

Justyna Gornowicz-Porowska

**EKSPRESJA ELASTAZY NEUTROFILÓW A AUTOIMMUNIZACJA
WOBEC TRANSGLUTAMINAZY NASKÓRKOWEJ, BP180, BP230
ORAZ DESMOGLEIN 1 I 3
W AUTOIMMUNIZACYJNYCH DERMATOZACH
PĘCZERZOWYCH**

Rozprawa doktorska

Promotor: dr hab. n. med. Marian Dmochowski prof. UM

Pracownia Histopatologii i Immunopatologii Skóry
Katedra i Klinika Dermatologii
Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań 2012

WYKAZ CZĘŚCIEJ UŻYWANYCH OZNACZEŃ

- APC** – komórka prezentująca antygen (*antigen-presenting cell*)
- BP** – pemfigoid pęcherzowy (*bullous pemphigoid*)
- BP180** – antygen pemfigoidu pęcherzowego o m.cz. 180 kDa (BPAG2; kolagen typu XVII)
- BP230** – antygen pemfigoidu pęcherzowego o m.cz. 230 kDa (BPAG1)
- C3** – składowa C3 dopełniacza
- CD** – celiakia (*celiac disease*)
- DEJ** – połączenie skórno-naskórkowe (*dermal-epidermal junction*)
- Dg.** – rozpoznanie
- DH** – opryszczkowate zapalenie skóry (*dermatitisherpetiformis*)
- DIF** – metoda immunofluorescencyjna bezpośrednia (*direct immunofluorescence*)
- DIFh** – metoda immunofluorescencyjna bezpośrednia we włosie
(*direct immunofluorescence of plucked hair*)
- DSG1/DSG3** – desmogleina 1/3
- EDN** – neurotoksyna eozynofilowa (*eosinophil-derived neurotoxin*)
- ELISA** – metoda immunoenzymatyczna (*enzyme-linked immunosorbent assay*)
- ES** – rozprzestrzenianie się epitopów (*epitopespreading*)
- eTG** – transglutaminaza naskórkowa (*epidermaltransglutaminase*)
- FcR** –receptor dla fragmentu Fc
- FITC** – izotiocyanian fluoresceiny (*fluorescein isothiocyanate*)
- GSE** – glutenozależna enteropatia (*gluten sensitive enteropathy*)
- HD** – półdesmosom (*hemidesmosome*)
- H+E** – rutynowe badanie histologiczne hematoksyliną i eozyną
- HLA** – ludzkie antygeny leukocytarne (*human leukocyte antigens*)
- IgA** – immunoglobulina A
- IgG** – immunoglobulina G
- IIF** – metoda immunofluorescencyjna pośrednia (*indirect immunofluorescence*)
- Max.** – maksimum
- MBP** – główne białko zasadowe (*major basic protein*)
- MHC** – główny układ zgodności tkankowej (*major histocompatibility complex*)
- Min.** – minimum

-
- MMP** – metaloproteinaza macierzy (*matrixmetalloproteinase*)
- n** – liczba badanych
- NE** – elastaza neutrofilów (*neutrophilelastase*)
- npG** – nonapeptydy gliadyny (*nonapeptidesofgliadin*)
- PBS** – bufor fosforanowy (*phosphate – buffered saline*)
- PF** – pęcherzyca liściasta (*pemphigusfoliaceus*)
- PV** – pęcherzyca zwykła (*pemphigusvulgaris*)
- r** – współczynnik korelacji rang Spearmana (*Spearman’s rank correlation coefficient*)
- ROC** – charakterystyka operacyjna odbiornika (*receiveroperatingcharacteristic*)
- Ryc.**– rycina
- SD** – odchylenie standardowe (*standarddeviation*)
- tTG** – transglutaminaza tkankowa (*tissuetransglutaminase*)
- \bar{x} – średnia

Spis treści

1. WSTĘP.....	8
1.1. Opryszczkowe zapalenie skóry (DH) na tle choroby trzewnej (CD).....	8
1.1.1. Podobieństwa między DH i CD; teorie patogenetyczne	8
1.1.2. Różnice między DH i CD	12
1.1.3. Zagadnienia nozologiczne DH w obrębie CD	15
1.2. Patogeneza pemfigoidu pęcherzowego (BP) w kontekście budowy połączenia skórno-naskórkowego.....	17
1.3. Wzbudzanie patologicznej autoimmunizacji w chorobach kręgu pęcherzycy.....	24
1.3.1. Zaangażowanie mechanizmów centralnej tolerancji w patogenezie pęcherzycy	25
1.3.2. Rola czynników środowiskowych i predyspozycji genetycznych w patogenezie pęcherzycy	31
2. CEL PRACY	36
3. MATERIAŁY I METODY	37
3.1. Materiał.....	37
3.1.1. Grupy badane.....	37
3.1.2. Surowice	40
3.1.3. Płyn pęcherzowy.....	40
3.1.4. Wycinki skórne	40
3.1.5. Włosy.....	40
3.2. Metody.....	41
3.2.1. Metody diagnostyczne	41
3.2.2. Metody diagnostyczno-badawcze.....	42
3.2.3. Metody badawcze	47
3.2.4. Ocena mikroskopowa i dokumentacja fotograficzna	50
3.2.5. Analiza statystyczna	50
4. WYNIKI.....	52
4.1. Czynność neutrofilów w skórze pęcherzowo zmienionej badana barwieniem immunohistochemicznym i analizą drobnowidową złogów NE w tkankach pacjentów z DH, BP i pęcherzycą.....	52
4.2. Przeciwciała krążące IgA przeciwko eTG, tTG i npG w DH, IgG przeciwko BP180 i BP230 w BP, IgG przeciwko DSG1 i DSG3 u chorych z pęcherzycą badane techniką ELISA	57
4.3. Zależność pomiędzy poziomem przeciwciał krążących (anty-eTG, anty-tTG i anty-npG IgA w DH; anty-BP180 i anty-BP230 IgG w BP, anty-DSG1 i anty- DSG3 IgG w PV/PF) a nasileniem skórnych złogów NE	59
4.4. Przydatność testów immunoenzymatycznych ELISA wykrywających anty- eTG, anty-tTG i anty-npG IgA do diagnostyki różnicowej chorych z DH.....	60

4.5. Czynność eozynofiliów badana stężeniem EDN/RNAzy 2 a autoprzeciwciała IgA przeciwko eTG u chorych na DH.....	66
4.6. Zależność między nasileniem ekspresji eTG w skórze w sąsiedztwie DEJ u chorych na DH a poziomem przeciwciał krążących IgA wobec eTG.....	67
4.7. Czynność eozynofiliów w skórze pęcherzowo zmienionej badana barwieniem immunohistochemicznym i analizą drobnowidową złogów MBP w tkankach pacjentów z BP oraz zależność pomiędzy nasileniem skórnych złogów MBP a poziomem przeciwciał krążących IgG wobec BP180 i BP230 oraz nasileniem skórnych złogów NE w BP.....	69
4.8. Przeciwciała IgG przeciwko BP180 i BP230 w surowicy i płynie pęcherzowym u chorych na BP.....	71
4.9. Przeciwciała IgG przeciwko DSG1 i DSG3 w surowicy i złogi IgG, IgG1, IgG4 i C3 w zewnętrznej pochewce mieszka włosowego bezobjawowych krewnych chorych z pęcherzycą.	73
5. DYSKUSJA	75
5.1. Uczynnienie neutrofilów mierzone intensywnością ekspresji NE a wzbudzenie procesu zapalnego w autoimmunizacyjnych dermatozach pęcherzowych	75
5.1.1. Uczynnienie neutrofilów mierzone intensywnością ekspresji NE i uczynnienie eozynofiliów mierzone surowiczym stężeniem EDN a autoimmunizacja wobec eTG, tTG, npG u chorych z DH	76
5.1.2. Uczynnienie neutrofilów mierzone intensywnością ekspresji NE i eozynofiliów mierzone intensywnością ekspresji MBP a autoimmunizacja wobec BP180 i BP230 u chorych z BP	81
5.1.3. Uczynnienie neutrofilów mierzone intensywnością ekspresji NE a autoimmunizacja wobec DSG1 i DSG3 u chorych z pęcherzycą	88
5.2. Przydatność testów immunoenzymatycznych ELISA wykrywających anty-eTG, anty-tTG i anty-npG IgA do diagnostyki różnicowej chorych z DH.....	92
5.3. Zależność między nasileniem ekspresji eTG w skórze u chorych na DH a poziomem przeciwciał krążących IgA wobec eTG.....	95
5.4. Przeciwciała IgG przeciwko BP180 i BP230 w surowicy i płynie pęcherzowym u chorych z BP.....	96
5.5. Analiza genetycznego występowania pęcherzycy na podstawie badań bezobjawowych krewnych chorych z pęcherzycą.....	98
6. WNIOSKI.....	104
7. STRESZCZENIE	105
8. ABSTRACT	109
9. PIŚMIENNICTWO	113

Część zagadnień poruszanych w poniższej pracy doktorskiej przedstawiono w następujących doniesieniach:

I. Prace opublikowane

Bowszyc-Dmochowska M., Seraszek A., Kaczmarek E., **Gornowicz J.**, Dmochowski M.: *Low strength of correlation between the intensity of neutrophil elastase expression in lesional skin and the level of serum IgA antibodies to epidermal transglutaminase in dermatitis herpetiformis*. The Open Autoimmunity Journal, 2009, 1, 1-4.

Gornowicz J., Bowszyc-Dmochowska M., Dmochowski M.: *Od autoprzeciwciał do powstania pęcherza – przewodzenie sygnałów w pęcherzycy zwykłej i liściastej*. Dermatol. Klin., 2010, 12 (2), 117-120.

Gornowicz J., Bowszyc-Dmochowska M., Dmochowski M.: *Przeciwciała IgA przeciwko białku fuzyjnemu zawierającemu zmodyfikowany nonapeptyd gliadyny w opryszczkowatym zapaleniu skóry*. Dermatol. Klin., 2010, 12 (4), 239-243.

Gornowicz-Porowska J., Bowszyc-Dmochowska M., Dmochowski M.: *Autoimmunity-driven enzymatic remodeling of the dermal-epidermal junction in bullous pemphigoid and dermatitis herpetiformis*. Autoimmunity, 2012, 45 (1), 71-80 (epub 14 września 2011).

Pietkiewicz P., **Gornowicz-Porowska J.**, Bowszyc-Dmochowska M., Dmochowski M.: *Pemphigoid gestationis in a female with progressive facial hemiatrophy: microchimerism as a speculative shared background is disputable*. Pol. J. Pathol., 1/2012 (przyjęta do druku).

II. Streszczenia zjazdowe

Kowalczyk M.J., **Gornowicz J.**, Szramka-Pawlak B., Dmochowski M., Żaba R.: *Transcription of three HERV sequences in pemphigus vulgaris*. 8th Congress of the Baltic Association of Dermatovenereologists, 17-19 września, 2009, Wilno, Litwa.

Dmochowski M., **Gornowicz J.**, Seraszek A., Kaczmarek A., Bowszyc-Dmochowska M.: *Neutrophil elastase, eosinophil major basic protein and autoantibodies to BP230 in human bullous pemphigoid lesions*. JC Bystryn Pemphigus & Pemphigoid Meeting: from the bench to the bedside. 5-6 listopada, 2010, Bethesda, Maryland, USA.

Dmochowski M., **Gornowicz J.**, Seraszek A., Kaczmarek E., Bowszyc-Dmochowska M.: *Cutaneous expression of neutrophil elastase in relation to IgA autoantibodies to nonapeptides of gliadin and tissue transglutaminase in dermatitis herpetiformis*. Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology. 7-4 maja, 2011, Phoenix, USA. J Invest Dermatol 2011, 131, Suppl. 1, s. S2.

Gornowicz J., Bowszyc-Dmochowska M., Seraszek A., Kaczmarek E., Dmochowski M.: *Expressions of neutrophil elastase and eosinophil major basic protein, evaluated with quantitative digital morphometry, in relation to blister fluid and serum IgG antibodies to BP230 in human bullous pemphigoid*. 22nd World Congress of Dermatology, 24-29 maja,

2011, Seul, Korea Południowa.

Gornowicz-Porowska J., Bowszyc-Dmochowska M., Seraszek-Jaros A, Kaczmarek E, Dmochowski M.: *Human dermatitis herpetiformis: IgA autoantibodies to gliadin nonapeptides, tissue and epidermal transglutaminases are linked, but unrelated to cutaneous neutrophil elastase*. 8th International Congress on Autoimmunity, 9-13 maja, 2012, Granada, Hiszpania

Dmochowski M., **Gornowicz-Porowska J.**, Seraszek-Jaros A., Kaczmarek E. Pietkiewicz P., Bowszyc-Dmochowska M.: *Cutaneous expression of neutrophil elastase in relation to IgG autoantibodies to desmoglein 1 and 3 in pemphigus foliaceus and pemphigus vulgaris*. Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, 9-12 maja, 2012, Raleigh, USA.

Realizując poniższą pracę doktorską, uzyskano następujące wsparcia finansowe:

- Projekt badawczy promotorski MNiSW/NCN N N401 001239 „Ekspresja elastazy neutrofilów a autoimmunizacja wobec transglutaminazy naskórkowej, BP180, BP230 oraz desmoglein 1 i 3 w autoimmunizacyjnych dermatozach pęcherzowych”.
- Stypendium w ramach projektu ”Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski” - projekt własny Wojewódzkiego Urzędu Pracy w Poznaniu, realizowany w ramach Poddziałania 8.2.2 Regionalne Strategie Innowacji Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, współfinansowany ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego.
- Stypendium dla najlepszych doktorantów UM w Poznaniu przyznawane przez Komisję Stypendialną.
- Grant uczelniany dla młodych naukowców i uczestników studiów doktoranckich (502-14-02220351-50579).

1. WSTĘP

1.1. Opryszczkowe zapalenie skóry (DH) na tle choroby trzewnej (CD)

DH jest przewlekłą dermatozą z intensywnym świądem i charakterystycznymi polimorficznymi wykwitami skórnymi (Dmochowski 2006b), w przebiegu której istnieją różne etapy rozwoju choroby, zależne od czasowo-przestrzennej ewolucji wykwitów (Gornowicz i wsp. 2010a). Zaliczane jest do schorzeń pęcherzowych z autoimmunizacji wobec enzymów (Dmochowski 2006a), a u chorych można też wykryć przeciwciała o niższej specyficzności: (m.in. przeciwgliadynowe i przeciw śródmięśni mięśni gładkich) (Kárpáti 2004). Coraz częściej poruszana jest rola transglutaminazy tkankowej (tTG) i transglutaminazy naskórkowej (eTG) jako autoantygenów w DH oraz ich znaczenia w procesach różnicowania keratynocytów i stabilizacji połączenia skórno-naskórkowego (DEJ) w brodawkach skórnym (Lorand i wsp. 1984, Aeschliman i wsp. 1995, Marietta i wsp. 2008). Rola transglutaminaz w patomechanizmie DH polega zapewne na katalizie zależnej od jonów wapnia reakcji tworzenia kowalencyjnych wiązań γ -glutamylolizynowych (Lorand i wsp. 1984, Aeschliman i wsp. 1995). Sugeruje się, że w patogenezie DH ważnym czynnikiem może być proces apoptozy, który współgra z innymi mechanizmami patogenetycznymi (Caproni i wsp. 2005). Należy pamiętać, że w porównaniu do innych autoimmunizacyjnych dermatoz pęcherzowych mechanizmy immunogenetyczne DH są najmniej poznane, mimo iż zapewne posiadają najbardziej złożone uwarunkowania (Gornowicz-Porowska i wsp. 2011).

DH zdaje się być blisko powiązane z CD (celiaką). Pierwsza obserwacja wiążąca te dwie choroby pochodzi od Marksa i wsp. (Marks i wsp. 1966). Rozwój tych chorób jest wynikiem odpowiedzi immunologicznej na antygen glutenu, który stanowi substrat dla transglutaminaz. Najistotniejsze białko uwrażliwiające stanowi gliadyna (Gornowicz i wsp. 2010a). Wyzwalacz odpowiedzi immunologicznej wobec transglutaminaz i wywołania progresji CD do DH pozostaje niejasny.

1.1.1. Podobieństwa między DH i CD; teorie patogenetyczne

Zarówno CD, jak i DH to wieloczynnikowe choroby, w których rolę odgrywają zarówno czynniki genetyczne, jak i środowiskowe, prowadzące do charakterystycznych zmian, odpowiednio, w jelicie cienkim i skórze. Za punkty stykowe między tymi dwoma chorobami uznaje się: odpowiedź enteropatii na bezglutenową dietę, immunogenetykę (powszechne występowanie fenotypu HLA B8 i DR3), występowanie hiposplenizmu

i predyspozycji do rozwoju chłoniaków (Gawkrödner i wsp. 1984, Collin i wsp. 1996, Humbert i wsp. 2006). Uważa się, że wystąpienie obu chorób z typowymi dla nich objawami jest wynikiem wypadkowej czterech czynników: predyspozycji genetycznych, spożycia glutenu, zmian w jelicie cienkim i ewentualnych czynników demaskujących (Sárdy 2002a,b). Obydwie choroby dotyczą zazwyczaj populację rasy białej, gdzie pszenica, żyto czy jęczmień są ważnymi składnikami pożywienia (Europa, część Ameryki, Australia, Azja Zachodnia i Północna) (Corazza i wsp. 1995). Sporadycznie występują natomiast w rejonach Afryki, Azji Wschodniej i Południowej (Sárdy 2002b, Zone 2004). Patomechanizm DH i CD wydaje się być podobny. Jak podają dane piśmiennicze obydwie choroby są silnie powiązane z haplotypami HLA DQ2 i DQ8 (Hervonen i wsp. 2000, Marietta i wsp. 2004), prawdopodobnie ok. 90% pacjentów DH i CD ma DQ2- a większość z pozostałych 10% DQ8 (Balas i wsp. 1997, Holopainen i wsp. 2001, Collin i wsp. 2003, Caproni i wsp. 2009). Obie choroby szczególnie manifestują allele klasy II HLA (Reunala 2001, Collin i wsp. 2003), a podatność na nie jawi się być powiązana głównie z allelami HLA- DQA1*0501, DQB1*02 (kodującymi heterodimer HLA klasy II HLADQ2) i w mniejszym stopniu z genami HLA-DQA1*03, DQB1*0302 (kodującymi molekułę DQ8) (Sollid 2000, Sárdy 2002b). Pomimo silnego powiązania ze specyficznymi haplotypami HLA, same czynniki genetyczne nie decydują o klinicznym ujawnieniu choroby. Niektórzy badacze donoszą o znaczeniu w DH i CD genów niepowiązanych z HLA (Holopainen i wsp. 2001).

Bliskie genetyczne tło DH i CD ujawniają także badania rodzin (Hervonen i wsp. 2002). Wiadomo, że obydwie schorzenia wykazują tendencję do skupiania się w rodzinach – udowodniono, że ok. 18% pacjentów DH i ok. 19% pacjentów CD ma krewnych pierwszego stopnia cierpiących na tę samą chorobę (Hervonen i wsp. 2002). Podobnie jak w CD segregacja choroby u rodzin DH związana jest z ryzykiem haplotypu HLA, a liczba dotkniętych rodziców, rodzeństwa i dzieci pasuje do modelu dominującego dziedziczenia mendlowskiego. Model dziedziczenia autosomalnego dominującego CD sugerował McDonald (McDonald i wsp. 1965), jednak późniejsze badania wykazały, że jest przekazywana w sposób recesywny (Greenberg i wsp. 1982). Analizując to zagadnienie przeprowadzono badania monozygotycznych bliźniąt (Hervonen i wsp. 2000). Monozygotyczne bliźnięta mogą wykazywać każdą kombinację ujawniania CD, DH lub klinicznie cichej wrażliwości na gluten, udowadniając znaczenia czynników środowiskowych. Dowiedziono również występowania obu dolegliwości u poszczególnego z bliźniąt - u jednego DH, a u drugiego CD - co jest silnym dowodem na ich wspólne

genetyczne tło oraz wspiera hipotezę, że wystąpienie DH zapewne nie wymaga dodatkowych genów, niż te usposabiające do CD (Reunala 2001). Ponieważ zauważono, że występowanie CD jest wyższe u krewnych pacjentów DH /CD (Neuhausen i wsp. 2008, Duś i wsp. 2009), niektórzy autorzy sugerują u nich badania przesiewowe krewnych pierwszego stopnia (Caproni i wsp. 2009). O ile użyteczność testów dla CD u objawowych pierwszorzędowych krewnych jest oczywista, o tyle obecnie jest niewiele dowodów wspierających takie badania u bezobjawowych krewnych (Rostomi i wsp. 2006, Caproni i wsp. 2009).

Za potencjalne mechanizmy zaangażowane w wywołanie obu chorób uważane są zmiany w przepuszczalności jelita i międzykomórkowych obwódek zamykających (*tightjunction*) (Green i wsp. 2003). Odpowiedź immunologiczna na cząsteczki gliadyny ma miejsce w dwóch przedziałach organizmu – blaszce właściwej (*lamina propria*) i nabłonku jelita cienkiego. W patomechanizmie udowodniono rolę CD4+ limfocytów T, natomiast kwestią kontrowersyjną wydaje się rozważana rola CD8limfocytów T (Abenavoli i wsp. 2006).

Głównym czynnikiem środowiskowym jest spożycie glutenu, którego najbardziej istotną patogenetycznie frakcją stanowi gliadyna. Hipoteza autoimmunizacyjnej patogenezy CD głosi deamidację frakcji gliadyny pszenicznej przez tTG, wiązania do HLA DQ2 i rozpoznawania przez jelitowe limfocyty T z konsekwentnym produkowaniem cytokin powodujących uszkodzenia nabłonka, enzymów degradujących macierz i przeciwciał IgA przeciwko tTG (Reunala 2001). Gliadyna jest prolaminą i zawiera wysokie ilości glutaminy, proliny i hydrofobowych aminokwasów (Field i wsp. 1982, Cornell i wsp. 1992, Sárdy 2002b). Aminokwasy te tworzą kilka epitopów w prolaminowym białku (gliadynie), z których niektóre są immunodominujące. Jednakże szczególną cechą glutenu jest fakt, że deamidacja pewnych polipeptydowych reszt (zarówno prolamin, jak i glutein) może doprowadzać do identyfikowania ich jako antygenów z rozpoznawaniem przez limfocyty T pewnych deamidowanych białek dużo bardziej skutecznie niż tych niezmodyfikowanych (Lundin i wsp. 1997, Sjöström i wsp. 1998, Van der Wal i wsp. 1998, Sárdy 2002b).

