	77
3.2.8.1.	Cząsteczki adhezyjne .....	77
3.2.8.2.	Chemokiny, receptory dla chemokin i markery aktywacji eozynofilów i mastocytów .....	78
3.2.8.3.	Neuropeptydy .....	79
3.2.8.4.	Metaloproteinazy i ich inhibitory .....	81
3.2.8.5.	Adamalizyny .....	81
3.2.8.6.	Czynniki prokoagulacyjne .....	83

## Spis treści

<b>4. WYNIKI</b>	<b>85</b>
4.1. Badanie histopatologiczne i immunologiczne metodą bezpośrednią i pośrednią w pemfigoidzie pęcherzowym i opryszczkowatym zapaleniu skóry	85
4.2. Ekspresja wybranych cząsteczek adhezyjnych w pemfigoidzie pęcherzowym i opryszczkowatym zapaleniu skóry	87
4.3. Ekspresja wybranych chemokin i receptorów dla chemokin w pemfigoidzie pęcherzowym i opryszczkowatym zapaleniu skóry	93
4.4. Badania markerów eozynofilów i mastocytów w pemfigoidzie pęcherzowym i opryszczkowatym zapaleniu skóry	105
4.5. Ekspresja wybranych neuropeptydów w pemfigoidzie pęcherzowym i opryszczkowatym zapaleniu skóry	116
4.6. Ekspresja wybranych metaloproteinaz i ich inhibitorów w pemfigoidzie pęcherzowym i opryszczkowatym zapaleniu skóry	121
4.7. Ekspresja wybranych adamalizyn w pemfigoidzie pęcherzowym i opryszczkowatym zapaleniu skóry	147
4.8. Ocena czynników prokoagulacyjnych w pemfigoidzie pęcherzowym i opryszczkowatym zapaleniu skóry	165
<b>5. DYSKUSJA</b>	<b>171</b>
5.1. Rola cząsteczek adhezyjnych, chemokin, neuropeptydów oraz markerów aktywności eozynofilów i mastocytów w patogenezie powstawania pęcherzy podnaskórkowych	171
5.2. Rola enzymów proteolitycznych i ich inhibitorów w rozwoju pęcherzy podnaskórkowych	191
5.3. Rola czynników prokoagulacyjnych w patogenezie podnaskórkowych chorób pęcherzowych	202



A. Żebrowska

<b>6. WNIOSKI</b>	<b>211</b>
<b>7. STRESZCZENIE</b>	<b>213</b>
<b>8. ABSTRACT</b>	<b>223</b>
<b>9. PIŚMIENNICTWO</b>	<b>233</b>
<b>10. SPIS TABEL</b>	<b>253</b>
<b>11. SPIS RYCIN</b>	<b>255</b>