W związku z powyższym, większość antygenowych białek gliadynowych nie jest rozpoznawanych w swojej natywnej formie. Wyjaśnieniem tego zjawiska może być charakterystyczna właściwość DQ2 i DQ8 – wiążą one motywy które preferencyjnie wiążą białka posiadające ładunek ujemny. Chociaż białka glutenu nie są bogate w reszty naładowane ujemne, po procesie deamidacji powstaje kwas glutaminowy, zatem w konsekwencji gluten może się stać bogatym źródłem epitopów dla DQ2 i DQ8 (Sárdy

2002b). Wówczas są one prezentowane przez komórki prezentujące antygen poprzez molekuly HLA DQ2 lub DQ8. Komórki te skutecznie uczynniają zarówno CD4+ Th1-limfocyty co prowadzi do stanu zapalnego i przebudowy tkanki, jak i Th2-limfocyty, co inicjuje produkcję przeciwciał przeciwko białkom glutenu. Dzięki wysokiej zawartości glutaminy i proliny, prolaminy są preferowanymi substratami dla transglutaminaz (Bruce i wsp. 1985, Sárdy 2002b). Deamidowane polipeptydy gliadyny wiążą się krzyżowo z pewnymi białkami transglutaminazowymi mogąc osiągać powierzchnie podstawnoboczną enterocytów. Taki kompleks może funkcjonować jako neoantygen będący rozpoznawanym zarówno przez gluteno-swoiste i transglutaminazo-swoiste limfocyty B (Sárdy 2002b).

Dane doświadczalne sugerują, że przeciwciała pojawiają się w wyniku uszkodzenia błony śluzowej jelit u pacjentów DH (Marietta i wsp. 2008), co pasowałoby do ogólnie akceptowanej teorii, że wszyscy pacjenci DH posiadają w jakimś stopniu immunopatologiczną jelitową odpowiedź na gluten, która jest manifestowana na skórze. Uwaga badaczy skoncentrowana jest na wyjaśnieniu z jakiego powodu i w jaki sposób przeciwciała anti-TGs są generowane zarówno w DH jak CD. Możliwym jest, że katalizator(y)/wyzwalacz(e) produkcji przeciwciał znajdują się w jelicie i jest/są powiązane z jego uszkodzeniami. Dalsze prace powinny skoncentrować się na odnalezieniu tych katalizatorów (innych niż spożycie glutenu, np. w postaci pszenicy). Istotnym jest także określenie, czy produkcja tych transglutaminazo-swoistych przeciwciał jest niezbędna do rozwoju patologii autoimmunizacyjnej w jelicie cienkim i skórze czy też stanowią one jedynie konsekwencje patologii jelitowej (Marietta i wsp. 2008). Jest możliwym, że nadmiar anti-tTG IgA może być deponowany także w skórze poprzez reakcje krzyżowe ze skórnymi transglutaminazami. Co ciekawe, tTG jest także zaangażowana w międzycząsteczkowe krzyżowe wiązanie kolagenu VII, co się dzieje niedaleko miejsca gdzie występują złogi IgA w skórze DH (Dieterich i wsp. 1999). Dalsze badania powinny ujawnić czy istnieje skórną autoantygen DH związany z tTG, jednak możliwość istnienia unikalnej determinanty antygenowej w skórze pacjentów DH, lecz nie CD, pozostaje zagadkowe (Reunala 2001). Możliwym jest, że kompleks tTG-gluten inicjuje odpowiedź przeciwciał IgA (Sollid i wsp. 1997), ale nie jest w stanie produkować immunoglobulin anti-tTG wysokiego powinowactwa, co skutkuje początkowo „cichą” formą CD. Przeciwciała te krzyżowo reagują z eTG poprzez ich wysokie podobieństwo aminokwasowe, ale mają w stosunku do nich niską awidność. Po dłuższej prowokacji gliadynowej (pacjenci DH zwykle ukazują objawy później niż pacjenci CD), specyficzna krzyżowo reagująca populacja przeciwciał rozwija się u tych pacjentów którzy nabędą DH.

Przeciwciała te wykazują niskie powinowactwo do tTG, ale niezmiernie duże do eTG (Sárdy i wsp. 2002a,b). Kwestia czy wzrastają one przeciwko eTG jako głównemu antygenowi, czy są wynikiem rozprzestrzeniania epitopów (*epitopespreading* – ES) pozostaje nieznana, jak również zagadnienie dlaczego jedynie część pacjentów rozwija specyficzne przeciwciała przeciwko eTG i dlaczego ta grupa pacjentów ma tylko bardzo ograniczony proces enteropatii również pozostaje do zbadania.

Patologia skórna może być wywołana przez skórne złogi krążących immunokompleksów zawierających IgA i eTG (Sárdy i wsp. 2002a). Prawdopodobnie enzym ten jest w stanie aktywnym, co skutkuje krzyżowym wiązaniem kowalencyjnym kompleksu do pewnych strukturalnych elementów skórnych. To może poniekąd tłumaczyć, dlaczego nie jest możliwym wydobycie/wyekstrahowanie IgA immunokompleksów ze skóry pacjentów DH. Stany zapalne skóry mogą eliminować kowalencyjnie związane immunokompleksy. W rzeczywistości, często IgA są obecne w okołowykwitowej i/lub klinicznie niezmiętej skórze a nie w obszarze powstawania pęcherza (Sárdy 2002a,b, Marietta i wsp. 2004).

W przeciwieństwie do wielu innych autoimmunizacyjnych dermatoz pęcherzowych, jak pęcherzyca, BP, liniowa IgA dermataza pęcherzowa (LABD), gdzie nastąpił postęp w scharakteryzowaniu głównych autoantygenów, w przypadku DH wciąż należy rozwiązać zagadkę złogów IgA w skórze, kwestie konkretnego autoantygeny i fakt czy przeciwciała IgA odgrywają sprecyzowaną rolę w procesie powstawania pęcherza (Reunala 2001).

1.1.2. Różnice między DH i CD

Powiązania DH i CD nie wywołują raczej szerszej dyskusji, kontrowersje nasilają się wobec różnic między tymi dwiema chorobami. Należy jednak pamiętać, że między DH a CD istnieją istotne rozbieżności, których nie sposób ignorować. Pierwsza, zasadnicza niezgodność, wynikająca z definicji obu chorób, ukazuje odmienną kliniczną ekspresję wrażliwości na gluten. Klasyczna manifestacja nadwrażliwości na gluten to CD, która jest chorobą żołądkowo-jelitową (jej kliniczna ekspresja dotyczy głównie jelita cienkiego), natomiast DH jest dermatozą pęcherzową (skórne ujawnienie choroby) (Hervonen i wsp. 2000). Jednak występowanie zmian skórnych charakterystycznych dla DH stało się powodem dyskusji. Niektórzy badacze zauważają, że po wyłączeniu z diety glutenu następują remisje choroby (Reunala i wsp. 1997) inni natomiast nie zaobserwowali takiej zależności (Shuster i wsp. 1968). Uważa się, że większość pacjentów DH nie rozwija objawów trawiennych. Jednak dane doświadczalne wskazują, że wśród przebadanych

pacjentów tylko 13% miało objawy jelitowe (Alonso-Llamazares i wsp. 2007), a u 87% glutenoależną enteropatię stwierdzono po biopsji jelita. Z kolei Zone (Zone 2004) podaje, że ok. 20% pacjentów DH ma objawy jelitowe. Istnieje również niezgodność w sprawie zaniku kosmków jelitowych w DH, który wykazuje różny stopień zaawansowania. Niektórzy obserwują normalny nabłonek jelita cienkiego u ok. 1/3 pacjentów DH (Fry i wsp. 1974), inni demonstrują że enteropatia występuje praktycznie w każdym przypadku DH (Brow i wsp. 1971). Ponieważ DH bywa rozważana jako CD skóry, badacze podnoszą istotność znaczenia skórno wykładnika jako diagnostycznego narzędzia dla rozpoznawania uszkodzeń jelita (Caproni i wsp. 2009), sugerując, że udowodnienie DH eliminuje potrzebę biopsji jelita cienkiego (Caproni i wsp. 2009). Już wcześniej sugerowało się, że CD może być diagnozowana poprzez inne manifestacje niż żołądkowo-jelitowe (Green 2003), co obejmuje DH.

Druga różnica sugerująca niejednorodność pomiędzy chorobami to różnice genetyczne pomiędzy jelitową a skórną manifestacją wrażliwości na gluten. Ostatnio pewne regiony chromosomowe zostały zidentyfikowane, jako możliwie zaangażowane w genetyczne różnice pomiędzy CD i DH (Holopainen i wsp. 2001). Badania przeprowadzone przy użyciu metody nieparametrycznych sprzężeń pomiędzy markerami mikrosatelitarnymi a daną chorobą ujawniły, że rodziny tylko z jelitową manifestacją wykazywały sprzężenie głównie z 2q33, podczas gdy rodziny z DH wykazywały sprzężenie z 11q i 5q, ale nie z 2q33 (Holopainen i wsp. 2001). Udowodniono też, że HLA DQ2 wykazuje ekspresję zależną od płci i przekazuje silniejszą podatność kobietom niż mężczyznom (Holopainen i wsp. 2001). Analiza ta miała również na celu wykazanie jak bardzo czynniki genetyczne determinują skórną (DH) i jelitową (CD) manifestację nadwrażliwości na gluten. Wskazują one, co wspomniano również wyżej, że manifestacja nadwrażliwości na gluten może znacznie się różnić u genetycznie identycznych osobników, niektórzy mogą mieć tylko schorzenie jelit – CD, inni głównie chorobę skóry – DH. Dane te mogą sygnalizować zjawisko plastyczności genotypowej umożliwiającej fakt, że genetycznie identyczne osobniki mają wyraźnie rozróżnialne fenotypy, CD lub DH, co sugeruje, że czynniki środowiskowe determinują konkretny fenotyp tej wieloczynnikowej choroby (Hervonen i wsp. 2000).

Kolejne różnice dotyczą samej odpowiedzi immunologicznej organizmu. Pomimo iż CD i DH mają elementy komórkowej i humoralnej odpowiedzi, wydaje się, że CD jest mediowana głównie przez Th1, a DH przez Th2 (Caproni i wsp. 1998, Salvati i wsp. 2002, Marietta i wsp. 2004, Dmochowski 2006b).

Następna rozbieżność odnosi się do profilu autoantygenów obu chorób. Dominującym autoantygenem w CD jest tTG (Dieterich i wsp. 1997), natomiast zidentyfikowany główny autoantygen w immunokompleksie brodawek skórnych w DH to eTG (Sárdy i wsp. 2002a). eTG jest enzymem ulegającym ekspresji w naskórku i wykazuje wysoką homologię do tTG. Pacjenci z DH produkują dwie populacje przeciwciał IgA przeciwko eTG. Pierwsza populacja wiąże wyłącznie eTG, podczas gdy druga reaguje krzyżowo zarówno z eTG i tTG. Krzyżowo reagujące eTG-swoiste przeciwciała są znajdowane także w glutenozałej enteropatii bez DH, lecz wykazują niższą awidność dla eTG niż pacjenci DH (Sárdy i wsp. 2002a, Rose i wsp. 2009). Przeciwnie, eTG-swoiste przeciwciała nie reagujące krzyżowo z tTG są obecne tylko u pacjentów DH (Sárdy i wsp. 2002a). Co więcej, eTG a nie tTG kolokalizuje ze złogami IgA w skórze pacjentów DH (Sárdy i wsp. 2002a,b, Donaldson i wsp. 2007) i poziom przeciwciał przeciwko eTG koreluje z istnieniem enteropatii w DH lecz nie enteropatii bez DH (Marietta i wsp. 2008). Czynnikiem mogącym przyczyniać się do tego braku korelacji pomiędzy produkcją anty-tTG i anty-eTG IgA a zaawansowaniem enteropatii może być fakt, że pacjenci CD będący na diecie zawierającej gluten zazwyczaj posiadają trzeci lub wyższy stopień zmian wg skali Marsha, podczas gdy wszystkie stopnie zaawansowania enteropatii mogą występować u pacjentów DH będących na diecie zawierającej gluten (Marietta i wsp. 2008). Niektórzy pacjenci CD mają eTG IgA (Sárdy 2002a,b, Marietta i wsp. 2008), jednak nie są one skorelowane ze stopniem zaawansowania zaniku kosmków jelitowych, podobnie produkcja tym razem anty-tTG IgA u CD nie koreluje z zaawansowaniem enteropatii (Tursi i wsp. 2003, Marietta i wsp. 2008). Wprawdzie nie powinno być wątpliwości, że nietolerancja glutenu leży u podłoża zarówno CD, jak i DH, to jednak osobliwości DH, choroby z wykwitami skórnymi, powinno badać się na poziomie skórnym.

O ile patomechanizm CD i DH wydaje się podobny, to w odróżnieniu od niego epidemiologia tych chorób jest istotnie różna. Zasadnicza różnica ma związek z częstością występowania (Sárdy 2002b): podczas gdy DH jest stosunkowo rzadką chorobą, CD jest dość powszechnym schorzeniem. Szacuje się, że DH występuje w naszej populacji ze średnią częstotliwością 11 na 100000 osób, co stanowi 1/5 z częstotliwości występowania CD (Gawkrödner i wsp. 1984). W przeciwieństwie do CD, którą diagnozuje się przeważnie w dzieciństwie (zazwyczaj przed ukończeniem 6 roku życia, a głównie w pierwszych dwóch latach życia), DH zazwyczaj ujawnia się w późnym okresie dojrzewania lub we wczesnym okresie dorosłości (15-40 rok życia) (Mobacken i wsp. 1984, Reunala i wsp. 1978, Gawkrödner i wsp. 1984). Ponadto stwierdza się, że mężczyźni częściej zapadają na

DH (mężczyzna:kobieta 3:2), odwrotnie jest w CD (kobieta: mężczyzna 2:1) (Reunala 2001, Bolotin i wsp. 2011).

1.1.3. Zagadnienia nozologiczne DH w obrębie CD

Nozologia stanowi dziedzinę nauk medycznych zajmującą się klasyfikacją chorób. Niektórzy badacze sugerują, że należy rozważać poszczególne jednostki chorobowe na poziomie nozologicznym i patologicznym, rozpoznając różnice pomiędzy tymi dwoma podejściami, nawet jeśli w praktyce są one często mieszane z powodu występujących niejasności znaczeniowych (Lagier 2001). W tym kontekście nozologia winna być traktowana jako badania i opis chorób, a patologia jako badanie zmian charakterystycznych dla tych chorób. Już dawno temu Hertz i wsp. (Hertz i wsp. 1977) zauważyli, że nozologia chorób pęcherzowych jest niejasna, szczególnie zaś dotyczy to DH. Od kiedy w 1884 roku Duhring (Duhring 1884) skierował uwagę badaczy na grupę wykwitów skórnych określanych jako *dermatitis herpetiformis*, ich zainteresowanie jednostkami chorobowymi z podobnymi zmianami wzrosło w celu znalezienia im właściwego miejsca nozologicznego w dermatologii (Ravogli 1890). Uprzednio wiele z tych przypadków było mylone z rumieniem wielopostaciowym, pęcherzycą czy liszajcem opryszczkowatym, pozostawiając te osobliwe wykwity poza jakąkolwiek kategorią nozologiczną (Ravogli 1890). Śledząc piśmiennictwo traktujące o DH, łatwo można spostrzec, że istnieje niespójność w jego nozologicznym ułożeniu. DH może być rozważana jako (i) choroba skóry współtowarzysząca CD, (ii) jako jej skórna manifestacja (Herrero-González 2010) będąca komplikacją wywołaną niestosowaniem przy CD właściwej diety bezglutenowej oraz (iii) jako osobna jednostka chorobowa z nadwrażliwości na gluten będącą jej inną fenotypową ekspresją. Już wcześniejsze badania wykazały brak nozologicznej granicy pomiędzy glutenoależną enteropatią towarzyszącą DH i tą obserwowaną w CD (Démoulin-Giacco i wsp. 1996). Istnieją doniesienia, że DH i CD są różną kliniczną ekspresją tej samej wrażliwości na gluten (Cuartero i wsp. 1992), w co wpisuje się hipoteza zespołu Marietta i wsp. (Marietta i wsp. 2008), którzy definiują DH jako osobną jednostkę chorobową często tylko powiązaną z enteropatią.

Dane piśmiennicze ukazują rozbieżność we współdiagnozowaniu obu jednostek – zarówno podaje się, że ok. 5% pacjentów DH ma wcześniej zidentyfikowane CD (Gawkrödger i wsp. 1993), jak i, że DH występuje u ok. 25% pacjentów z CD (Collin i wsp. 2003, Rodrigo 2006, Humbert i wsp. 2006). Sugeruje się, że przewlekłe spożywanie glutenu w CD z predyspozycjami genetycznymi może skutkować rozwojem DH

(Gawkroderger i wsp. 1993). Zatem można uważać dietę bezglutenową jako czynnik zapobiegawczy. Ostatnimi czasy DH coraz częściej zaliczana jest do jednej grupy chorób, razem z CD i ataksją glutenową, których cechą wspólną jest nadwrażliwość na gluten (Herrero-González 2010). Z drugiej strony badacze podnoszą, że istnieją rosnące dowody, by rozważać DH jako specyficzną fenotypową, skórną ekspresję glutenozależnej enteropatii nie do rozróżnienia z CD (Kárpáti 2004, Marietta i wsp. 2004). W świetle takiego stwierdzenia proponowanym jest, by patrzeć na DH jak na ciągłe spektrum CD (Reunala 2001, Zone 2004), które w innym przypadku może zostać niezdiagnozowane (Zone 2004). W świetle powyższego, Zone zauważa, że DH można traktować jako marker CD niezależny od stopnia zaawansowania histopatologicznego CD i towarzyszących objawów jelitowych (Zone 2004).

Wciąż jednak niedokładnie wiadomo czy DH jest skórną manifestacją CD lub czy jest osobną jednostką towarzyszącą glutenozależnej enteropatii. Kwestia nozologicznej przynależności DH jest przyczynkiem dyskursów naukowych – m.in. na łamach *American Family Physician*. Pojawiające się tam sugestie jednych autorów (Bickle i wsp. 2002), że DH jest u większości pacjentów powiązane z glutenozależną enteropatią spotkało się z odzewem środowiska badawczego. Przeciwnicy (Lovett 2003) uważają, że DH winna być traktowana raczej jako wariant lub powikłanie nieleczonej CD. Jako dowód podaje się, że DH i CD dzielą ten sam haplotyp HLA i wykazują podobne wyniki badań surowiczych i tkankowych przeciwciał. Lovett (Lovett 2003) sugeruje także, że DH jest przykładem atypowej CD.

Zebrane dane ujawniają nozologiczny chaos w ułożeniu DH, co może być wynikiem złożonych i nie do końca poznanych mechanizmów patogenetycznych warunkujących wystąpienie choroby. W świetle powyższego, pilna i konieczna jawi się potrzeba ustalenia w tym względzie konsensusu naukowego i uproszczenia aktualnego systemu nozologicznego. Być może powinno się rozważyć uaktualnienie definicji DH i wprowadzenie nowego terminu w uznaniu niektórych istotnych aspektów skórnej patofizjologii choroby. Można przypuszczać, że określenie *glutenouwarunkowana dermataza IgA neutrofilowozależna (gluten-sensitive IgA/neutrophil-mediated dermatitis - GAND)* dla dermatozy opisywanej przez Duhringa byłoby właściwsze i bardziej zrozumiałe dla społeczności lekarzy bez specjalności dermatologicznej/farmaceutów/biotechnologów i ogólnej opinii publicznej (Gornowicz-Porowska i wsp. 2012c - manuskrypt w recenzji). Omawiając tą kwestię, należy zauważyć, że tego typu tendencje są obserwowane w piśmiennictwie i starszy termin „herpes gestationis” został już zastąpiony określeniem

„pemphigoid gestationis” jako lepiej odzwierciedlającym patofizjologię tej autoimmunizacyjnej dermatozy pęcherzowej.

1.2. Patogeneza pemfigoidu pęcherzowego (BP) w kontekście budowy połączenia skórno-naskórkowego

BP to dermataza pęcherzowa skóry z autoimmunizacji wobec białek DEJ, w przebiegu której dochodzi do powstania pęcherza podnaskórkowego (Dmochowski 2006a, Ujiie i wsp. 2010). Jordon i wsp. (Jordon i wsp. 1967) udowodnili, że pacjenci z BP mają krążące przeciwciała skierowane przeciwko antygenom umiejscowionym w obrębie błony podstawnej keratynocytów. Z czasem wykazano białka BP230 (BPAG1) (Stanley i wsp. 1981, Stanleywsp. 1984) i BP180 (BPAG2, kolagen XVII) (Labib i wsp. 1986) jako ważne antygeny w BP. Ponadto BP180 zostało niezależnie opisane i scharakteryzowane przez Nishizawę i wsp. (Nishizawa i wsp. 1993) przy zastosowaniu metod biochemicznych. W celu ułatwienia dalszej charakterystyki BP230 i BP180 zostało sklonowane korespondujące do każdego z białek cDNA, dzięki wykorzystaniu funkcjonalnego przeszukiwania bibliotek ekspresyjnych (Stanley i wsp. 1988, Diaz i wsp. 1990, Giudice i wsp. 1992). Ponadto analizy te pomogła ustalić relację względem biosyntezy pomiędzy BP230 i BP180: są one produktami różnych, niepowiązanych genów. Mapowanie chromosomowe umiejscowiło gen dla BP230 na krótkim ramieniu chromosomu 6 (locus 6p11-12) i gen dla BP180 na długim ramieniu chromosomu 10 (locus 10q24.3) (Sawamura i wsp. 1990, Li i wsp. 1991). Sugeruje się, że prawdopodobnie domena NC16a BP180 obejmuje najbardziej istotne autoepitopy w patogenezie chorób kręgu BP, który obejmuje BP właściwy, pemfigoid ciężarnych i liszaj płaski pęcherzowy pemfigoidalny (Sitaru i wsp. 2002, Zillikens 2002, Dmochowski 2006a, Ujiie i wsp. 2010, Pietkiewicz i wsp. 2012). Uważa się, że w odpowiedzi autoimmunizacyjnej BP uczestniczą nie tylko immunoglobuliny G, ale również klasy IgE (Ujiie i wsp. 2010).

Zjawiska przylegania poszczególnych komórek, ich połączenia z cytoszkieletem wewnętrznym i oddziaływania z macierzą zewnątrzkomórkową warunkują strukturę każdej tkanki. W przypadku skóry, jej funkcja i homeostaza zależy od stabilnej organizacji i kohezji (spójności) pomiędzy naskórkiem a skórą właściwą (Briggaman i wsp. 1975, Villone i wsp. 2008). Tkanki te, zarówno oddziela, jak i wzajemnie łączy strefa połączenia skórno-naskórkowego– umożliwiając ich czynnościowy rozdział i jednocześnie wspólnie tworząc stabilne strukturalne kontinuum. To ciągłe spektrum DEJ powoduje, że każde z białek je budujących może być antygenem, w różnych i odpowiednich ku temu

kombinacjach, wzbudzającym odpowiedź autoimmunizacyjną. Przy czym należy pamiętać, iż DEJ nie stanowi prostego związania komórek przy pomocy obojętnych cząsteczek, ale charakteryzuje się pewną prężnością układu. Jest to niezwykle złożona sieć wzajemnie powiązanych białek, których wiele uczestniczy w procesach przekazywania sygnału, dostarcza adhezji i dynamiki przestrzeni między naskórkiem i skórą właściwą, zapewniając skomplikowany system mechanicznej stabilności strukturalnej skóry (Briggaman i wsp. 1975, Burgeson i wsp. 1997). Ponadto DEJ pełni funkcję bariery transportowej - na podstawie wielkości i ładunku molekuly, ogranicza transport cząsteczek pomiędzy naskórkiem a skórą właściwą, jednocześnie pozwalając na przejście wędrujących lub wnikaających komórek w warunkach fizjologicznych (melanocyty i komórki Langerhansa) i patologicznych (limfocyty i komórki nowotworowe) (Burgeson i wsp. 1997). Dodatkowo DEJ wzmacnia naskórek i wpływa na zachowanie keratynocytów poprzez zmianę polarności komórek, procesów proliferacji, migracji czy różnicowania (Burgeson i wsp. 1997). Spełnia także istotną rolę podczas morfogenezy, procesów gojenia i przebudowy skóry. Pomimo, że dokładne funkcje niektórych białkowych składników DEJ nie zostały w pełni wyjaśnione, ich nieprawidłowości wydają się powiązane licznymi odziedzicznymi i nabytymi dermatozami. W celu zbadania wymienionych procesów, kinetyki ekspresji i regulacji białek obecnych w DEJ powstało wiele modeli doświadczalnych *in vivo* i *in vitro* (Chamson i wsp. 1989, Marionnet i wsp. 2006). W przypadku hodowli *in vitro* analizie zazwyczaj podlega zdolność komórek do syntetyzowania specyficznych dla DEJ białek. Natomiast modele *in vivo* dostarczają cennego wglądu w powstawanie i odtwarzanie błony podstawnej keratynocytów (Marionnet i wsp. 2006). Nową jakością w badaniach nad DEJ niosą najnowsze osiągnięcia biologii molekularnej – trójwymiarowe hodowle organotypowe (wykazujące morfologiczne podobieństwo do skóry) (Marionnet i wsp. 2006).

Ultrastrukturalnie DEJ jest podzielona na cztery strefy: podstawne keratynocyty wraz z ich błoną plazmatyczną obejmującą półdesmosomy (*hemidesmosome* - HD), elektronowo przezierna *lamina lucida*, elektronowo gęsta *lamina densa* i *sub-basal lamina* (zwana również *sublaminadensa*) (Briggaman i wsp. 1975, Burgeson i wsp. 1997, Villone i wsp. 2008). DEJ bywa też synonimicznie określana jako strefa błony podstawnej (*basement membrane zone* - BMZ) (Burgeson i wsp. 1997). Dane piśmiennicze wskazują, że zaburzenie któregoś z głównych jej składowych skutkuje drastycznym zaburzeniem struktury tkanki (Zillikens i wsp. 1999, Villone i wsp. 2008). Analiza przy zastosowaniu mikroskopu elektronowego ujawniła, że DEJ składa się z wąskich, czasem pofałdowanych

granic między keratynocytami podstawnymi a skórą właściwą (McMillan i wsp. 2003). Jednostką dostarczającą mechanicznej stabilności układu jest kompleks zakotwiczący składający się z HD na podstawnej powierzchni keratynocytów, filamentów zakotwiczących w obrębie *lamina lucida* i wiążących HD do błony podstawnej oraz włókienek zakotwiczących w obrębie *laminadensa*, które łączą błonę podstawną z leżącym niżej zrębem skóry (McMillan i wsp. 2003, Villone i wsp. 2008). Kompleks zakotwiczący funkcjonuje przez ustanowienie stabilnych, ciągłych połączeń pomiędzy cytoszkieletem podstawnych keratynocytów (filamentami pośrednimi) i zakotwiczącymi strukturami w obrębie warstwy brodawkowej skóry właściwej (Zillikens i wsp. 1999, McMillan i wsp. 2003). Filamenty pośrednie formują część cytoszkieletu i są zaangażowane w utrzymanie kształtu komórek i spójności struktur naskórkowych (McMillan i wsp. 2003), ponadto ich sieć dostarcza szkieletu molekularnego przekazującego mechaniczną siłę keratynocytom (Zillikens i wsp. 1999). Główny komponent kompleksu, HD to niewielkie (<5 μm), regularnie oddzielone, gęste elektronowo struktury (Zillikens i wsp. 1999, McMillan i wsp. 2003), które dostarczają przyczepu filamentom keratyny do podstawno-bocznej powierzchni naskórka i dodatkowo zakotwiczą go mocno z *lamina densa* przez sieć połączeń z filamentami i włókienkami zakotwiczącymi (Burgeson i wsp. 1997). HD mogą być podzielone na wewnętrzną płytkę leżącą bezpośrednio pod keratyną filamentów pośrednich oraz na zewnętrzną płytkę przykrywającą błonę plazmatyczną (McMillan i wsp. 2003). Pięć głównych składników HD zostało biochemicznie zidentyfikowanych: są to białka o masie cząsteczkowej 500, 230, 200, 180 i 120 kDa i oznaczane, odpowiednio, HD1-5 (Hieda i wsp. 1992).

HD1 to cząsteczka plektyny, HD2 i HD4 to antygeny w BP (BP230 i BP180), HD3 i HD5 odpowiadają podjednostką $\beta 4$ i $\alpha 6$ integryny $\alpha 6\beta 4$ (Burgeson i wsp. 1997). Przynajmniej dwa wysokocząsteczkowe białka związane z rodziną plakin są rozważane jako łącznik pomiędzy filamentami pośrednimi a HD: plektyna i naskórkowa forma antygeny BP230 (BPAG1e) (Burgeson i wsp. 1997, McMillan i wsp. 2003). Obydwa są zamocowane w wewnętrznej płytce HD. BP230 zawiera N-terminalną domenę plakinową, centralną część przypominającą zwinięty spiralnie pręt i domenę C-terminalną, która wiąże filamente pośrednie (McMillan i wsp. 2003). Uważa się, że BP230 jest zdolny do samoskładania w dimery o wysokim podobieństwie do innych członków rodziny plakin (Sawamura i wsp. 1991). Dotychczas zostały zidentyfikowane trzy produkty będące wynikiem alternatywnego składania (*alternative splicing*) genu *BPAG1*, określane BPAG1a (forma powiązana ze zmianami neurodegeneracyjnymi u myszy), BPAG1e

(forma naskórkowa) i BPAG1n (forma nerwowo-mięśniowa, znana też jako *dystonin*) (Leung i wsp. 2001). BP230 ulega ekspresji w nerwach skórnych i podstawnych keratynocytach. Białko to może oddziaływać z szeregiem cząsteczek: cytoplazmatyczną domeną kolagenu XVII, włóknami pośrednimi keratyny (*keratin intermediate filaments* - KIF), białkiem *erbin* i cytoplazmatyczną domeną integryny $\beta 4$. Zatem, zdaje się, że BP230 ogrywa rolę w łączeniu cytoszkieletu KIF do wielu komponentów HD (Zillikens i wsp. 1999, Borradori i wsp. 1999). Przypuszcza się, że ma też istotne znaczenie w zapoczątkowaniu odpowiedzi autoimmunizacyjnej (Zillikens i wsp. 1999). Plektyna i BP230 są kolejno połączone z molekułami przezbłonowymi: kolagenem XVII (BP180, BPAG2) i integryną $\alpha 6\beta 4$, przy czym BP180 i integryna $\alpha 6\beta 4$ mogą być połączone przy pomocy białka *erbin* (Favre i wsp. 2001). Integryna $\alpha 6\beta 4$ i BP180 mają wiele domen wiążących, zarówno zewnątrz- jak i wewnątrzkomórkowych, dzięki którym mogą zapewne oddziaływać z lamininą 332. Na granicy *lamina lucida/lamina densa* laminina 332 może przypuszczalnie tworzyć kompleksy z lamininą 6 i 10 (Burgeson i wsp. 1997, McMillan i wsp. 2003). Nidogen jest w stanie łączyć kompleksy lamininy 6 i 10 do sieci kolagenu IV. W obrębie błony plazmatycznej znajduje się przezbłonowa tetraspanina CD151, która jest najprawdopodobniej zaangażowana w sygnalizację komórkową i morfogenezę (Sterk i wsp. 2000). Konkretna jej funkcja zapewne polega na grupowaniu niespecyficznych receptorów integryny, co ułatwia wiązanie komórek (Sterk i wsp. 2000, McMillan i wsp. 2003). CD151 stanowi niewielkie białko obejmujące błonę cztery razy, w wyniku czego tworzy dwie zewnątrzkomórkowe pętle. Przypuszcza się, że CD151 jest kodystrybuowany na powierzchni podstawno-bocznej keratynocyty z wiążącymi lamininy integrynami: $\alpha 6\beta 4$, $\alpha 3\beta 1$ i $\alpha 6\beta 1$. Z kolei w budowie innego przezbłonowego białka, BP180, można wyróżnić wewnątrzkomórkowy N-koniec i zewnątrzkomórkowy C-koniec (Zillikens i wsp. 1999, McMillan i wsp. 2003) Stosując przeciwciała specyficzne dla konkretnych domen BP180 wykazano, że domena NC16a (uważana za najbardziej immunogenną) jest umiejscowiona w obrębie górnej części *lamina lucida*, w bezpośrednim sąsiedztwie HD, podczas gdy C-końcowy region kolokalizuje z lamininą 332 na powierzchni międzyfazowej *lamina lucida/lamina densa* (Masuanga i wsp. 1997, Ishii i wsp. 2003). Można zatem stwierdzić, że BP180 posiada kolistą głowę w obrębie keratynocyty, domenę zewnątrzkomórkową o przedłużonej konformacji przecinającą *lamina lucida*, z C-końcem, który tworząc zapętłony ogon przechodzi do *lamina densa* (Dmochowski 2006c). Cytoplazmatyczna domena BP180 wiąże integrynę $\alpha 6\beta 4$ i BP230, a zewnątrzkomórkowy region oddziałuje z integryną $\alpha 6\beta 4$ (McMillan i wsp. 2003). Dokładna funkcja BP180 nie została jeszcze do

końca poznana, jednak sugeruje się jego wielozadaniowość. Przypuszcza się, że pomaga grupować BP230 i plektynę i ułatwiając tym samym montowanie HD: istnieją doświadczalne dowody wskazujące, że BP180 wiąże BP230, który może także przyłączać integrynę $\alpha 6\beta 4$, co sugeruje rolę BP180 w zaciąganiu BP230 do istniejącego kompleksu integryny $\alpha 6\beta 4$ i plektyny (Burgeson i wsp. 1997). Ponadto BP180 prawdopodobnie wspiera strukturę i funkcję filamentów oraz włókienek zakotwiczących (Zillikens i wsp. 1999). Istnieje hipoteza, że długa zewnątrzkomórkowa i haczykowata (zapętłona) domena BP180 funkcjonuje jako cząsteczka adhezyjna układu komórka-macierz (McMillan i wsp. 2003), co może być powiązane ze zdolnością tej domeny do wiązania lamininy 332 i domeny NC-1 kolagenu VII. Filamenty zakotwiczące występują w regionie *lamina lucida* i stanowią cienkie, nitkowate struktury składające się z lamininy 332 i łączące HD z *lamina densa* (przecinają *lamina lucida* i pojawiają się w *lamina densa*). Dane doświadczalne wskazują, że laminina 332 może bezpośrednio wiązać N-koniec (NC1) domeny kolagenu VII (Rousselle i wsp. 1997). Zakotwiczące włókienka to z kolei centrosymetryczne twory mające początek w *laminadensa* i rozciągające się do skóry właściwej/*sub-densa lamina* (Burgeson i wsp. 1997). Zakotwiczące włókienka są złożone głównie z kolagenu VII. Keene i wsp. zaproponowali, że tworzą one wielowarstwową sieć wzajemnych połączeń będących strukturami określanymi „płytkami zakotwiczącymi” (Keene i wsp. 1987), co stało się przyczynkiem do dyskusji nad ich strukturą. Shimizu i wsp. (Shimizu i wsp. 1997) nie zaobserwowali podobnego tworu, natomiast wykazali, że włókienka zakotwiczące tworzą pętle w *sub-densa lamina* i oba końce powracają do *lamina densa*. Późniejsi badacze (Ishii i wsp. 2003) również nie zauważyli struktur „płytek zakotwiczących”, pozostawiając kwestię ich istnienia jako wątpliwą.

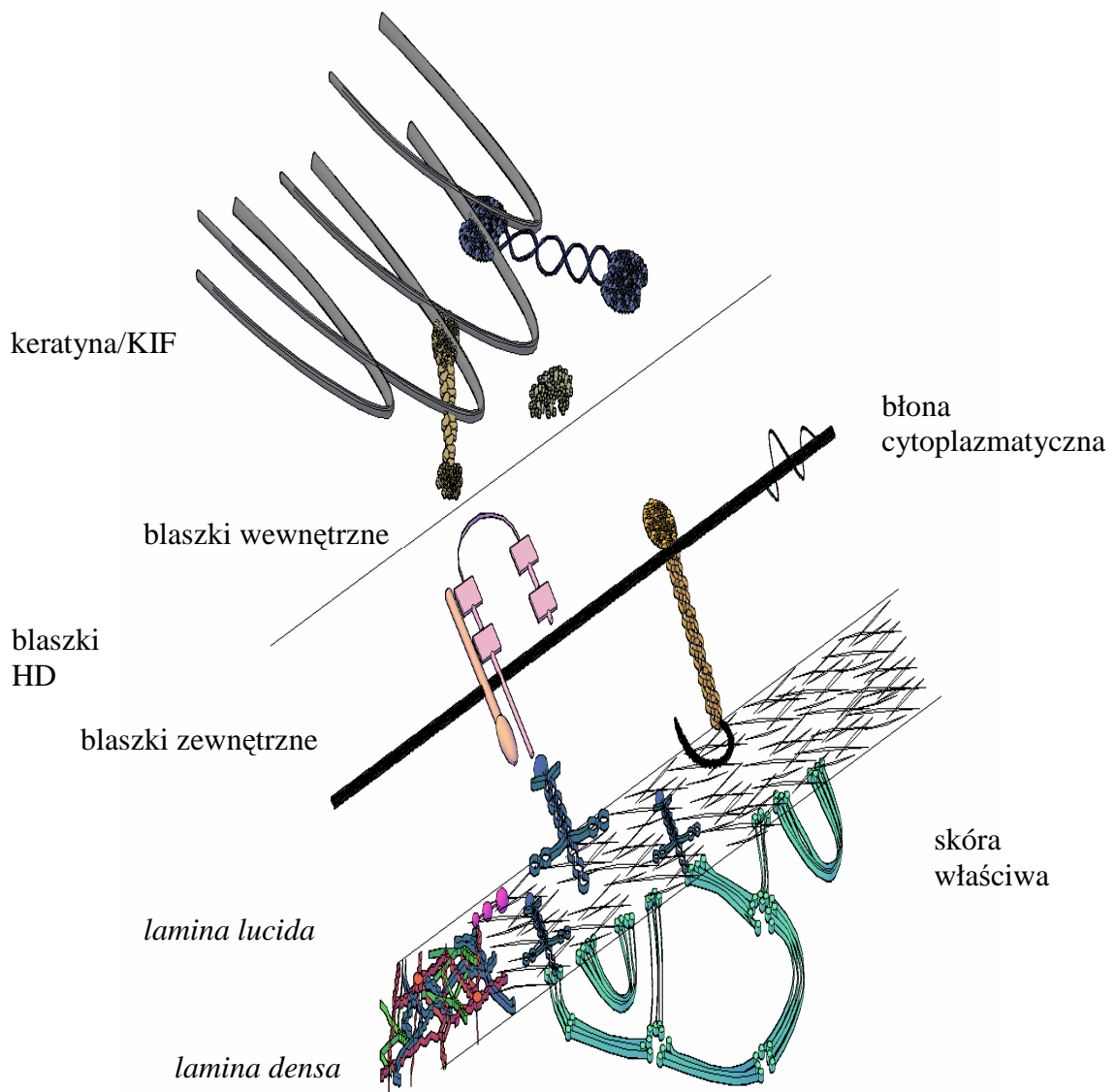
Integryny $\alpha 6\beta 4$ i $\alpha 6\beta 1$ są receptorami dla laminin (McMillan i wsp. 2003). Integryny mogą przekazywać sygnał regulujący ekspresję genów i wzrost komórek (Burgeson i wsp. 1997), składają się z niezwiązanych kowalencyjnie, genetycznie różnych podjednostek α i β . Różne kombinacje tych podjednostek tworzą kompleksy różniące się swoistością wiązania ligandu (Burgeson i wsp. 1997). W obrębie *lamina densa* mogą też występować serie małych „zmostkowanych” cząsteczek obejmujących fibulinę 2, nidogen, perlekan i fibronektynę potrafiących krzyżowo wiązać lamininę i kolagen IV w obrębie *lamina densa* (McMillan i wsp. 2003). Dalsze badania DEJ zapewne skoncentrują się na określeniu precyzyjnej funkcji nowo zidentyfikowanych składowych, jak CD151 czy białko *erbin*. Dodatkowo szczegółowej analizie wymagają czynniki wpływające kontrolę

procesu przylegania i ścieżki sygnalizacji komórkowej w obrębie DEJ, a także istotność wariantów splicingowych (np. ekspresja różnych izoform plektyn, BP230 czy białka *erbin*). Poszczególne składowe elementy DEJ pełnią istotną rolę w utrzymaniu skóro-naskórkowego przylegania, którego zakłócenie jest cechą charakterystyczną niektórych chorób pęcherzowych, w tym BP. Wiadomo, że BP cechuje się obecnością przeciwciał skierowanych przeciwko składowym błony podstawnej, a będące wynikiem odpowiedzi autoimmunizacyjnej organizmu późniejsze zmiany, strukturalne i czynnościowe, w obrębie DEJ prowadzą do powstania, charakterystycznych dla tej dermatozy, pęcherzy podnaskórkowych. Ultrastrukturalne badania ujawniły, że przeciwciała anty-BP umiejscawiają się w wewnątrzkomórkowej płytce HD i na wierzchniej warstwie *lamina lucida* bezpośrednio poniżej leżącego HD (Zillikens i wsp. 1999). Szczegółowe analizy wykazały, że miejsce tworzenia pęcherzy w obrębie *lamina lucida* odpowiada umiejscawianiu związanych *in vivo* przeciwciał w *lamina lucida* (Holubar i wsp. 1975). Wiadomo, że w BP pęcherz tworzy się w niższej części *lamina lucida*. Ponadto skonstruowany doświadczalny model *in vitro* ujawnił, że tworzenie pęcherzy w BP zależy również od aktywacji komplementu i związania neutrofilów do BMZ (Gammon i wsp. 1984). Aktywowane procesem autoimmunizacyjnym neutrofile wydzielają enzymy proteolityczne, w tym elastazę neutrofilową, odpowiedzialne za rozdział naskórkowo-skórny (Verraes i wsp. 2001, Briggaman i wsp. 1984). Udowodniono, że DEJ jest wysoce wrażliwa na trawienie proteolityczne i komórki zapalne (w tym neutrofile) zawierające proteazy mogą mieć istotne patologiczne znaczenie w chorobach związanych z rozpadem DEJ (Schechter 1989), w tym w BP. Przeciwciała anty-BMZ w różnych podnaskórkowych autoimmunizacyjnych dermatozach pęcherzowych są związane do docelowych antygenów umiejscowionych w różnych regionach BMZ, co prowadzi do specyficznych zmian strukturalnych, które odzwierciedlają różnice we wzorze świecenia immunofluorescencyjnego związanych *in vivo* przeciwciał oraz w umiejscowieniu pęcherzy (Vodegel i wsp. 2004). Zmiany w BMZ mogą odpowiadać nie tylko za różnice w lokalizacji pęcherza, ale również za różnice w przebiegu klinicznym poszczególnych dermatoz dotykających DEJ (Woźniak i wsp. 2005). Stosując skanujący laserowy mikroskop konfokalny (*laserscanning confocal microscopy* - LSCM) analizowano zmiany różnych regionów BMZ w autoimmunizacyjnych dermatozach podnaskórkowych, w tym w BP. W przypadku analizy pacjentów z BP uzyskane dane wykazały, że większość zmian ma miejsce w obrębie *lamina lucida*, która zawiera liczne wgłębienia (inwaginacje), bardziej wyrażone we wierzchniej części *lamina lucida* i stopniowo mniej widoczne na

poziomie dolnych części *lamina lucida*, *lamina densa* i *sublaminadensa* (Woźniak i wsp. 2005). Być może mikroskopia wielofotonowa (*multiphoton microscopy*) okaże się pomocna w opisanu patologii skórnej, także DEJ, w autoimmunizacyjnych dermatozach pęcherzowych (Ng i wsp. 2011).

Poszukiwanie systemu przeciwciało/antygen, który odgrywa pierwszoplanową rolę w patogenezie BP koncentruje się na podpopulacji rozpoznającej zewnątrzkomórkową (i potencjalnie związaną z przyleganiem) składową HD. Badania czynnościowe ujawniły, że myszy znokautowane pod względem genu BP230 posiadały HD pozbawione wewnętrznej płytki, w związku z czym dochodziło u nich do całkowitej separacji HD od sieci filamentów pośrednich (Yang i wsp. 1996). Poznanie i zrozumienie składu oraz struktury DEJ dostarczy wglądu w patofizjologię BP (Hashimi i wsp. 2011), co winno przełożyć się na rozwój diagnostyki BP, której wciąż brakuje jasno wyznaczonych kryteriów interpretacyjnych (Lipsker i wsp. 2010).

Na rycinie 1 przedstawiono schematyczny trójwymiarowy model podsumowujący aktualny pogląd na rolę cząsteczek zaangażowanych w budowę DEJ, a także ich wzajemne oddziaływanie. Model został skonstruowany na podstawie dostępnych dowodów biochemiczno-genetycznych oraz badań biologii komórki, jednak mimo wszystko nie przedstawia on struktury i funkcji DEJ w sposób wyczerpujący, gdyż wciąż jeszcze wiele szczegółów tych oddziaływań, zwłaszcza między białkami DEJ będącymi skomplikowanymi strukturami przestrzennymi, pozostaje nieodgadniętych. Dlatego też do wykorzystywania jedynie technik obrazowych, a pomijania technik biochemiczno-molekularnych, w różnicowaniu autoimmunizacyjnych dermatoz pęcherzowych z autoimmunizacją wobec białek DEJ należy odnosić się z ostrożnością.



Ryc. 1. Trójwymiarowy szkic DEJ obrazujący współdziałania i współzależności poszczególnych składowych DEJ. Poszczególne cząsteczki budujące DEJ oznaczono odpowiadającymi im kolorami: Czarny – filanty pośrednie keratyny, Granatowy – BP230, Brązowy – plectyna, Pomarańczowy – BP180, Różowy – podjednostki $\alpha 6$ i $\beta 4$ integryny, Ciemny zielony – CD151, Niebieski – lamininy, Szary – *erbB*, Czerwony – kolagen IV, Fioletowy – nidogen, Błękitny – włókienka zakotwiczące/ kolagen VII, Zielony – perlekan.

1.3. Wzbudzenie patologicznej autoimmunizacji w chorobach kręgu pęcherzycy

Określenie – pęcherzyca – obejmuje grupę chorób, w przebiegu których występują śródnabłonkowe pęcherze i nadżerki w obrębie skóry i/lub błon śluzowychwyścielonych nabłonkiem wielowarstwowym płaskim (Dańczak-Pazdrowska 2005, Dmochowski 2006d). Ponadto sugeruje się, że pojawiające się krwotoczne wykwity paznokciowe w przebiegu PV, będąc związane z ciężkością choroby, mogą być przydatne w ocenie prognostycznej stanu pacjenta (Szepietowski i wsp. 2001, Reich i wsp. 2008). Teorie patogenetyczne wskazują na zaangażowanie czynników genetycznych i środowiskowych,

odpowiedzialnych za przełamanie tolerancji immunologicznej względem poszczególnych kadheryn desmosomalnych.

1.3.1. Zaangażowanie mechanizmów centralnej tolerancji w patogenezie pęcherzycy

Autoimmunizacyjne dermatozy pęcherzowe winny być rozpatrywane jako wynik zaburzenia (utruty) tolerancji immunologicznej wobec poszczególnych białek własnych organizmu. Dla jasności, tolerancja immunologiczna będzie tu definiowana jako brak odpowiedzi układu immunologicznego ustroju na ściśle określony antygen przy nie stosowaniu leczenia immunosupresyjnego (Schuler i wsp. 2007). Złożone mechanizmy regulacji odpowiedzi autoimmunologicznej i utrzymania tolerancji wobec białek własnego organizmu (autotolerancji) zachodzą na wielu płaszczyznach obejmując mechanizmy tolerancji na drodze centralnej oraz obwodowej (Tsunoda i wsp. 2002, Zehn i wsp. 2006). Zdaje się, że mechanizmy prowadzące do autotolerancji są aktywne zarówno na poziomie limfocytów T, jak i B – te drugie pozostają jednak wciąż mniej zbadane (Tsunoda i wsp. 2002). Uprzednio obwodowa tolerancja była rozważana jako podstawowa z powodu wysokiego zróżnicowania organospecyficznych antygenów, które, jak wówczas wierzono, ulegają ekspresji tylko w narządach obwodowych. Ostatnie dane jednakże stwierdzają ekspresję szerokiego zakresu obwodowych antygenów w grasicy, szczególnie w komórkach epitelialnych rdzenia grasicy (*medullary thymic epithelial cells* - mTECs) (Takase i wsp. 2005, Wada i wsp. 2011). Centralna tolerancja dotyczy niedojrzałych limfocytów i ich różnicowania w pierwszorzędowych narządach limfatycznych – grasicy dla limfocytów T i szpiku kostnym dla limfocytów B (Wada i wsp. 2011). Autoreaktywne, niedojrzałe limfocyty T w grasicy (tymocyty) na drodze negatywnej lub pozytywnej selekcji są odpowiednio: usuwane lub podlegają procesowi dojrzewania (Mouquet i wsp. 2008, Wada i wsp. 2011). Tymocyty posiadające receptor antygenowy na komórkach T (*T cell receptor* - TCR) wykazujący zbyt wysokie powinowactwo do prezentowanych w grasicy przez główny kompleks zgodności tkankowej własnych antygenów (autoantygenów) ulegają apoptozie w wyniku delekcji klonalnej (negatywna selekcja), podczas gdy tymocyty z niewielkim lub średnim powinowactwem ulegają pozytywnej selekcji (Mouquet i wsp. 2008). Można zatem stwierdzić, że zakres i swoistość repertuaru limfocytów T jest determinowana przez zróżnicowanie ekspresji autoantygenów przez grasiczne APC (Mouquet i wsp. 2008). Do niedawna panował pogląd, że centralna tolerancja nie składa się na ograniczoną do tkanek prezentację własnego antygeny (Mouquet i wsp. 2008). Jednakże, z biegiem czasu, pogląd ten został zmieniony

w wyniku doniesień udowadniających, że szeroki zakres antygenów tkankowo swoistych ulega fizjologicznej ekspresji w ludzkiej grasicy (Sospedra i wsp. 1998, Derbinski i wsp. 2001). Zauważono, że w szczególności docelowe autoantygeny wielu chorób autoimmunizacyjnych ulegają ekspresji w grasicy (np. receptor acetylocholinowy, insulina, zasadowe białko mieliny) (Pribyl i wsp. 1996, Wakkach i wsp. 1996, Pugliese i wsp. 1997). Ponadto w mechanizmie centralnej tolerancji zachodzącej w grasicy czynnik transkrypcyjny Aire został zidentyfikowany jako promujący ekspresję wielu obwodowych organospecyficznym antygenów w mTECs, które służą jako ważne źródło autoantygenów w procesie negatywnej selekcji autoreaktywnych limfocytów T (Gavanescu i wsp. 2007, Wada i wsp. 2011). Postuluje się, że predyspozycje do występowania chorób autoimmunizacyjnych mogą być związane z poziomem ekspresji autoantygenów w grasicy, co już wcześniej było sugerowane dla insuliny (Pugliese i wsp. 1997, Vafiadis i wsp. 1997). Istotnym pozostaje by ustalić czy indywidualna zmienność grasiczej ekspresji autoantygenów jest biologicznie powszechnym zjawiskiem (Sospedra i wsp. 1998). Prawdopodobnie różnorodność repertuaru limfocytów T kształtuje się w czasie początkowych lat życia, aby osiągnąć fazę plateau w okresie dojrzałości płciowej. Można zatem podejrzewać, że ekspresja autoantygenów ulega obniżeniu wraz z wiekiem organizmu (Sospedra i wsp. 1998). Sugeruje się, iż inicjacja naturalnej tolerancji immunologicznej, mająca miejsce w grasicy, jest już ustanawiana w życiu embrionalnym (zapewne przez unieczynnienie komórek mających zdolność do samoreaktywności) (Whittingham i wsp. 1971). Ogólnie prognozuje się, że liczba autoantygenów ulegających ekspresji w grasicy powinna być niewielka. Jednakże wiadomo, że nawet niski poziom antygeny, który jest jedynie wykrywany na poziomie transkrypcyjnym metodą reakcji łańcuchowej polimerazy (*polimerase chain reaction* – PCR), może indukować tolerancję immunologiczną. Wspomniana indukcja tolerancji wobec poszczególnych antygenów może zatem wymagać istnienia ich reprezentacji w grasicy (Whittingham i wsp. 1971). Prawdopodobnie, rozwijająca się grasica zawiera większość dostępnych autoantygenów, stanowiąc pewnego rodzaju „immunologiczny homunkulus” (Whittingham i wsp. 1971). Wykazano również, że antygeny krążące na średnim lub nawet wysokim poziomie ulegają także ekspresji w grasicy, wskazując tym samym, że ich endogenna synteza jest zapewne potrzebna by indukować tolerancję w grasicy (Sospedra i wsp. 1998). Już dawno badacze zauważyli zastanawiający związek pomiędzy chorobami grasicy, szczególnie grasiczakiem, a chorobami autoimmunizacyjnymi, jak toczeń rumieniowaty układowy (*systemic lupus erythematosus* - SLE), nużność mięśni, czy choroby pęcherzowe skóry (Whittingham i

wsp. 1971, Krain 1974a, Cruz i wsp. 1987, Kondo i wsp. 2005, Shelly i wsp. 2011). Zauważono, że jeśli w okresie pourodzeniowym występują choroby grasicy mogące powodować zmiany w jej środowisku, w konsekwencji autoantygeny w grasicy stają się bardziej immunogenne niżli warunkujące tolerancję immunologiczną (Whittingham i wsp. 1971). Takiego rodzaju sekwencja zdarzeń może skutkować powstawaniem autoprzeciwciał wobec poszczególnych białek własnych ustroju (Whittingham i wsp. 1971). Powyższe kwestie pozostają kluczowe by poznać i zrozumieć patogenezę organospecyficznych chorób autoimmunizacyjnych, w tym chorób kręgu pęcherzycy.

Istotą chorób kręgu pęcherzycy jest utrata tolerancji wobec białek mediujących przyleganie między keratynocytami (Dmochowski 2006d). W przypadku PV i PF dochodzi do utraty tolerancji wobec desmoglein – DSG3 i DSG1 (Hertl i wsp. 2003). Jak zauważono, autoimmunizacja wobec DSG3 na poziomie limfocytów T i B jest zapewne procesem fizjologicznym (Dmochowski 2006d). Dane doświadczalne, pochodzące z badań nad znokautowanymi myszami, wykazują, że utrata tolerancji wobec DSG3 na poziomie limfocytów T i B jest wymagana do produkcji patogennych anti-DSG3 IgG i rozwoju fenotypu PV (Tsunoda i wsp. 2002). W świetle powyższego stwierdzenia istnieją różne możliwości wyjaśniające mechanizm tolerancji T komórkowej; przykładowo DSG3 reaktywne limfocyty T mogą być usuwane w grasicy, lub DSG3 reaktywne komórki mogą być obecne obwodowo, lecz w formie nieaktywnej (anergicznej), lub też DSG3 może nie być nigdy prezentowana przez komórki dendrytyczne DSG3 reaktywnym limfocytom T (Tsunoda i wsp. 2002). Możliwości dotyczące B komórkowej tolerancji mogą obejmować anergię lub delecję (Tsunoda i wsp. 2002). Postuluje się, że DSG3 ulega także ekspresji w ludzkich mTECs. Jednakże większość danych pochodzi z doświadczeń na myszach (Amagai i wsp. 1991), a ich ekspresja przez ludzkie mTECs pozostaje mniej poznana (Kyewski i wsp. 2004). Zapewne uszkodzona (wadliwa) ekspresja DSG3 przez mTACs może skutkować brakiem centralnej tolerancji i częściowo tłumaczyć patofizjologię chorób kręgu pęcherzycy (Kyewski i wsp. 2004). W ostatnim czasie badacze, stosując mysi model PV, poddali analizie poziom ekspresji DSG3 w grasicy na poziomie mRNA (Tsunoda i wsp. 2002). Przy użyciu metody PCR wykryli oni DSG3 mRNA w grasicy, ponadto wysunęli hipotezę, że większość reagujących z DSG3 limfocytów T jest w niej usuwana (Tsunoda i wsp. 2002). Co ciekawe, przy zastosowaniu tej samej techniki PCR DSG3 mRNA nie zostało wykryte w szpiku kostnym (Tsunoda i wsp. 2002). Do dnia dzisiejszego DSG3 w grasicy został także zidentyfikowany na poziomie RNA w bydłowej tkance grasicy (Schafer i wsp. 1994).

Niedawno podjęto próbę badania ekspresji i lokalizacji DSG3 w grasicy dzikich myszy na poziomie białka metodą immunohistochemiczną (Wada i wsp. 2011). Otrzymane wyniki stwierdzają, że DSG3 ulega nikłej ekspresji w małych podpopulacjach mTECs i jest ona rozproszona w pobliżu połączenia kory z rdzeniem grasicy. Kontynuując doświadczenie, analizowano ekspresję mRNA używając hybrydyzacji *in situ* i ukazując, że DSG3 mRNA ulegało ekspresji w niektórych komórkach rdzenia grasicy w pobliżu połączenia rdzeń-kora (Wada i wsp. 2011). Interesujące wyniki uzyskane techniką podwójnego barwienia immunofluorescencyjnego ujawniają, że DSG3-ekspresyjne mTECs ulegają koekspresji z innymi desmosomalnymi białkami, jak DSG1 i desmoplakiną (Wada i wsp. 2011). Analizując natomiast dane o tolerancji na poziomie limfocytów B, można zauważyć możliwość, że limfocyty B produkujące immunoglobuliny reaktywne wobec DSG3 nie są usuwane w szpiku kostnym i są obecne obwodowo w stadium anergicznym (Tsunoda i wsp. 2002).

Wiadomo również, że CD4+CD25+Foxp3+ limfocyty T regulatorowe (CD4+CD25+Foxp3+regulatory T cells - Tregs) są odpowiedzialne za tłumienie autoreaktywnej odpowiedzi immunologicznej (Yokoyama i wsp. 2011). Uważa się, że Tregs pełnią kluczową rolę w utrzymaniu autotolerancji immunologicznej przez hamowanie autoreaktywnych limfocytów T, w związku z czym niedobór Tregs może powodować choroby kręgu autoimmunizacji (Yokoyama i wsp. 2011). Zostało udowodnione, że Tregs rozwijają się w grasicy, jednak jest to proces wciąż słabo zbadany. Prawdopodobnie polega on na interakcji między TCR o dużym powinowactwie na ich komórkach i kompleksu antygeny/ ligandy MHC (Yokoyama i wsp. 2011). Zaangażowanie Tregs w autoimmunizacyjne choroby pęcherzowe jest kwestią sporną. Podjęto zatem badania charakteryzujące czy określony antygen jest zaangażowany w rozwój poliklonalnych Tregs w PV (Yokoyama i wsp. 2011). Wykazano, że anti-DSG3 IgG wydzielane przez autoreaktywne limfocyty B są wykrywane techniką ELISPOT w odpowiedzi na *in vitro* stymulację DSG3 obwodowych limfocytów pochodzących od pacjentów PV (Yokoyama i wsp. 2011). Wiadomo, że Tregs wydzielają Foxp3, czynnik transkrypcyjny, który odgrywa kluczową rolę w rozwoju i funkcji Tregs. Zostało również udowodnione, że komórki krwi obwodowej PV pacjentów zawierają obniżony poziom limfocytów T CD4+CD25^{high} w porównaniu do zdrowej kontroli (Yokoyama i wsp. 2011). Jednakże niestety ze względu na ograniczoną populację Treg nie przeprowadzono analizy czynnościowej. Dla pełniejszego obrazu należy tu przytoczyć, iż z danych wynika że w nieleczonym BP liczba i funkcja krążących CD4+CD25+Foxp3+ Tregs jest zbliżona do zdrowej kontroli (Rensing-Ehl i

wsp. 2007). Wciąż trwają dyskusje nad specyficznością antygenową Tregs jak również nad zapotrzebowaniem ekspresji antygeny w grasicy dla jego rozwoju (Yokoyama i wsp. 2011).

Niedawno podjęto również próbę określenia czy ekspresja DSG3 jest zależna od Aire (Wada i wsp. 2011). Badania wykazały, że Aire ma istotną rolę w ekspresji DSG3, jak również w selekcji limfocytów T, które pomagają limfocytom B produkować anty-DSG3 IgG w grasicy. Badania Aire (Wada i wsp. 2011) na zmutowanych pod względem genu Aire myszach (Aire+/+ i Aire -/-) wykazały, że DSG3-ekspresyjne mTECs nie były wykrywane w Aire-/- myszach. Aire-/- myszy nie rozwijały fenotypu PV i nie wykryto u nich wzbudzenia produkcji anty-DSG3 przeciwciał (brak wykrywalnego poziomu krążących przeciwciał) (Wada i wsp. 2011). Przedstawione badania potwierdzają możliwość, że Aire-zależna grasicza ekspresja DSG3 może wpływać na selekcję DSG3-specyficznych limfocytów T w grasicy do pewnego zasięgu. Jednakże dalsze doświadczenia są konieczne by zidentyfikować pozostałe czynniki, włączając poziom limfocytów B lub interakcje T-B komórkowe indukujące patogenne anty-DSG3 IgG zdolne do wywołania fenotypu PV (Wada i wsp. 2011).

Drugim istotnym autoantygenem chorób kręgu pęcherzycy jest DSG1, stanowiąca główny autoantygen w PF, jednak też ok. 50% pacjentów z PV ma przeciwciała anty-DSG1 (Ishii i wsp. 1997). W obydwu przypadkach produkcja anty-DSG1 przeciwciał jawi się jako zależna od DSG1-swoistych limfocytów T (Mouquet i wsp. 2008). Badacze chcąc poznać mechanizm zaangażowany w przełamanie tolerancji wobec DSG1 analizowali czy DSG1 ulega ekspresji w grasicy zarówno na poziomie transkrypcyjnym, jak i białkowym (Mouquet i wsp. 2008). Analiza PCR z DSG1-specyficznymi starterami wykazała, że zdecydowana większość normalnej ludzkiej grasicy (90,6% przebadanych próbek) wykazuje ekspresję *DSG1*. Ponadto analiza przy użyciu ilościowego real-time PCR udowodniła zmienną (wzrastającą) ekspresję transkryptów DSG1 wraz z wiekiem (Mouquet i wsp. 2008). Warto w tym miejscu przytoczyć ogólny pogląd, że grasicza podlega involucji związanej z wiekiem (Lynch i wsp. 2009), a niektóre doniesienia naukowe podają, że grasicza dorosłego człowieka (min. 49 lat) pozostaje aktywnym organem wspierającym różnicowanie limfocytów T. Jak już wspomniano wyżej, istnieją dane wskazujące, że umiarkowana redukcja ekspresji autoantygenów w grasicy zwiększa podatność na organospecyficzne choroby autoimmunizacyjne (Mouquet i wsp. 2008). W związku z tym faktem, można wnioskować, że wzrost transkrypcji DSG1 powinien mieć

działanie ochronne (warto przy tym zauważyć, że niektóre odmiany PF są często spotykane u młodszych niż u starszych osób) (Diaz i wsp. 1989, Bastuji-Garin i wsp. 1995).

Jednakże analiza poziomu białka z zastosowaniem immunoblotingu i różnych przeciwciał monoklonalnych nie pozwoliła na wykrycie białka (Mouquet i wsp. 2008). Badacze zastosowali więc metodę podwójnego barwienia immunofluorescencyjnego, która wykazała, że DSG1 ulega ekspresji na poziomie białka poprzez CD19+ CD63+ komórki zlokalizowane w rdzeniu grasicy (DSG1-pozytywne komórki kolokalizowały z CD19).

Powyższe dane sugerują nowy mechanizm kontrolny tolerancji limfocytów T wobec naskórkowych własnych antygenów zaangażowanych w organospecyficzne choroby autoimmunizacyjne. Ekspresja *DSG1* w grasicy sugeruje, że wywodzące się z *DSG1* białka mogą być dostępne dla tworzącego się repertuaru limfocytów T w grasicy i tym samym przyczyniać się do wzbudzenia tolerancji na poziomie centralnym. Jednakże należy pamiętać, że DSG1-reaktywne limfocyty T zostały zidentyfikowane nie tylko u pacjentów PF, lecz także u zdrowych osób, sugerując, iż dodatkowy mechanizm mający miejsce na poziomie obwodowym może być zaangażowany w tolerancję limfocytów T wobec DSG1 (Mouquet i wsp. 2008).

Analizując mechanizmy umożliwiające wyzwolenie autoimmunizacji należy dodatkowo wspomnieć o zjawiskach mimikry molekularnej (w opisywanym kontekście mimikry antygenowej) i ES. Proponuje się, że dwa wymienione procesy mają kluczowe znaczenie w rozwoju patologicznego stanu immunologicznego (Tchernev i wsp. 2006). Pod pojęciem mimikry antygenowej określa się wytwarzanie przeciwciał lub uczynnienie odporności zależnej od limfocytów T w wyniku strukturalnego podobieństwa determinantów antygenowych określonych czynników egzogennych lub też nowych determinantów generowanych endogennie do epitopów niektórych białek gospodarza. Różne czynniki bakteryjne, wirusowe czy farmakologiczne mające wysoką homologię do białek desmosomalnych gospodarza są główną egzogenną przyczyną wytwarzania przeciwciał, które są skierowane przeciwko białkom strukturalnym desmosomów. Powyższą tezę potwierdzają dane o występowaniu przypadków pęcherzycy po zakażeniu *varicella* (Goon i wsp. 2001) lub o zdolności zakażeń gronkowcowych do wzbudzenia nadpodstawnej akantolizy; jest to prawdopodobnie spowodowane akcją krzyżowo reagujących antybakteryjnych przeciwciał ze skórnymi determinantami. Medycznie indukowana mimikra antygenowa w pęcherzycy może być spowodowana tworzeniem przeciwciał wobec grup tiolowych niektórych leków, najczęściej inhibitorów konwertazy angiotensyny, jak np. kaptopril. Endogenne czynniki skutkujące mimikrą antygenową mogą obejmować

antygeny nowotworowe, których topologia jest identyczna lub podobna do kadheryn desmosomalnych. Przykładowo grasiczak lub mięsak Kaposiego wykazują powiązanie z chorobami pęcherzowymi skóry z powodu wytwarzania przeciwciał reagujących z takimi antygenami jak: desmoplakina-1 i desmoplakina-2, antygen o ciężarze 190 kDa (prawdopodobnie periplakina) i BP antygen 1 (230 kDa) (Wang i wsp. 2005, Tchernev i wsp. 2006). ES może także odgrywać rolę w patogenezie PV, szczególnie jeśli wrodzone nieprawidłowości występują w przypadku mechanizmów kontrolujących autoimmunizację lub gdy czynniki genetyczne predysponują do choroby. W przypadku PV ES skutkuje wykrywaniem z czasem większego zbioru przeciwciał przeciwko różnym celowanym antygenom. Antygenowo-specyficzna odpowiedź autoimmunizacyjna może się rozprzestrzeniać na różne epitopy jednego białka lub na epitopy innych białek strukturalnych. Co więcej, wszystkie wymienione czynniki mogą wpływać na kierunek i zasięg reaktywności epitopów i formowanie nowych przeciwciał, co może determinować niejednorodność manifestacji klinicznych PV (Tchernev i wsp. 2006). Zazwyczaj, ES jest generowane następnie po mimikrze antygenowej, zatem ES autoimmunizacyjnych może nie być możliwe bez inicjującego epizodu mimikry antygenowej (Tchernev i wsp. 2006).

1.3.2. Rola czynników środowiskowych i predyspozycji genetycznych w patogenezie pęcherzycy

W przełamaniu tolerancji immunologicznej i wyzwoleniu odpowiedzi limfocytów T wobec odpowiednich DSG odgrywają rolę zarówno czynniki genetyczne, jak i wyzwalacze środowiskowe. Wystąpienie pęcherzycy i jej późniejszy przebieg zależą więc od zmiennych oddziaływań pomiędzy predyspozycjami organizmu a czynnikami spustowymi. Zapewne rozwój pęcherzycy nie jest determinowany przez pojedyncze geny, ale wiele genów (w sposób poligeniczny), których efekt może być dodatkowo modyfikowany przez ich wzajemne epistatyczne oddziaływania oraz wpływ czynników pochodzenia zewnętrznego. Sugeruje się, że geny sprzężone z występowaniem choroby leżą w obrębie regionu klasy II kompleksu HLA (Hertl i wsp. 1998, Grando 2006) – w szczególności wymienia się fenotypy DR4,14 (precyzyjniej rzecz ujmując, allele DRB1*0402 i DRB1*1401 (Tron i wsp. 2005) i DQ1,3 (Kirtschig i wsp. 1999, Ruocco i wsp. 2003). Interesujące zdaje się, że występowanie choroby analizowane w różnych populacjach wykazuje różnice w obrębie poszczególnych grup etnicznych – przykładowo częstość występowania pęcherzycy jest wyższa u Żydów (głównie Aszkenazyjczków, których 92% posiada allel DRB1*0402) oraz w Japonii i Indiach w porównaniu do Ameryki Północnej

czy Europy Zachodniej (Tron i wsp. 2005). Istnieją dwa zasadnicze argumenty pochodzenia doświadczalnego przemawiające za genetycznym uwarunkowaniem pęcherzycy: (i) występuje ona częściej u pierwszorzędowych krewnych pacjentów PV w porównaniu do krewnych ze zdrowej kontroli (Firooz i wsp. 1994), (ii) przeciwciała anty-DSG3 są wykrywane u ok. 50% bezobjawowych rodziców pacjentów PV (Ahmed i wsp. 1993, Brandsen i wsp. 1997). Główny mechanizm wyjaśniający związek pomiędzy genami HLA i pęcherzycą polega na możliwej pomocy/wsparciu autoantygenów przez allele związane z chorobą w zapoczątkowaniu odpowiedzi autoimmunizacyjnej przez autoreaktywne limfocyty T (Hertl i wsp. 1998, Tron i wsp. 2005). Fascynująca pozostaje kwestia czy geny kodujące autoantygeny (DSG) są polimorficzne i jeśli tak, to czy polimorfizm jest częścią podatności na pęcherzycę (Tron i wsp. 2005). Analizując ten problem można zauważyć, że mutacje w DSG pozostają kwestią sporną. Wysuwa się hipotezy, że mutacje w DSG mogą być powiązane z procesem alternatywnego składania genów (powstają wówczas alternatywne transkrypty DSG, na matrycy których mogą być syntetyzowane sekwencje aminokwasowe odpowiedzialnie za przełamanie T-komórkowej tolerancji). Genetyczne zmiany mogą prowadzić do ilościowej i jakościowej zmienności autoantygenów. Niestety, na dzień dzisiejszy, dane doświadczalne nie zidentyfikowały konkretnych haplotypów odpowiedzialnych za wystąpienie pęcherzycy. Przeprowadzona niedawno analiza wariantów genetycznych DSG1 w odniesieniu do podatności na PF nie wykazała znaczących różnic między grupą chorych a kontrolą (Petzl-Erler i wsp. 2005), jak również nie udowodniła możliwej interakcji DSG1 z HLA-DRB1. Przypuszczalnie w podatności na chorobę uczestniczą też geny o silnym nierównomiernym sprzężeniu, tzw. nie zrównoważeniu sprzężeń (*linkage disequilibrium*) – między genami cząsteczki DR i DQ HLA, co utrudnia zidentyfikowanie prawdziwie usposabiających loci (Loiseau i wsp. 2000, Tron i wsp. 2005, Lee i wsp. 2006). Dalsze badania są konieczne w celu ustalenia podłoża genetycznego pęcherzycy, co umożliwi wyjaśnienie molekularnych mechanizmów leżących u jej podstaw oraz wprowadzenie diagnostyki molekularnej perspektywie tym zakresie (w dalszej perspektywie skutkujące nową, celowaną terapią oraz lekami dobranymi do danego genotypu chorego).

Jednakże same uwarunkowania genetyczne, chociaż ważne, zapewne nie są wystarczające do zapoczątkowania odpowiedzi autoimmunologicznej ustroju, czego dowodzą badania opisujące występowanie choroby u jednego spośród monozygotycznych bliźniąt lub u dwóch z trójki rodzeństwa posiadających identyczny haplotyp (Ruocco i wsp. 1985, Revenga-Arranz i wsp. 1996). Zatem czynniki spustowe (wyzwalacze) zdają się być

kluczowe do pełnego rozwinięcia choroby. Przy czym należy pamiętać, że grupa wyzwalających czynników środowiskowych jest liczna i niejednorodna. Większość czynników wyzwalających jest egzogennych i pochodzi bezpośrednio ze środowiska, ale są również czynniki endogenne (jak stres emocjonalny), powiązane z indywidualnym stylem życia. Grupa ta obejmuje niektóre leki, wirusy, czynniki fizyczne, alergeny kontaktowe, żywność i stres emocjonalny (Ruocco i wsp. 2003).

Wyzwalające leki mogą być pogrupowane według ich działania farmakologicznego (antybiotyki i chemioterapia, niesterydowe leki przeciwzapalne i leki przeciwreumatyczne, cytokiny i inne modulatory odpowiedzi immunologicznej, leki hipotensyjne, etc.) lub według ich struktury chemicznej (tiolowej, fenolowej etc.). W przypadku niektórych leków, ich potencjał do wywoływania zmian akantolitycznych został potwierdzony w badaniach doświadczalnych. Udowodniono, że w szczególności mogą one wywoływać akantolizę poprzez interferencję w biochemię błony keratynocytów (akantoliza biochemiczna) lub równowagę immunologiczną na skutek powstawania neoantygenów lub reakcji krzyżowych między przeciwciałami (akantoliza immunologiczna) (Wolf i wsp. 1997, Ruocco i wsp. 2003). Wykazano, że leki tiolowe jak penicylamina, kaptopryl, (Ruocco i wsp. 1990), tiopronina wywołują akantolityczne zmiany w eksplantatach normalnej ludzkiej skóry. Możliwy mechanizm wzbudzania przez nie pęcherzycy może przebiegać w różny sposób i polegać na: (i) tworzeniu tiolowo-cysteinowych połączeń zamiast połączeń typu cysteina-cysteina, co w konsekwencji zaburza przyleganie komórkowe; (ii) zahamowaniu lub uczynnieniu endogennych enzymów proteolitycznych, co oddziałuje na agregację keratynocytów (Lombardi i wsp. 1993, Ruocco i wsp. 2003).

W przypadku zakażeń wirusowych sugeruje się, że cytokiny (zwłaszcza interferony) produkowane przez gospodarza w odpowiedzi na atak cząstek wirusowych, wyzwalają nadaktywność układu immunologicznego (Ruocco i wsp. 2003). Wystąpienie pęcherzycy po zakażeniu wirusem herpes jako pierwszy opisał Krain w 1974 roku (Krain 1974b), a z czasem wysunięto wnioski o możliwym zaangażowaniu rodziny Herpesviridae w etiopatogenezę pęcherzycy (Brandão i wsp. 2011). Ponadto wykryto także przypadki choroby z towarzyszącymi wysokimi mianami przeciwciał po zakażeniu VZV i CMV (Sagi i wsp. 2008), a w zmianach skórnych pacjentów z pęcherzycą wykryto sekwencje HHV-8 DNA (Jang i wsp. 2000, Meibodi i wsp. 2010). Ostatnio dane piśmiennicze donoszą o współwystępowaniu pęcherzycy i zakażenia wirusem HIV (Marfatia i wsp. 2007, Sagi i wsp. 2008). Trwają dyskusje na temat udziału ludzkich endogennych retrowirusów (*humanendogenousretroviruses* - HERV) w wyzwoleniu/regulacji patologicznej

autoimmunizacji w pęcherzycy (Kowalczyk i wsp. 2009, Gornowicz i wsp. 2010b). Wstępne badania wskazują na możliwe zaangażowanie sekwencji HERV-H w patomechanizmie PV (Kowalczyk i wsp. 2009). Niemożność konsekwentnego wykrycia specyficznych patogenów u pęcherzycowych pacjentów sugeruje, że zakażenia wirusowe mogą być tylko dodatkowym, sporadycznym czynnikiem wyzwalającym chorobę w niespecyficzny sposób u genetycznie uwarunkowanego gospodarza.

Spośród czynników fizycznych za najistotniejszy uważa się promieniowanie UV, którego akantolityczny efekt na zdrowej skórze u pacjentów pęcherzycowych pacjentów jest znany od dawna (Igawa i wsp. 2004). W niektórych przypadkach światło słoneczne wywołuje krótkotrwałe formy pęcherzycy *ex novo* u zdrowych osobników, a u innych zaostrza już istniejącą formę. Ponadto dane o pęcherzycy indukowanej terapią PUVA (Fryer i wsp. 1994) mogą sugerować, że samo promieniowanie UVA jest odpowiedzialne za efekt wyzwalający chorobę. Również chirurgia i procedury kosmetyczne są także uważane za egzogenne czynniki spustowe (dane o pęcherzycowych zmianach skórnych pojawiających się w po przeszczepach skóry, elektrochirurgii, transplantacji włosów, pilingach chemicznych, etc.) (Kaplan i wsp. 1993, Micali i wsp. 1998).

Do czynników spustowych można również zaliczyć niektóre alergeny kontaktowe, a doniesienia naukowe wskazują tu głównie na pestycydy (Fisher i wsp. 2008). Niektórzy badacze postulują nawet używanie terminu „pęcherzyca kontaktowa” (*contact pemphigus*) w celu podkreślenia czynnika sprawczego (Brenner i wsp. 1994a). Ponadto interesujące wydają się dane opisujące pęcherzycę jako częściej występującą u osób niepalących niż palących (Sullivan i wsp. 2002). Prawdopodobne wytłumaczenie tego faktu może polegać na tym, że nikotyna jako agonista cholinergiczny interferuje z przeciwciałami anti-DSG3 i anti-DSG1 w stosunku do receptora acetylocholinowego i w ten sposób może działać jako czynnik chroniący/zapobiegający (następuje otwarcie kanałów jonowych w błonie komórkowej co pomaga zwiększyć przyleganie komórkowe, zatrzymać akantolizę) (Grando i wsp. 2000, Sullivan i wsp. 2002).

Istnieją nieliczne doniesienia wskazujące na elementy diety jako czynniki wyzwalające. W kontekście zwyczajów żywieniowych, wysoki wskaźnik zachorowań na pęcherzycę zauważony w populacji hinduskiej może być wiązany z częstym używaniem w ich kuchni przypraw (Tur i wsp. 1998). Istnieją również opisy przypadków pęcherzycy powiązanej z wysoką konsumpcją roślin z rodziny *Allium* (np. czosnek, cebula, por) (Brenner i wsp. 1994b, Brenner i wsp. 1995). Doświadczalne dane wskazują, że aktywne grupy tiolowe

zawarte w *Allium* mogą wywoływać biochemiczną akantolizę w normalnej ludzkiej skórze hodowanej *in vitro* (Ruocco i wsp. 2001, Ruocco i wsp. 2003).

Z powyższego zestawienia wynika, że pęcherzyca jest dermatozą o złożonych uwarunkowaniach genetyczno-środowiskowych. Istotność, oprócz predyspozycji genetycznych, czynników środowiskowych umożliwia zastosowanie odpowiedniej profilaktyki u podatnych osobników (manipulowanie czynnikami środowiskowymi w celu zapobieżenia/opóźnienia klinicznego ujawnienia się choroby).

2. CEL PRACY

Wobec braku w piśmiennictwie, zwłaszcza krajowym, wszechstronnego naświetlenia znaczenia autoimmunizacji wobec poszczególnych autoepitopów odpowiednich autoantygenów w DH, BPi pęcherzycy w stosunku do innych czynników patogenetycznych (w szczególności uwalniania enzymów proteolitycznych przez komórki zapalne pęcherza), czyli zależności między autoimmunizacją a zapaleniem, w niniejszej pracy podjęto badania, których celem była:

- ocena czynności neutrofilów w skórze pęcherzowo zmienionej poprzez barwienie immunohistochemiczne NE w DH, BP, PV i PF;
- ocena zależności pomiędzy poziomem autoprzeciwciał(anty-eTG, anty-tTG i anty-npG IgA w DH; anty-BP180 i anty-BP230 IgG w BP; anty-DSG1 i anty-DSG3 IgG w PV/PF) a nasileniem skórnych złogów NE;
- ocena przydatności testów immunoenzymatycznych ELISA wykrywających autoprzeciwciała anty-eTG, anty-tTG i anty-npG IgA do diagnostyki różnicowej chorych z DH;
- ocena czy u chorych na DH autoprzeciwciała anty-eTG IgAsą związane z uczynnieniem eozynofilów badanym stężeniem EDN/RNazy 2;
- ocena zależności między nasileniem ekspresji eTG w skórze w sąsiedztwie DEJ a poziomem autoprzeciwciałanty-eTG IgAu chorych na DH;
- ocena czynności eozynofilów w skórze pęcherzowo zmienionejpoprzez barwienie immunohistochemiczne MBP w BP;
- ocena poziomu autoprzeciwciałanty-BP180 i anty-BP230 IgG w surowicy i płynie pęcherzowym u chorych z BP;
- analiza występowania pęcherzycowych złogów włosowych i autoprzeciwciałanty-DSG1 i anty-DSG3 IgG u pierwszorzędowych bezobjawowych krewnych osób z pęcherzycą.

3. MATERIAŁY I METODY

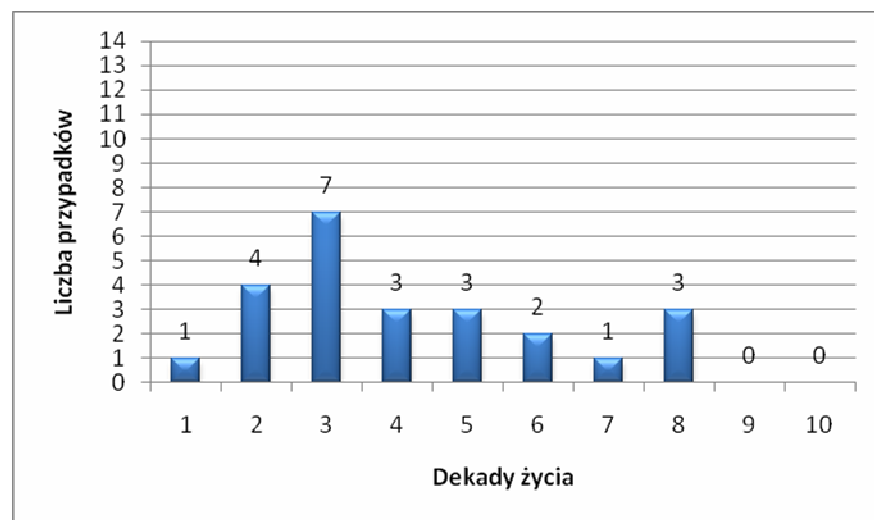
3.1. Materiał

3.1.1. Grupy badane

3.1.1.1. Chorzy na DH, BP i pęcherzycę

Badania uzyskały zgodę lokalnej Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu na mocy uchwały nr 422/09 z dnia 06 maja 2009r. Ogółem zbadano 112 chorych na autoimmunizacyjne dermatozy pęcherzowe i wyodrębniono 3 podgrupy w zależności od rozpoznanej jednostki chorobowej:

- Chorzy na DH stanowili ogółem 56 osób, w tym 21 kobiet (37,5%) i 35 mężczyzn (62,5%), będących w aktywnym stadium choroby. Strukturę wieku w chwili zachorowania, wyznaczoną dla 24 pacjentów poddanych analizie ekspresji NE, przedstawia rycina 2. Rozpoznanie DH stawiano na podstawie obrazu klinicznego i charakterystycznego obrazu histologicznego. Decydującym kryterium było stwierdzenie złogów immunoreaktantów w klasie IgA wykazujących jeden z 7 charakterystycznych typów świecenia (ziarnisty i/lub włóknikowy w szczytach brodawk skórných i/lub wzdłuż DEJ i ich wzajemne kombinacje) wykrywanych techniką DIF. Ponadto uwzględniono wyniki badania użytkowym poziomie molekularnym anty-tTG i anty-npG IgA ELISA.

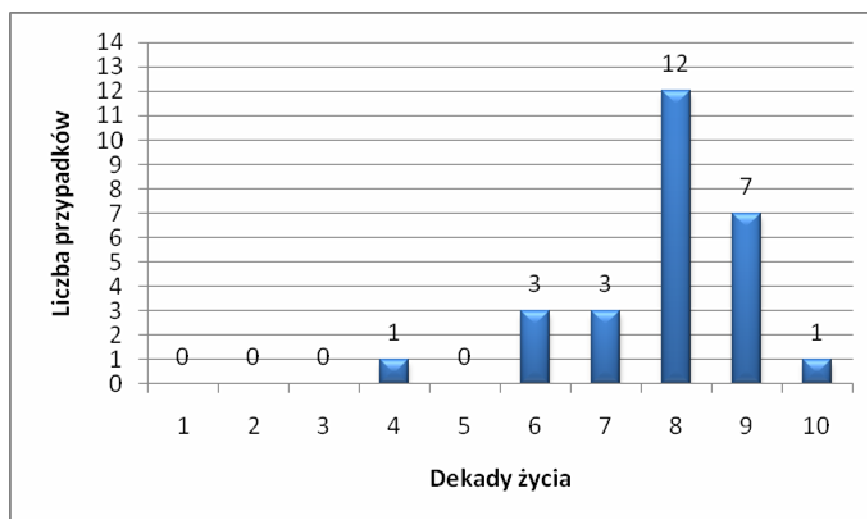


Ryc. 2. Struktura wieku w chwili zachorowania wyznaczona dla chorych z DH.

- Chorzy na BP stanowili 28 osób, w tym 14 kobiet (50%) i 14 mężczyzn (50%) będących w aktywnym stadium choroby. Strukturę wieku w chwili zachorowania przedstawia rycina 3. Rozpoznanie BP stawiano na podstawie obrazu

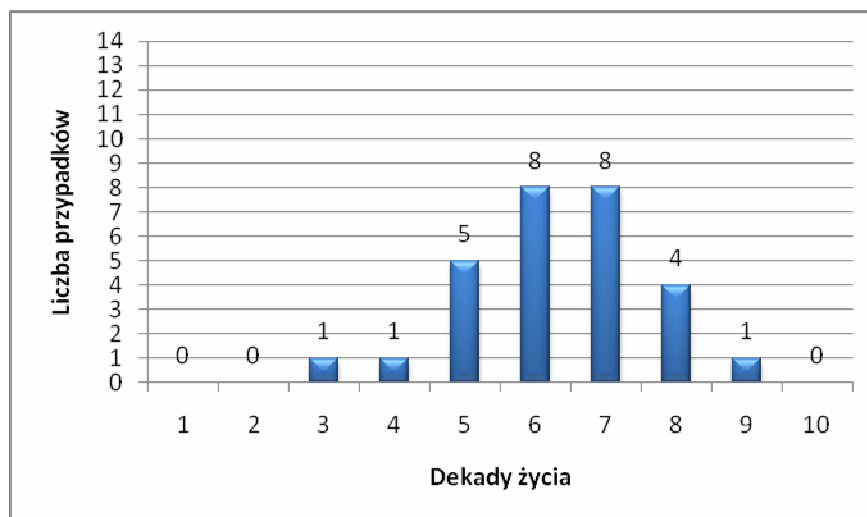
klinicznego

i sugestywnego obrazu histologicznego. Istotnym kryterium byłostwierdzenie złogów immunoreaktantów (IgG, IgG1, IgG4, C3), o typowej morfologii (linijne złogi układające się sinusoidalnie), wzdłuż DEJ wykrywanych techniką DIF. Ponadto uwzględniono wyniki badania użytkowym poziomie molekularnym anty-BP180 i anty-BP230 IgG ELISA.



Ryc. 3. Struktura wieku w chwili zachorowania wyznaczona dla chorych z BP.

- Chorzy na pęcherzycę stanowili 28 osób, w tym 15 kobiet (54%) i 13 mężczyzn (46%), będących w aktywnym stadium choroby. Strukturę wieku w chwili zachorowania przedstawia rycina 4. U 23 przypadków zdiagnozowano PV, w tym 19 osób z postacią skórno-śluzówkową i 4 osoby z postacią śluzówkowodominującą PV (pisane zgodnie ze wskazówką poradni językowej Wydawnictwa Naukowego PWN www.poradnia.pwn.pl), a w 5 przypadkach rozpoznano PF. Kryterium włączenia do badań stanowiła obecność przewlekłych zmian pęcherzowych i/lub nadżerkowych na skórze i/ lub błonach śluzowych mająca miejsce w czasie aktualnym lub podana w wywiadzie. Rozpoznanie pęcherzycy stawiano dodatkowo na podstawie charakterystycznego obrazu histologicznego i badania immunofluorescencyjnego (DIF i IIF). Decydującym kryterium byłostwierdzenie złogów IgG, IgG1, IgG4, i C3 wykazujących świecenie o typie sieci rybackiej w całym żywym naskórku, w dolnych (bardziej charakterystyczne dla PV) lub górnych (bardziej charakterystyczne dla PF) jego warstwach (Dmochowski 2006d). Poszukiwano także świecenia w obrębie nabłonkowych struktur przydatków. Ponadto uwzględniono wyniki badania użytkowym poziomie molekularnym anty-DSG1 i anty-DSG3 IgG ELISA.



Ryc. 4. Struktura wieku w chwili zachorowania wyznaczona dla chorych z pęcherzycą.

3.1.1.2. Bezobjawowi krewni chorych z pęcherzycą

Zbadano 28 zdrowych krewnych w linii prostej chorych z pęcherzycą i 2 zdrowych krewnych w linii bocznej chorego z pęcherzycą (łącznie 30 surowic i 30 próbek włosów), w tym

- 24 probantów stanowiło zstępnych krewnych chorych na PV,
- 2 probantów stanowiło zstępnych krewnych chorych na PF,
- 2 probantów stanowiło wstępnych krewnych chorych na PV,
- 2 probantów stanowiło krewnych w linii bocznej (rodzeństwo) chorych na PV.

Osoby te nie wykazywały klinicznych oraz jednoznacznych immunopatologicznych cech tych chorób.

3.1.1.3. Grupy kontrolne

Chorzy na DH, BP i pęcherzycę stanowili wzajemne pozytywne grupy kontrolne. Ponadto w poszczególnych analizach w pracy ujęto następujące grupy kontrolne:

- 25 chorych na IgA/neutrofilowo-mediowane dermatozy nie będące DH, jako, z punktu widzenia patofizjologii skórnej, jednostki chorobowe najbliższe patogenetycznie DH, w tym:
 - 17 przypadków linijnej IgA dermatozy pęcherzowej (LABD),
 - 4 przypadki pęcherzycy IgA,
 - 3 przypadki nabytego pęcherzowego oddzielania się naskórka (EBA),
 - 1 przypadek choroby Sneddon-Wilkinsona,

-
- 24 osoby należące do negatywnej grupy kontrolnej (osoby zdrowe), niespokrewnionych z chorymi na autoimmunizacyjne dermatozy pęcherzowe.

3.1.2. Surowice

Od osób chorych i zdrowych pobrano 5 ml krwi na skrzep, odwirowano i odpipetowano surowice, którą podzielono na alikwoty stabilizowane dodatkiem 0,1% azydku sodu w proporcji 1:100, a następnie przechowywano w temperaturze -20°C do momentu wykonywania oznaczeń.

3.1.3. Płyn pęcherzowy

Od chorych na BP prezentujących świeże zmiany pęcherzowe, pobrano ok. 100 µl płynu z pęcherza oczasie trwania krótszym od doby, a następnie przechowywano w temperaturze -20°C do momentu wykonywania oznaczeń.

3.1.4. Wycinki skórne

Materiał do diagnostycznych badań histopatologicznych i badań immunohistochemicznych stanowiły wycinki skórne od chorych na DH, BP i pęcherzycę, będące w dużej mierze skrawkami archiwalnymi, a wszystkie pochodzące z rutynowych badań diagnostycznych. Wycinki, o największym wymiarze nie przekraczającym 5 mm, zostały pobrane z okolicy miejsc zmienionych chorobowo, obejmujących świeże wykwyty, trwające mniej niż 24 godziny, po uprzednim znieczuleniu miejscowym 2% roztworem lignokainy. Wycinki utrwalono następnie w 10% buforowanej formalinie i zatopiono w parafinie. Skrojone skrawki, grubości 4 µm, naklejono na szkiełka podstawowe pokryte 0001% roztworem poli-1-lizyny (Sigma).

Materiał do diagnostycznej i badawczej DIF stanowiły wycinki skórne od chorych na pęcherzycę, BP i DH. Wycinki te, o największym wymiarze nie przekraczającym 5 mm, zostały pobrane z miejsc okołowykwitowych, niezmienionych chorobowo (*perilesional skin/mucous membrane*), po uprzednim znieczuleniu miejscowym 2% roztworem lignokainy, następnie zatopione w medium OCT (Tissue-tec) i zamrożone w temperaturze -23°C w kriostacie Cryocut 1800 (Reichert-Yung, Leica), skrojone na skrawki o grubości 4 µm i naklejone na szkiełka podstawowe.

3.1.5. Włosy

Do badania DIF we włosie pobrano włosy od 30 zdrowych krewnych chorych z pęcherzycą. Włosy wraz z cebulkami wrywano z owłosionej skóry głowy w ilości 20-30

od jednej osoby, układano równolegle, zatapiano w medium OTC (Tissue-tec) i zamrażano w temperaturze -23°C w kriostacie Cryocut 1800 (Reichert-Yung, Leica), a następnie krojono na skrawki o grubości $4\ \mu\text{m}$ i naklejano na szkiełka podstawowe pokryte 0,001% roztworem poli-l-lizyny (Sigma).

3.2. Metody

3.2.1. Metody diagnostyczne

3.2.1.1. Badanie histologiczne

Wycinki skórne pobrane od chorych na DH, BP i pęcherzycę zatopiono w parafinie i rutynowo zabarwiono hematoksyliną i eozyną (H+E). W obrazie histologicznym poszukiwano następujących cech:

- DH - obecności mikroropni ze znaczną przewagą liczbową neutrofilów i domieszką eozynofiliów na szczytach warstwy brodawkowatej skóry właściwej oraz podnaskórkowych szczelin zlokalizowanych ponad mikroropniami (Wolnik-Trzeciak 2005a);
- BP – podnaskórkowych pęcherzy nacieku zapalnego w okolicy DEJ, w którym dominują eozynofile;
- Pęcherzycy - ciągłej szczeliny między warstwą podstawną a kolczystą (PV) lub w górnej części warstwy kolczystej i/lub warstwie ziarnistej (PF) w naskórku i nabłonkowych strukturach przydatków z okrągłymi, luźnymi, akantolitycznymi keratynocytami oraz zmienną liczbą eozynofiliów i neutrofilów; obrazu określanego jako rząd nagrobków (*row of tombstones*) (PV) (Dańczak-Pazdrowska 2005).

3.2.1.2. Badanie złogów IgA, IgM, IgG i C3 metodą DIF w skórze chorych z DH, BP i pęcherzycą, na skrawkach mrożonych

Badaniom poddano wycinki skórne/błony śluzowej pobrane z okolicy zmian pęcherzowych (*perilesional skin/mucous membrane*) od 56 chorych na DH, 28 chorych na BP i 28 chorych na pęcherzycę. Mrożone skrawki zadano sprzężonymi z FITC poliklonalnymi przeciwciałami króliczymi przeciwko ludzkim IgA, IgM, IgG, C3 (Dako, Dania) w rozcieńczeniu 1:100 w PBS o pH 7,2 i inkubowano w wilgotnej komorze w temperaturze pokojowej przez 60 min. Następnie preparaty płukano przez 15 min. na wytrząsarce w PBS o pH 7,2 i po nałożeniu kropli 10% roztworu gliceryny w PBS o pH 8,4 pokryto szkiełkiem nakrywkowym (Bowszyc-Dmochowska 2002).

3.2.2. Metody diagnostyczno-badawcze

3.2.2.1. Badanie złogów IgG1, IgG4 metodą DIF w skórze chorych z BP oraz w skórze/błonie śluzowej chorych z pęcherzycą na skrawkach mrożonych

Badaniom poddano wycinki skórne/błony śluzowej pobrane z sąsiedztwa zmian pęcherzowych (*perilesional skin/mucous membrane*) od 28 chorych na BP i 28 chorych na pęcherzycę. Mrożone skrawki zadano sprzężonymi z FITC monoklonalnymi przeciwciałami mysimi przeciwko ludzkim IgG1 i IgG4 (Sigma) w rozcieńczeniu 1:100 w PBS o pH 7,2 i inkubowano w wilgotnej komorze w temperaturze pokojowej przez 60 min. Następnie płukano na wytrząsarce w PBS o pH 7,2 i po nałożeniu kropli 10% roztworu gliceryny w PBS o pH 8,4 pokryto szkiełkiem nakrywkowym (Bowszyc-Dmochowska 2002).

3.2.2.2. Badanie przeciwciał krążących w klasie IgG, IgG1 i IgG4 metodą IIF u chorych na BP i pęcherzycę

Badaniom poddano 28 surowic od chorych z BP (we wszystkich surowicach oznaczano przeciwciała krążące w klasie IgG, w 7 przypadkach w podklasie IgG4 i w 1 przypadku w podklasie IgG1) i 28 surowic od chorych z pęcherzycą (we wszystkich surowicach oznaczano przeciwciała krążące w klasie IgG i w 10 przypadkach w podklasie IgG4). Reakcję wykonano przy użyciu komercyjnie dostępnego zestawu do IIF zawierającego płytki mikroskopowe opłaszczane zamrożonymi skrawkami przełyku małpy jako substrat zwierzęcy (Euroimmun, Niemcy). W celu ustalenia miana surowice rozcieńczano tworząc gradient stężeń (1:20, 1:80, 1:160 i 1:320) w PBS-Tween o pH 7,2, a następnie наносzono na pole płytki mikroskopowej 30 μ l analizowanej próbki. Inkubacja odbywała się w temperaturze pokojowej przez 30 min. Następnie płytkę płukano przez 5 min. w PBS-Tween o pH 7,2, наносzono na pola reakcyjne po 25 μ l znakowanych fluoresceiną kozich przeciwciał przeciwko ludzkim IgG (zawarte w zestawie i gotowe do użycia) lub mysich przeciwciał przeciwko ludzkim IgG1 i IgG4 (Sigma) w rozcieńczeniu 1:100 i inkubowano przez 30 min. w temperaturze pokojowej. Po ponownym płukaniu w PBS-Tween o pH 7,2 nałożono kroplę 10% roztworu gliceryny w PBS o pH 8,4 i pokryto szkiełkiem nakrywkowym. Każde badanie przeprowadzano z użyciem pozytywnej surowicy kontrolnej załączonej w zestawie. W badaniu oceniano, dające charakterystyczny obraz świecenia, wiązanie się przeciwciał wobec desmosomów warstwy kolczystej nabłonka w

przypadku pęcherzycy oraz przeciwciał przeciwko błonie podstawnej nabłonka w przypadku BP.

3.2.2.3. Badanie przeciwciał krążących IgA przeciwko eTG, tTG i npG metodą immunoenzymatyczną ELISA u chorych z DH

Poziomy przeciwciał IgA przeciwko eTG, tTG i npG badano łącznie w 56 surowicach DH. Badania wykonano gotowymi zestawami „Anti epidermal transglutaminase IgA” (Immundiagnostic AG, Niemcy), „Anty-Transglutaminaza tkankowa ELISA (IgA)”, „Anti-Gliadin (GAF-3X) ELISA (IgA)” (Euroimmun, Niemcy), przeznaczonych do oceny krążących IgA przeciwko, odpowiednio, eTG, tTG i npG, zgodnie z podanymi przez producentów metodykami.

W przypadku oceny IgA przeciwko eTG badaniu poddano 49 surowic pacjentów z DH. W celu analizy poziomu przeciwciał krążących stosowano test „Anti epidermal transglutaminase IgA” (Immundiagnostic AG, Niemcy), surowice rozcieńczono dwustopniowo w buforze dołączonym do zestawu (*ELISAwashbuffer*) w celu uzyskania stosunku rozcieńczenia 1:250 i наносzono po 100 µl próbki na kolejne dołki płytki mikrotitracyjnej opłaszczonej ludzką eTG. Każdorazowo wykonywano kontrolę ujemną i dodatnią (załączone do zestawu). Następnie inkubowano przez 60 minut w temperaturze pokojowej, bez dostępu światła. Po pięciokrotnym płukaniu w załączonym do zestawu roztworze myjącym dodawano 100 µl sprzężonego z peroksydazą chrzanową króliczego przeciwciała przeciwko IgA (*PODantibody*) i ponownie inkubowano przez 60 minut w tych samych warunkach. Po kolejnym etapie płukania dodawano 100 µl substratu dla peroksydazy chrzanowej (czterometylobenzydyna) i inkubowano przez 15 minut w tych samych warunkach. Celem zatrzymania reakcji dodawano 50 µl kwasu siarkowego (*ELISAstopsolution*). Wyniki oceniano fotometrycznie przy długości fali 450nm czytnikiem do ELISA (Metertech). Jeżeli uzyskiwano wynik, w którym reakcja była zbyt intensywna, aby mogła być oceniona numerycznie kontynuowano rozcieńczenie surowicy w stosunku 1:5000, 1:1000 i 1:2000. Producent podaje wartości przeciwciał w AU/ml (*arbitraryunits/ml*) i wskazuje obliczenie ich poziomu według wzoru:

Średnia OD kontroli negatywnej x 3,0 = punkt odcięcia = Z

Stąd:

Punkt odcięcia (OD) = 18 AU/ml

próbka = X

$$\text{więc: } \text{AU/ml} = \frac{\text{OD}_{\text{próbki}} \times 18}{z}$$

gdzie: OD (*OpticalDensity*) – gęstość optyczna

W przypadku oceny IgA przeciwko tTG badaniu poddano 32 surowic pacjentów z DH.W celu analizy poziomu przeciwciał krążących stosowano test „Anty-Transglutaminaza tkankowa ELISA (IgA)” (Euroimmun, Niemcy), surowice rozcieńczano w stosunku 1:201w buforze do rozcieńczania i wymieszano przez worteksowanie. Każdorazowo stosowano surowice kalibracyjne oraz pozytywną i negatywną kontrolę, zawarte w zestawie. Studzienki reakcyjne zostały opłaszczane rekombinowaną tTG, gdzie ekspresję odpowiedniego ludzkiego cDNA uzyskano stosując wektor ekspresyjny oparty na systemie bakulowirusy-komórki owadzie. Do studzienek reakcyjnych nakrapiano po 100 µl próbek, kalibratorów i kontrole. Inkubowano 30 min. w temp. pokojowej. Następnie trzykrotnie płukano 300 µl buforu płuczającego, po czym dodawano po 100 µl roztworu koniugatu enzymatycznego i inkubowano 30 min. w tych samych warunkach. Po kolejnym procesie płukania nakropiono 100 µl roztworu substratu, inkubowano 15 min. chroniąc przed nasłonecznieniem i dodano po 100 µl roztworu przerywającego reakcję. Intensywność wybarwienia studzienek oceniano fotometrycznie przy długości fali 450 nm przy użyciu czytnika wyposażonego w oprogramowanie MikroWin 2000. Punkt odcięcia dla tego testu podawany przez producenta wynosi 20 RU/ml i taki też stosowano w niniejszej pracy.

W przypadku oceny IgA wobec npG badaniu poddano 30 surowic pacjentów z DH.W celu analizy poziomu przeciwciał krążących stosowano test „Anti-Gliadin (GAF-3X) ELISA (IgA)” (Euroimmun, Niemcy). Zastosowany w teście antygen stanowi rekombinowane białko fuzyjne, które powstało w wyniku fuzji sekwencji DNA kodujących analogi gliadyny (*gliadin-analogousfusionpeptide* – GAF), zawierające trzy powtarzające się sekwencje w celu zwiększenia skuteczności diagnostycznej. W niniejszej pracy określenie GAF jest synonimicznie dla npG. W skład tak powstałego białka wchodzi syntetyczny nonapeptyd będący analogiem gliadyny oraz nonapeptyd części strawionej gliadyny, która została deamidowana przez transglutaminazy. Metodykę przeprowadzono analogicznie jak w przypadku opisanej wyżej „Anty-Transglutaminaza tkankowa ELISA (IgA)” (Euroimmun, Niemcy), przy czym punkt odcięcia „Anti-Gliadin (GAF-3X) ELISA (IgA)” podany przez producenta i stosowany w prezentowanej pracy wynosi 25 RU/ml.

3.2.2.4. Badanie przeciwciał krążących IgG przeciwko BP180 i BP230 metodą immunoenzymatyczną ELISA u chorych z BP

Poziomy przeciwciał IgG przeciwko BP180 i BP230 badano łącznie w 28 płynach pęcherzowych i surowicach BP. Badanie wykonano gotowymi zestawami MESACUP TEST BP180 i MESACUP TEST BP230 (MBL, Medical & Biological Laboratories, Japonia), przeznaczonych do oceny krążących IgG przeciwko BP180 i BP230, zgodnie z podaną przez producenta metodyką. Surowice rozcieńczano w stosunku 1:101 w roztworze rozcieńczającym (*assaydilluent*) i nakrapiano po 100 μ l na studzienki reakcyjne opłaszczone w przypadku MESACUP TEST BP180 rekombinowaną domeną BP180NC16a, uznawaną za najbardziej immunogenną w patogenezie BP, lub w przypadku MESACUP TEST BP230 rekombinowanym białkiem zawierającym zarówno część N-terminalną i C-terminalną BP230. Każdorazowo wykonywano kontrolę ujemną i dodatnią (załączone do zestawu). Próby inkubowano przez 60 min. w temperaturze pokojowej, po czym przeprowadzono czterokrotne płukanie w roztworze płuczącym (*washsolution*) i dodawano 100 μ l sprzężonego z peroksydazą chrzanową monoklonalnego przeciwciała przeciwko ludzkim IgG (*conjugatesolution*) i ponownie inkubowano przez 60 min. w tych samych warunkach. Po kolejnym etapie płukania dodawano 100 μ l substratu dla peroksydazy chrzanowej i inkubowano przez 30 min. w tych samych warunkach. Celem przerwania reakcji dodawano 100 μ l roztworu zatrzymującego (*stopsolution*). Wyniki oceniano fotometrycznie przy długości fali 450 nm czytnikiem do ELISA (Metertech). Wartość indeksu obliczano według wzoru podanego przez producenta:

gdzie:

WI – wartość indeksu,

$A_{450\text{próbk}}$ – jest wartością absorbancji przy długości fali 450 nm badanej próby,

$A_{450\text{kalibrator1}}$ – jest wartością absorbancji przy długości fali 450 nm kontroli ujemnej,

$A_{450\text{kalibrator2}}$ – jest wartością absorbancji przy długości fali 450 nm kontroli dodatniej.

Obecnie producent w zestawach do celów diagnostycznych zaleca przedstawianie wyników w jednostkach U/ml (*units/ml*). Jak podaje producent zakres testu obejmuje wartości pomiędzy 5 a 150 U/ml. Powyżej 150 U/ml sugeruje podawanie wyniku jako „>150”. W niniejszej pracy, w części przypadków, uzyskiwano wartości absorbancji próbek poniżej wartości absorbancji dla negatywnej kontroli. Dla wyników tych przyjęto WI 0. Zgodnie z zaleceniami producenta za punkty odcięcia w obu testach przyjęto 9 U/ml.

3.2.2.5. Badanie przeciwciał krążących IgG przeciwko DSG1 i DSG3 metodą immunoenzymatyczną ELISA u chorych z pęcherzycą

Poziomy przeciwciał IgG przeciwko DSG1 i DSG3 badano w 23 surowicach PV, 5 surowicach PF i 30 surowicach pozyskanych od bezobjawowych krewnych chorych z pęcherzycą. Badanie wykonano gotowymi zestawami MESACUP Desmoglein TEST DSG1 i MESACUP Desmoglein TEST DSG3 (MBL, Medical & Biological Laboratories, Japonia), przeznaczonych do oceny krążących IgG przeciwko DSG1 i DSG3, zgodnie z podaną przez producenta metodyką. Surowice rozcieńczano w stosunku 1:101 w roztworze rozcieńczającym (*assaydilluent*) i nakrapiano po 100 µl na studzienki reakcyjne opłaszczone rekombinowanym zewnątrzkomórkowym fragmentem DSG1/DSG3. Każdorazowo wykonywano obecne w zestawie kontrole ujemne i dodatnie. Próby inkubowano przez 60 min. w temperaturze pokojowej, po czym przeprowadzono czterokrotne płukanie w roztworze płuczającym (*washsolution*) i dodawano 100 µl sprzężonego z peroksydazą chrzanową monoklonalnego przeciwciała przeciwko ludzkim IgG (*conjugatesolution*) i ponownie inkubowano przez 60 min. w tych samych warunkach. Po kolejnym etapie płukania dodawano 100 µl substratu dla peroksydazy chrzanowej i inkubowano przez 30 min. w tych samych warunkach. Celem przzerwiania reakcji dodawano 100 µl roztworu zatrzymującego (*stopsolution*). Wyniki oceniano fotometrycznie przy długości fali 450 nm czytnikiem do ELISA (Metertech). Wartość indeksu, odzwierciedlającego poziom krążących IgG, obliczano według wzoru podanego przez producenta:

gdzie:

WI – wartość indeksu,

$A_{450\text{próbk}}a$ – jest wartością absorbancji przy długości fali 450 nm badanej próby,

$A_{450\text{kalibrator}1}$ – jest wartością absorbancji przy długości fali 450 nm kontroli ujemnej,

$A_{450\text{kalibrator}2}$ – jest wartością absorbancji przy długości fali 450 nm kontroli dodatniej.

W przypadku uzyskania zbyt intensywnej reakcji, aby mogła być oceniona numerycznie kontynuowano rozcieńczenie surowicy w stosunku 1:500 i 1:1000.

W zestawach omawianych testów immunoenzymatycznych przeznaczonych do celów diagnostycznych producent zaleca przedstawianie wyników w jednostkach U/ml (*units/ml*), podając przy tym zakres testu obejmujący wartości pomiędzy 5 a 150 U/ml. Dla WI

osiągających wartości powyżej 150 U/ml sugeruje podawanie wyniku jako „>150”. W niniejszej pracy, w części przypadków, uzyskiwano wartości absorbancji próbek poniżej wartości absorbancji dla negatywnej kontroli. Dla wyników tych przyjęto WI 0. Producent podaje interpretację wyników dla poziomu anty-DSG1 IgG <14 jako ujemne, 14-20 pośrednie i >20 U/ml pozytywne. Producent podaje interpretację wyników dla poziomu anty-DSG3 IgG <7 jako ujemne, 7-17 pośrednie i >17 U/ml pozytywne. Zgodnie z badaniami wykorzystującymi analizę krzywych ROC i przeprowadzonymi w 2005 roku (Dańczak-Pazdrowska 2005), mającymi na celu ustalenie punktu odcięcia właściwego dla Pracowni Histopatologii i Immunopatologii Skóry UM w Poznaniu, za najbardziej optymalne punkty odcięcia przyjęto 41 U/ml dla MESACUP Desmoglein TEST DSG1 i 40 U/ml dla MESACUP Desmoglein TEST DSG3 i takie też stosowano w niniejszej pracy.

3.2.3. Metody badawcze

3.2.3.1. Badanie elastazy neutrofilów (NE) w naturalnej zmianie pęcherzowej metodą immunohistochemiczną na skrawkach parafinowych

Parafinowe skrawki skórne od 24 pacjentów z DH, 27 pacjentów BP i 28 osób z pęcherzycą pobrane ze zmian chorobowych, rutynowo odparafinowano w ksylenie i nawodniono przeprowadzając przez szereg alkoholi. W celu wizualizacji reakcji używano gotowego zestawu „LSAB + System HRP” (Dako, Dania). Na skrawki nakropiono 3% nadtlenek wodoru (*peroxidaseblock*) blokujący aktywność endogennej peroksydazy i inkubowano przez 5 minut w komorze wilgotnej w temperaturze pokojowej. Następnie w celu ułatwienia penetracji przeciwciał i udostępnienia większej ilości determinant antygenowych skrawki poddano enzymatycznemu trawieniu proteinazą K (Dako, Dania) przez 5 minut w komorze wilgotnej w temperaturze pokojowej. Później skrawki pokryto 100 µl pierwszostopniowego przeciwciałarozcieńczonego w 1% roztworze surowicy bydlęcej (Sigma) w PBS (1% BSA/PBS). Użyto monoklonalnego mysiego przeciwciała przeciwko ludzkiej NE klon NP57 (Dako, Dania) w rozcieńczeniu 1:100. Skrawki inkubowano przez godzinę w komorze wilgotnej w temperaturze pokojowej. Następnie skrawki inkubowano przez 15 minut ze streptawidyną sprzężoną z peroksydazą chrzanową (Streptavidin-HRP) i wybarwiono diaminobenzzydynam (DAB+ chromogen). Do płukania i rozcieńczania wymienionych odczynników używano PBS o pH 7,2. Na zakończenie preparaty wybarwiono w roztworze hematoksyliny Harrisa (Sigma), płukano bieżącą wodą przez 10min., przeprowadzono przez alkoholowy szereg odwadniający, utrwalono w

ksylenie i rutynowo pokryto kroplą medium zamykającego (balsamem kanadyjskim) oraz szkiełkiem nakrywkowym.

3.2.3.2. Badanie surowiczego stężenia EDN/RNAzy 2 metodą immunoenzymatyczną ELISA u chorych z DH

Surowicze stężenie EDN/RNAzy 2 badano u 25 chorych na DH i 21 krewnych chorych z pęcherzycą, stanowiących grupę kontrolną. Badanie wykonano gotowymi zestawami „EDN ELISA Kit” (MBL, Japonia) zgodnie z podaną przez producenta metodyką. Studzienki reakcyjne testu zostały opłaszczane przeciwciałem monoklonalnym antyludzkiej EDN. Surowice rozcieńczano w stosunku 1:5 przy użyciu załączonego do zestawu rozcieńczalnika próbek (*assay diluent*). Każdorazowo wykonywano pozytywną i negatywną kontrolę. Nakrapiano po 100 µl próbek i standardów do studzienek reakcyjnych i inkubowano przez 60 min. w temperaturze pokojowej. Następnie przeprowadzono czterokrotny proces płukania stosując bufor płuczący i nakropiono po 100 µl gotowej do użycia sprzężonej peroksydazy antyludzkiej EDN (*conjugate solution*) do studzienek, po czym inkubowano w tych samych warunkach. Po powtórny płukaniu dodano po 100 µl roztworu substratu i inkubowano przez 10 min. w temperaturze pokojowej. Reakcję przerywano dodając 100 µl roztworu zatrzymującego (0,5 mol/L kwas siarkowy VI) i przeprowadzono odczyt fotometryczny przy długości fali 450 nm. Każdorazowo wykreślano krzywą standardową i obliczano stężenie EDN/RNAzy 2 zgodnie z wytycznymi producenta (odczyt absorbancji z krzywej standardowej x współczynnik rozcieńczenia próbki 5), podając je w ng/ml.

3.2.3.3. Badanie nasilenia ekspresji eTG ujawnianej techniką immunofluorescencyjną w skórze u chorych na DH

Mrożone skrawki skórne z bezpośredniego otoczenia wykwitu od 21 osób z DH poddano analizie DIF z użyciem frakcji IgG króliczego przeciwciała przeciwko ludzkiej eTG (dar dr. Soo-Youl Kima z Republiki Korei). Preparaty kriostatowe skrojone na grubość 4 µm zadano przeciwciałem pierwszorzędowym (anty-eTG) w indywidualizowanych rozcieńczeniach (w zakresie 1:50-1:10) (Chruśliński i wsp. 2008) i inkubowano przez 60 min. w temperaturze pokojowej w komorze wilgotnej. Następnie przeprowadzono trzykrotne płukanie, każde po 5 min., w buforze PBS pH 7,2 i nakropiono na preparaty przeciwciałem drugorzędowym (monoklonalne przeciwciałem sprzężone z FITC przeciwko króliczej IgG) rozcieńczonym w stosunku 1:80. Po kolejnym procesie

płukania na preparaty nakładano kroplę 10% roztworu gliceryny w PBS i przykrywano szkiełkiem nakrywkowym. Analizę fluorescencyjną przeprowadzono przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Olympus BX-40 stosując ocenę półilościową preparatów w skali czterostopniowej (-, +/-, +, ++).

3.2.3.4. Badanie głównego białka zasadowego eozynofilów (MBP) w naciekach zapalnych metodą immunohistochemiczną na skrawkach parafinowych

Parafinowe skrawki skórne od 27 pacjentów z BP poddano badaniu immunohistochemicznemu wykrywającemu ekspresję MBP, używając komercyjnego zestawu wizualizacyjnego „LSAB + System HRP” (Dako, Dania) i metodyki opisanej powyżej dla immunomapowania NE.

W badaniu użyto monoklonalnego mysiego przeciwciała przeciwko MBP klon BMK13 (Chemicon, USA) w rozcieńczeniu 1:100.

3.2.3.5. Badanie złogów IgG, IgG1, IgG4 i C3 metodą DIF we włosie bezobjawowych krewnych chorych z pęcherzycą

Badaniom poddano włosy pobrane z owłosionej skóry głowy od 30 bezobjawowych krewnych chorych z PV i PF. Po skrojeniu na szkiełko podstawowe skrawków grubości 4 µl badany obszar zaznaczono flamastrem. Mrożone skrawki zadano rozcieńczonymi w PBS o pH 7,2 w stosunku 1:100 sprzężonymi z FITC poliklonalnymi przeciwciałami króliczymi przeciwko ludzkim IgG i C3 (Dako, Dania) oraz monoklonalnymi przeciwciałami mysimi przeciwko ludzkim IgG1 i IgG4 (Sigma). Preparaty inkubowano w wilgotnej komorze w temperaturze pokojowej przez 60 min. Następnie płukano bez wytrząsania przez 15 min. w PBS pH 7,2 i po nałożeniu kropli 10% roztworu gliceryny w PBS pokryto szkiełkiem nakrywkowym.

W badaniu złogów IgG, IgG1, IgG4 i C3 we włosie zdrowych krewnych chorych z pęcherzycą zwracano uwagę na świecenie o typie sieci rybackiej w obrębie zewnętrznej pochwki mieszka włosowego.

3.2.3.6. Analiza numeryczna reakcji z NE i MBP uzyskanych w badaniach immunohistochemicznych

Obrazy uzyskane w wyniku przeprowadzonych badań immunohistochemicznych wykrywających NE i MBP zostały sfotografowane i poddane analizie numerycznej przy użyciu programu komputerowego „Analizator 4D” dzięki współpracy z Zakładem Bioinformatyki i Biologii Obliczeniowej (ZBBO) przy Katedrze Patomorfologii Klinicznej

UM w Poznaniu (Kaczmarek i wsp. 2005). Do analizy morfometrycznej wybierano najbardziej optymalne miejsce preparatu, spełniające następujące kryteria:

- wizualnie najintensywniejsza reakcja,
- obecność drobnowidowych cech choroby,
- możliwy brak artefaktów preparacyjnych.

Intensywność ekspresji białek mierzono w procentach reakcji NE/MBP (pole pozytywnej reakcji podzielone przez pole badane i następnie pomnożone razy 100). Analiza numeryczna umożliwiała ocenę nasilenia złogów NE i MBP zarówno w jednej płaszczyźnie, jak i w przestrzeni.

Opisane badania wykonano w Pracowni Histopatologii i Immunopatologii Skóry Kliniki Dermatologii UM w Poznaniu (kierownik: dr hab. n. med. Monika Bowszyc-Dmochowska).

3.2.4. Ocena mikroskopowa i dokumentacja fotograficzna

Do badań histopatologicznych i immunopatologicznych wykorzystano mikroskop świetlny BX 40 (Olympus) z przystawką fluorescencyjną oraz kamerę cyfrową Camedia C-4000 Zoom (Olympus) z drukarką termosublimacyjną Camedia P-330E (Olympus).

3.2.5. Analiza statystyczna

Wartości mierzalne przedstawiono w postaci wartości średniej, SD, wartości minimalnej i maksymalnej i sprawdzono dla nich zgodność z rozkładem normalnym za pomocą testu Shapiro – Wilka.

Testem rang ANOVA Kruskala-Wallisa wraz z testem Dunna (test post-hoc) zweryfikowano statystyczne zależności między a nasileniem ekspresji NE u chorych z pęcherzycą, BP i DH. Celem porównania poziomu przeciwciał IgG wobec BP180 i BP230 w surowicy i płynie pęcherzowym chorych z BP oraz porównania poziomu przeciwciał IgA wobec tTG i npG w DH i grupach kontrolnych wykonano test kolejności par Wilcoxon. Porównanie nasilenia ekspresji NE z nasileniem ekspresji MBP w BP przeprowadzono testem Manna-Whitneya. Testem Manna-Whitneya poszukiwano również różnicy między stężeniem EDN/RNAzy 2 u chorych na DH w porównaniu z bezobjawowymi krewnymi chorych na pęcherzycę. Współczynnik korelacji rang Spearmana stosowano w celu określenia korelacji pomiędzy badanymi parametrami (nasilenie ekspresji NE vs. poziom krążących IgG anty-DSG1/DSG3 w pęcherzycy; nasilenie ekspresji NE vs. poziom krążących IgG anty-BP180/BP230 w BP; nasilenie

ekspresji NE vs. poziom krążących anty-eTG/tTG/npG IgA w DH; nasilenie ekspresji NE vs. nasilenie ekspresji MBP u chorych z BP; poziom przeciwciał krążących IgG anty-DSG1 vs. IgG anty-DSG3 w pęcherzycy; poziom przeciwciał krążących IgG anty-BP180 vs. IgG anty-BP230 w BP; poziom przeciwciał krążących IgA anty-eTG vs. IgA anty-tTG w DH; poziom przeciwciał krążących IgA-eTG vs. IgA anty-npG w DH; poziom przeciwciał krążących IgA anty-tTG vs. IgA anty-npG; poziom przeciwciał krążących IgA anty-eTG vs. surowicze stężenie EDN/RNAzy 2 w DH; nasilenie ekspresji eTG w skórze vs. poziom krążących IgA anty-eTG w DH). Wyniki uznano za istotne statystycznie przy $p < 0,05$. Opracowanie statystyczne wykonano dzięki uprzejmości mgr Agnieszki Seraszek-Jaros za pomocą statystycznego programu komputerowego Statistica PL 9.0 StatSoft w Zakładzie Bioinformatyki i Biologii Obliczeniowej (ZBBO) Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu pod kierownictwem prof. dr hab. n. med. Elżbiety Kaczmarek.

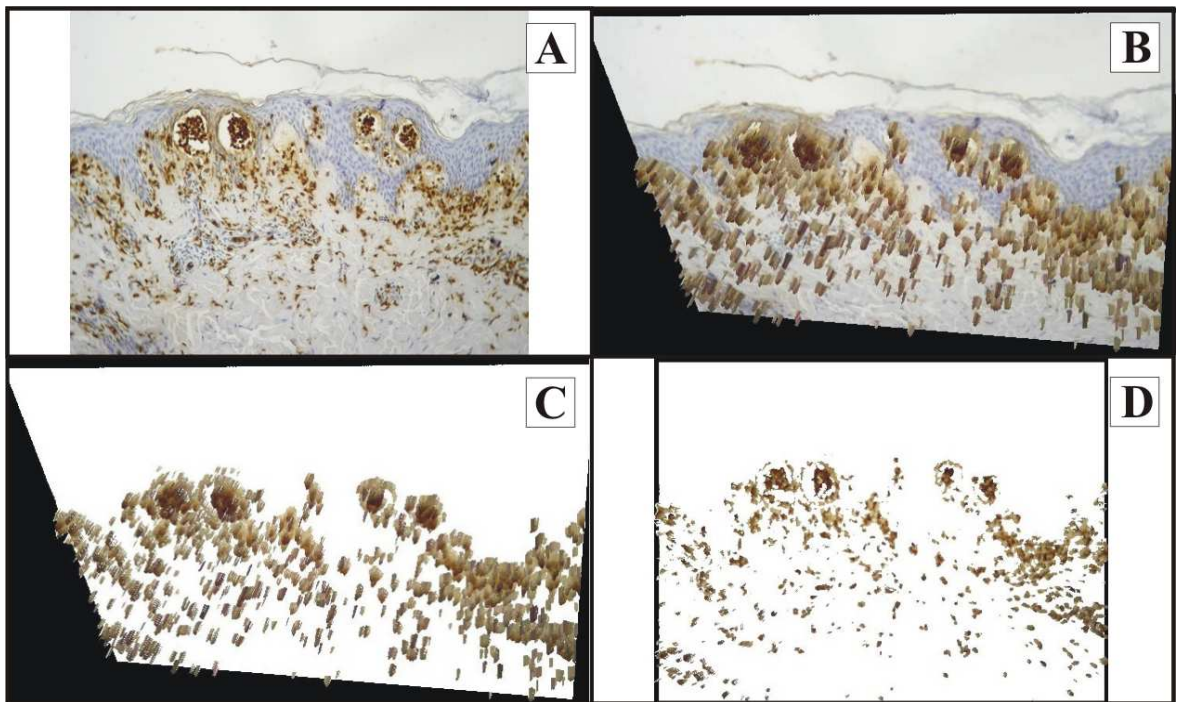
Celem określenia wartości punktów odcięcia cechujących się najlepszą czułością i swoistością dla testów „Anty-Transglutaminaza tkankowa ELISA (IgA)” i „Anti-Gliadin (GAF-3X) ELISA (IgA)” (Euroimmun, Niemcy) dla populacji rodzimej wykonano analizę krzywych ROC dzięki uprzejmości dr n. med. Barbary Więckowskiej, korzystając z oprogramowania statystycznego PQStat 1.4.0 (www.pqstat.pl) w Katedrze i Zakładzie Informatyki i Statystyki Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu pod kierownictwem prof. dr. hab. n. med. Jerzego Moczko.

4. WYNIKI

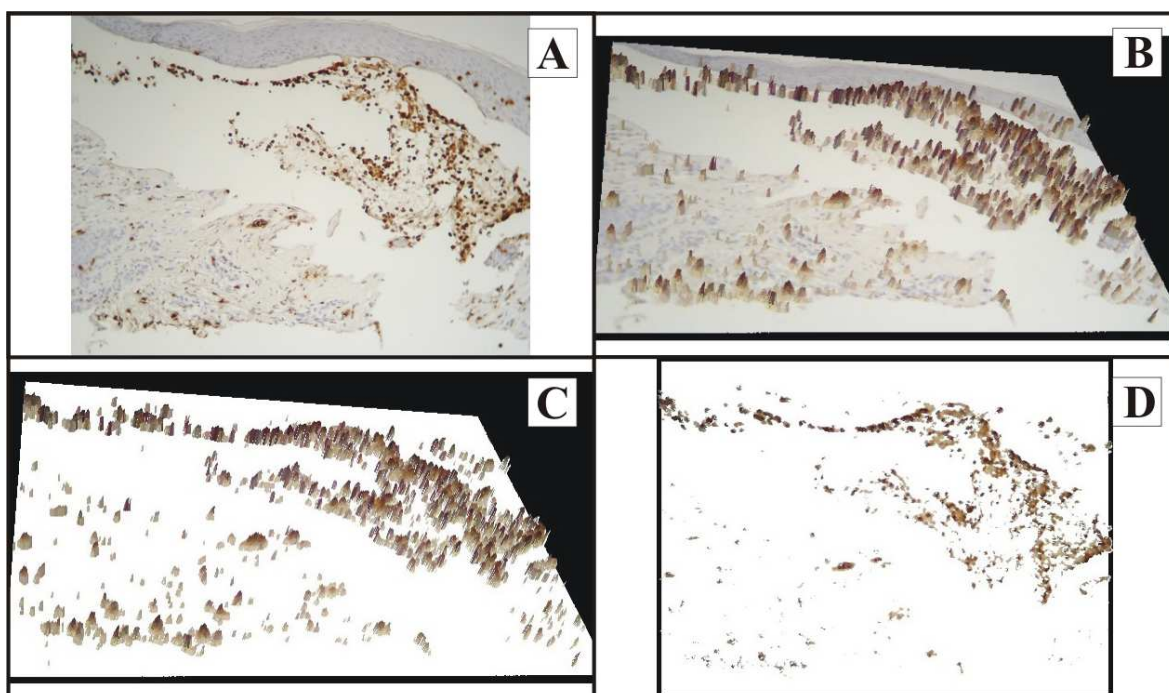
4.1. Czynność neutrofilów w skórze pęcherzowo zmienionej badana barwieniem immunohistochemicznym i analizą drobnowidową złogów NE w tkankach pacjentów z DH, BP i pęcherzycą

Badaniem objęto wycinki skórne 24 chorych z DH, 27 chorych z BP i 28 chorych z pęcherzycą którzy wykazywali kliniczno-biochemiczno-molekularne cechy choroby.

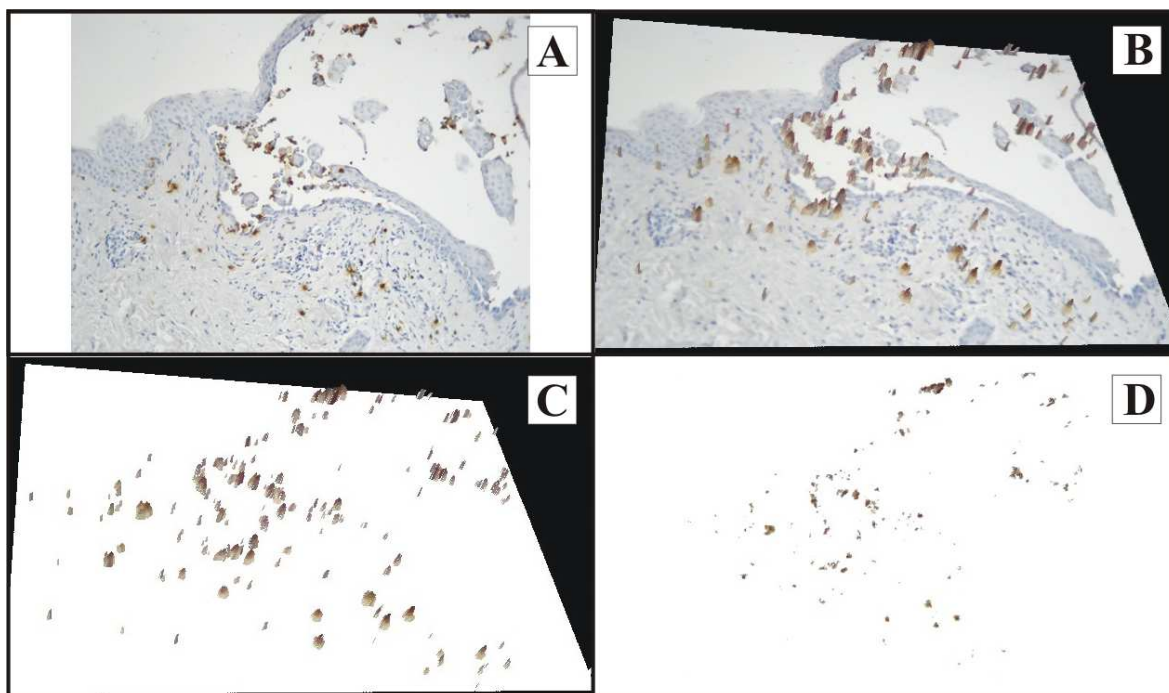
W pierwszym etapie wyniki były oceniane półilościowo przez niezależnego obserwatora przy użyciu mikroskopu świetlnego i pięciostopniowej skali („-„ brak reakcji, „+/-„ wątpliwa intensywność reakcji, „+” słaba intensywność reakcji, „++” średnia intensywność reakcji, „+++” silna intensywność reakcji). Półilościowa ocena reakcji IHC została przedstawiona w tabeli I. Następnie obrazy zostały sfotografowane cyfrowym aparatem i poddane bardziej ilościowej cyfrowej analizie morfometrycznej w programie Analizator 4D, która umożliwia ocenę nasilenia złogów (intensywność ekspresji) NE zarówno w jednej płaszczyźnie, jak i w przestrzeni. Intensywność ekspresji NE została obliczona poprzez podzielenie pola pozytywnej reakcji przez pole badane, a następnie wymnożenie razy 100 i podana w procencie reakcji markera (% reakcji NE). Intensywność złogów NE przetworzonych przy wykorzystaniu cyfrowej analizy obrazów mikroskopowych w skórze reprezentatywnych pacjentów z DH, BP i pęcherzycą przedstawiono odpowiednio na rycinach 5-7.



Ryc. 5. Złogi NE w preparacie immunohistochemicznym skóry wykwitowej pacjenta w średnim wieku z DH, u którego testem ELISA stwierdzono następujące poziomy autooprzeciwiaciał: anty-eTG IgA 14,16 AU/ml, anty-tTG IgA >200 RU/ml, anty-npG IgA 97,98 RU/ml (immunoperoksydazowe barwienie skrawków parafinowych, oryginalne powiększenie x200) (A). Intensywność złogów NE przetworzona przy użyciu cyfrowej analizy obrazów mikroskopowych, nałożona na immunohistochemiczne złogi NE: 3D (B). Intensywność złogów NE przetworzona przy użyciu cyfrowej analizy obrazów mikroskopowych: 3D (C). Intensywność złogów NE przetworzona przy użyciu cyfrowej analizy obrazów mikroskopowych: 2D (D)



Ryc. 6. Złogi NE w preparacie immunohistochemicznym skóry wykwitowej (pęcherz podnaskórkowy) pacjentki w średnim wieku z BP, u której testem ELISA stwierdzono następujące poziomy autoprzeciwciał: anti-BP180 IgG w surowicy > 150 U/ml, anti-BP180 IgG w płynie pęcherzowym 141,25 U/ml, anti-BP230 w IgG w surowicy 19,01 U/ml, anti-BP230 IgG w płynie pęcherzowym 8,10 U/ml (immunoperoksydazowe barwienie skrawków parafinowych, oryginalne powiększenie x200) (A). Intensywność złogów NE przetworzona przy użyciu cyfrowej analizy obrazów mikroskopowych, nałożona na immunohistochemiczne złogi NE: 3D (B). Intensywność złogów NE przetworzona przy użyciu cyfrowej analizy obrazów mikroskopowych: 3D (C). Intensywność złogów NE przetworzona przy użyciu cyfrowej analizy obrazów mikroskopowych: 2D (D)



Ryc. 7. Złogi NE w preparacie immunohistochemicznym skóry wykwitowej pacjentki w średnim wieku ze skórno-śluzówkowa postacią PV, u której testem ELISA stwierdzono następujące poziomy autoprzeciwciał: anti-DSG1 IgG 114,40 U/ml, anti-DSG3 IgG >150 U/ml (immunoperoxydazowe barwienie skrawków parafinowych, oryginalne powiększenie x200) (A). Intensywność złogów NE przetworzona przy użyciu cyfrowej analizy obrazów mikroskopowych, nałożona na immunohistochemiczne złogi NE: 3D (B). Intensywność złogów NE przetworzona przy użyciu cyfrowej analizy obrazów mikroskopowych: 3D (C). Intensywność złogów NE przetworzona przy użyciu cyfrowej analizy obrazów mikroskopowych: 2D (D)

Średnie wartości procentu reakcji NE, wartości minimalne i maksymalne oraz odchylenia standardowe w poszczególnych grupach badanych podano w tabeli II.

Tabela I. Półilościowa ocena barwienia IHC wykrywającego skórną ekspresję NE w grupach chorych z DH, BP i pęcherzycą (PV+PF).

Skala	Grupa badana (n)		
	DH (24)	BP (27)	PV+PF (28)
-	0	1	1
+/-	1	3	4
+	3	13	12
++	11	8	10
+++	9	2	1

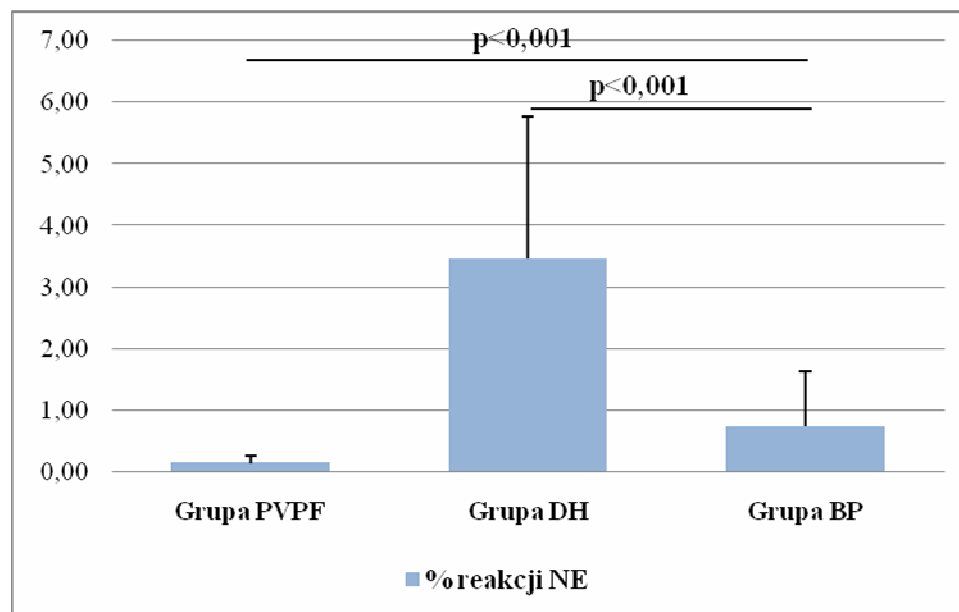
Tabela II. Parametry statystyczne skórnej ekspresji NE, wyrażonej procentem reakcji, w grupach chorych z DH, BP i pęcherzycą (PV+PF).

Dg.	% reakcji NE				
	n	\bar{x}	Min.	Max.	SD
DH	24	3,46	0,00	7,97	2,31
BP	27	0,74	0,02	3,47	0,90
PV+PF	28	0,14	0,00	0,39	0,12

Przeprowadzono porównanie % reakcji NE między badanymi grupami, które zilustrowano na rycinie 8. W związku z tym, że zgodność z rozkładem normalnym posiada tylko % reakcji NE w grupie chorych z DH to porównanie tego parametru między grupami wykonano za pomocą testu Kruskala – Wallisa. Test ten wykazał statystycznie istotną różnicę między wartościami % reakcji NE w poszczególnych grupach ($p=0,0001$). Testem Dunna (test post-hoc) sprawdzono dokładnie między jakimi grupami te różnice istnieją. Test Dunna wykazał statystycznie istotną różnicę między:

- % reakcji NE w grupie PV/PF a % reakcji NE w grupie DH $\rightarrow p<0,001$,
- % reakcji NE w grupie DH a % reakcji NE w grupie BP $\rightarrow p<0,001$.

Test Dunna nie wykazał natomiast różnicy między % reakcji NE w grupie PV/PF a % reakcji NE w grupie BP ($p>0,05$).



Ryc. 8. Porównanie skórnej ekspresji NE wyrażonej w procencie reakcji dla badanych grup chorych z DH, BP i pęcherzycą (PVPF).

4.2. Przeciwciała krążące IgA przeciwko eTG, tTG i npG w DH, IgG przeciwko BP180 i BP230 w BP, IgG przeciwko DSG1 i DSG3 u chorych z pęcherzycą badane techniką ELISA

Badaniem łącznie objęto 56 surowic od chorych z DH, 28 surowic od chorych z BP i 28 surowic od chorych z pęcherzycą. Poziomy autoprzeciwciała krążących w poszczególnych grupach badanych w okresie aktywnym choroby analizowane testami ELISA (eTG/tTG/npG ELISA dla chorych z DH, BP180/BP230 ELISA dla chorych z BP i DSG1/DSG3 ELISA dla chorych z pęcherzycą) oraz średnie wartości poziomu poszczególnych przeciwciał krążących, wartości minimalne i maksymalne oraz odchylenia standardowe w poszczególnych grupach chorych podano odpowiednio w tabeli III-VI.

Tabela III. Uzyskane metodami ELISA poziomy autoprzeciwciała IgA wobec eTG, tTG i npG u chorych z DH

Dg.	Poziom przeciwciał IgA								
	Anty-eTG ELISA (AU/ml) (n=49)			Anty-tTG ELISA (RU/ml) (n=32)			Anty-npG ELISA (RU/ml) (n=30)		
	0-18	18-50	50-100	0-20	21-200	>200	0-25	26-200	>200
DH	27	13	9	3	12	17	3	19	8

Tabela IV. Uzyskane metodą ELISA poziomy autoprzeciwciał IgG wobec BP180 i BP230 u chorych z BP

Dg.	Poziom przeciwciał IgG (WI) U/ml					
	Anty-BP180 ELISA			Anty-BP230 ELISA		
	0-9	10-150	>150	0-9	10-150	>150
BP (n=28)	2	20	6	6	22	0

Tabela V. Uzyskane metodą ELISA poziomy autoprzeciwciał IgG wobec DSG1 i DSG3 u chorych z PV i PF

Dg.	Poziom przeciwciał IgG (WI) U/ml							
	Anty-DSG1				Anty-DSG3			
	0-41	42-150	151-750	>750	0-40	41-150	151-750	>750
PF (n=5)	0	2	2	1	5	0	0	0
PV (n=23)	5	10	6	2	0	7	7	9

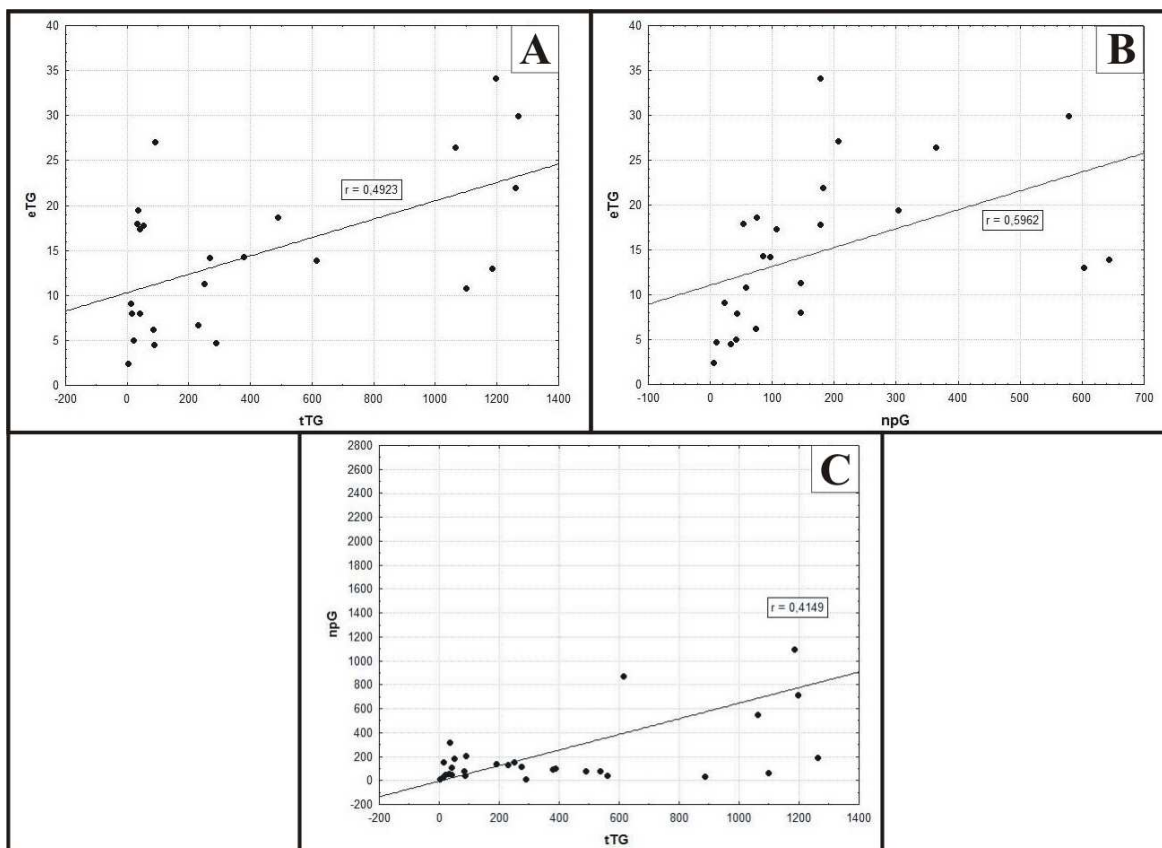
Tabela VI. Parametry statystyczne uzyskanych poziomów autoprzeciwciał w grupie chorych z DH, BP i pęcherzycą(PV+PF).

Dg.	Poziom autoprzeciwciał	\bar{x}	Min.	Max.	SD
DH	anty-eTG IgA (AU/ml)	33,30	2,37	176,52	40,13
	anty-tTG IgA (RU/ml)	410,57	2,15	1 270,92	440,90
	anty-npG IgA (RU/ml)	262,37	3,44	2516,45	493,21
BP	anty-BP180 IgG (U/ml)	148,22	3,26	690,68	182,75
	anty-BP230 IgG (U/ml)	29,18	0,00	163,00	38,55
PV+PF	anty-DSG1 IgG (U/ml)	270,03	5,43	1 398,80	399,31
	anty-DSG3 IgG (U/ml)	428,03	2,00	1 203,04	358,05

Stosując test korelacji rang Spearmana nie wykazano istotnej statystycznie korelacji pomiędzy poziomem surowiczych przeciwciał anty-DSG1 IgG a poziomem anty-DSG3 IgG u chorych z pęcherzycą ($r=-0,1240$). Nie ujawniono również istotnej statystycznie korelacji pomiędzy poziomem surowiczych przeciwciał anty-BP180 IgG a anty-BP230 IgG w grupie chorych z BP ($r=0,0876$). Stwierdzono natomiast istotne statystycznie korelacje (ryc. 9) w grupie chorych z DH pomiędzy:

- poziomem surowiczych przeciwciał IgA anty-eTG a IgA anty-tTG $\rightarrow r=0,4923$,

- poziomem surowiczych przeciwciał IgA anti-eTG a IgA anti-npG $\rightarrow r=0,5962$,
- poziomem surowiczych przeciwciał IgA anti-tTG a IgA anti-npG $\rightarrow r=0,4149$.



Ryc. 9. Istotne korelacje pomiędzy: (A) poziomem surowiczych autoprzeciwciał IgA anti-eTG vs. anti-tTG, (B) poziomem surowiczych autoprzeciwciał IgA anti-eTG vs. anti-npG, (C) poziomem surowiczych autoprzeciwciał IgA anti-npG vs. anti-tTG w DH. Pokazano linię trendu.

4.3. Zależność pomiędzy poziomem przeciwciał krążących (anti-eTG, anti-tTG i anti-npG IgA w DH; anti-BP180 i anti-BP230 IgG w BP, anti-DSG1 i anti-DSG3 IgG w PV/PF) a nasileniem skórnych złogów NE

Badając zależność pomiędzy poziomem przeciwciał krążących (anti-eTG, anti-tTG i anti-npG IgA w DH; anti-BP180 i anti-BP230 IgG w BP, anti-DSG1 i anti-DSG3 IgG w PV/PF) a nasileniem skórnych złogów NE wykonano test korelacji rang Spearmana. Nie uzyskano statystycznie istotnych korelacji pomiędzy poziomem przeciwciał krążących wobec autoepitopów odpowiednich antygenów a nasileniem skórnych złogów NE. Wyniki przedstawiono w tabeli VII.

Tabela VII. Uzyskane nieistotne korelacje pomiędzy poziomami autooprzeciwciał wobec odpowiednich antygenów (anty-DSG1/DSG3 IgG, anty-BP180/BP230 IgG, anty-eTG/tTG/npG IgA) a intensywnością skórnej ekspresji NE, wyrażonej w procencie reakcji, u chorych z DH, BP i pęcherzycą (PV+PF).

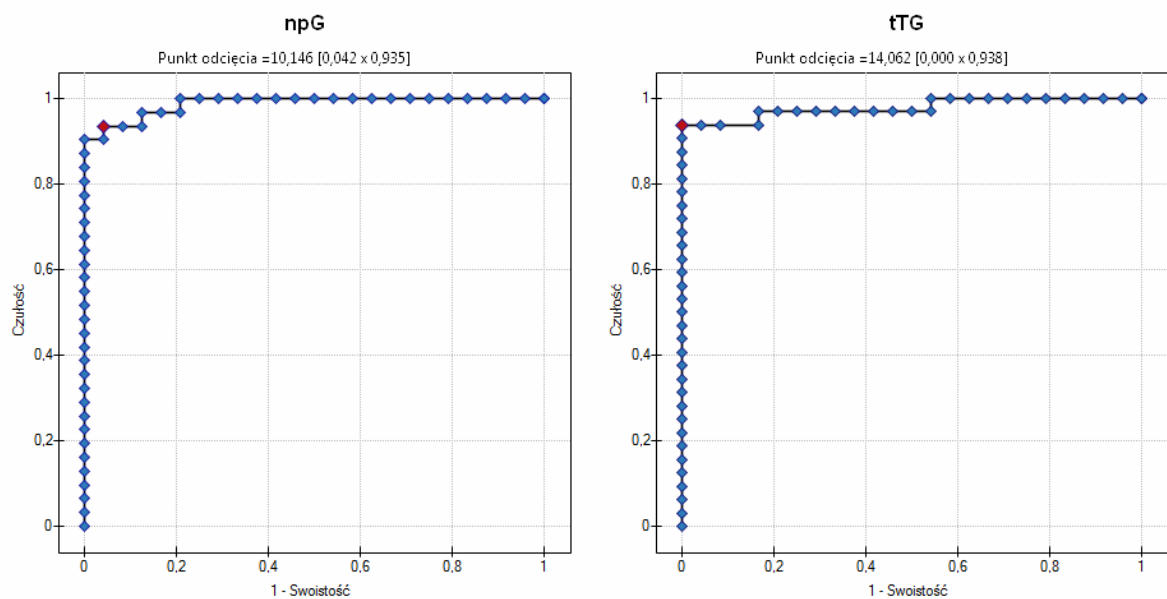
Grupa badana		n	r	p testu
DH	% reakcji NE vs. anty-eTG IgA w surowicy	21	r=-0,1013	0,6622
	% reakcji NE vs. anty-tTG IgA w surowicy	23	r=-0,0504	0,8194
	% reakcji NE vs. anty-npG IgA w surowicy	21	r=-0,1755	0,4437
BP	% reakcji NE vs. anty-BP180 IgG w surowicy	27	r=-0,0269	0,8942
	% reakcji NE vs. anty-BP230 IgG w surowicy	27	r=-0,0208	0,9181
	% reakcji NE vs. anty-BP180 IgG w płynie pęcherzowym	22	r=-0,0570	0,8010
	% reakcji NE vs. anty-BP230 IgG w płynie pęcherzowym	23	r=0,2826	0,1914
PV+PF	% reakcji NE vs. anty-DSG1IgG w surowicy	28	r=-0,1240	0,5294
	% reakcji NE vs. anty-DSG3 IgG w surowicy	28	r=0,2403	0,8615

4.4. Przydatność testów immunoenzymatycznych ELISA wykrywających anty-eTG, anty-tTG i anty-npG IgA do diagnostyki różnicowej chorych z DH.

W celu oceny zdolności rozróżniania danym testem osób dotkniętych DH od osób zdrowych przebadano 56 surowic pacjentów z DH, 25 surowic pacjentów z grupy IgA/neutrofilowo-mediowanych dermatoz niebędących DH, traktowanych jako pozytywna grupa kontrolna, i 24 surowic osób zdrowych traktowanych jako negatywna grupa kontrolna. Przeprowadzono analizę krzywych ROC dla anty-tTG ELISA i anty-npG-ELISA. Krzywe ROC wykreślone dla różnych kombinacji badanych grup zostały przedstawione na rycinach 10-12 i w tabelach VIII-XIII. Optymalny punkt odcięcia dla Anti-Gliadin (GAF-3X) IgA ELISA w analizie pacjentów z DH vs. zdrowa kontrola wyniósł 10,146 RU/ml przy polu pod krzywą (*area under the ROC curve* - AUC) równym 0,987, czułości 93,54% i swoistości 95,83%; pacjentów z DH vs. IgA/neutrofilowo-

mediowane dermatozy nie będące DH 6,672 RU/ml przy AUC równym 0,927, czułości 96,77% i swoistości 79,16%; grupach łączonych 30,081 RU/ml przy AUC równym 0,966, czułości 87,09% i swoistości 97,01% (przy punkcie odcięcia producenta 25 RU/ml). Optymalny punkt odcięcia dla Anti-tTG IgA ELISA wyniósł 14,062 RU/ml we wszystkich kombinacjach (pacjenci z DH vs. zdrowa kontrola przy AUC równym 0,978, czułości 93,75% i swoistości 100%; pacjenci z DH vs. IgA/neutrofilowo-mediowane dermatozy nie będące DH przy AUC równym 0,942, czułości 93,75% i swoistości 96% i w łączonych grupach przy AUC równym 0,965, czułości 93,75% i swoistości 98,52%, przy czym punkt odcięcia producenta wynosi 20 RU/ml). Aby dane można było uznać za dyskryminacyjne AUC musi wynosić powyżej 0,5, przy czym najlepszą dyskryminację uzyskujemy gdy pole to równa się 1,0 (Kochańska-Dziurawicz i wsp. 1999, Moczko i wsp. 2010). W związku z powyższym wszystkie uzyskane dane z badania są dyskryminacyjne, co sprawdzono przy użyciu metody DeLonga.

Wartości anti-tTG i anti-npG IgA, różnią się znamienne pomiędzy zdrową kontrolą a pacjentami z DH ($p < 0,001$), tak samo jak pomiędzy grupą z IgA/neutrofilowo-mediowanymi dermatozami nie będącymi DH a pacjentami z DH ($p < 0,001$), podczas gdy nie ujawniono istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupą IgA/neutrofilowo-mediowanych dermatoz niebędących DH a zdrową kontrolą ($p > 0,05$). Analiza korelacji Spearmana wykazała statystycznie istotną korelację pomiędzy poziomem przeciwciał IgA wobec tTG, eTG i npG w grupie DH, co przedstawiono w podrozdziale 4.2. Ponadto ujawniono istotną statystycznie korelację pomiędzy poziomem IgA wobec tTG a IgA wobec npG w grupie IgA/neutrofilowo-mediowanych dermatoz niebędących DH ($r = 0,7890$) i brak takiej korelacji w zdrowej kontroli ($r = 0,2231$). Otrzymano następujący odsetek pozytywnych wyników poszczególnych testów w grupie DH: IgA anti-eTG 47%, IgA anti-tTG 90% i IgA anti-npG 90% testów ELISA, w których poziom surowiczych przeciwciał przekraczał punkt odcięcia producenta.



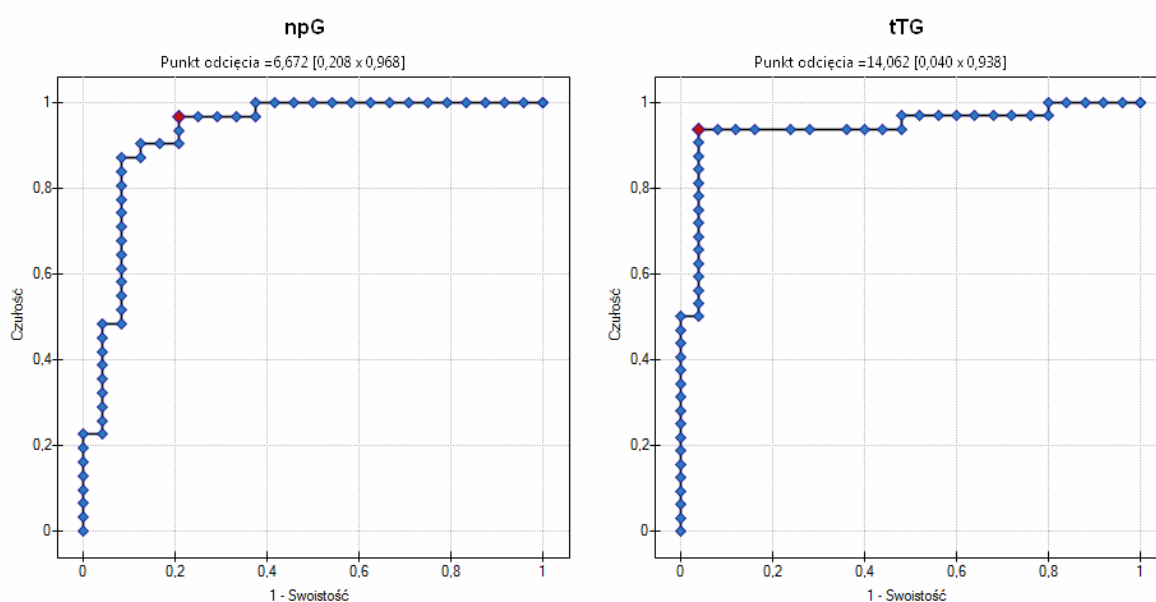
Ryc. 10. Wyniki analizy krzywych ROC uzyskane dla pacjentów z DH i negatywnej kontroli (zdrowe osoby). Lewa strona ryciny przedstawia krzywą wykreśloną dla Anti-Gliadin (GAF-3X) IgA ELISA, a prawa strona ryciny przedstawia krzywą wykreśloną dla Anti-tTG IgA ELISA.

Tabela VIII. Czułość i swoistość dla różnych wartości IgA przeciwko npG w analizie pacjentów z DH i kontrolinegatywnej. W ramce ujęto wybrany punkt odcięcia.

IgA npG	Czułość	Swoistość
-2,044	1	0
-1,707	1	0,125
-1,454	1	0,166667
-0,985	1	0,25
-0,458	1	0,291667
0,02	1	0,375
0,062	1	0,416667
1,034	1	0,5
1,671	1	0,625
2,702	1	0,75
3,438	1	0,791667
4,195	0,967742	0,833333
6,672	0,967742	0,875
8,655	0,935484	0,916667
10,146	0,935484	0,958333
24,08	0,903226	1
30,081	0,870968	1
42,129	0,774194	1
53,707	0,709677	1
73,572	0,645161	1
85,82	0,548387	1
97,984	0,516129	1
107,553	0,483871	1
199,908	0,225806	1
314,736	0,193548	1
544,392	0,16129	1
713,172	0,129032	1
1090,312	0,064516	1
2516,448	0,032258	1

Tabela IX. Czułość i swoistość dla różnych wartości IgA przeciwko tTG w analizie pacjentów z DH i kontrolnej grupy. W ramce ujęto wybrany punkt odcięcia.

IgA tTG	Czułość	Swoistość
0,518	1	0
0,917	1	0,083333
1,066	1	0,166667
1,287	1	0,291667
2,151	1	0,458333
2,523	0,96875	0,666667
2,71	0,96875	0,708333
3,02	0,96875	0,75
4,08	0,96875	0,833333
4,913	0,9375	0,916667
6,884	0,9375	0,958333
14,062	0,9375	1
17,199	0,90625	1
21,114	0,875	1
34,983	0,8125	1
42,171	0,75	1
53,712	0,6875	1
86,31	0,65625	1
192,232	0,5625	1
232,26	0,53125	1
380,876	0,40625	1
537,352	0,3125	1
616,344	0,25	1
886,952	0,21875	1
1065,648	0,1875	1
1270,924	0,03125	1



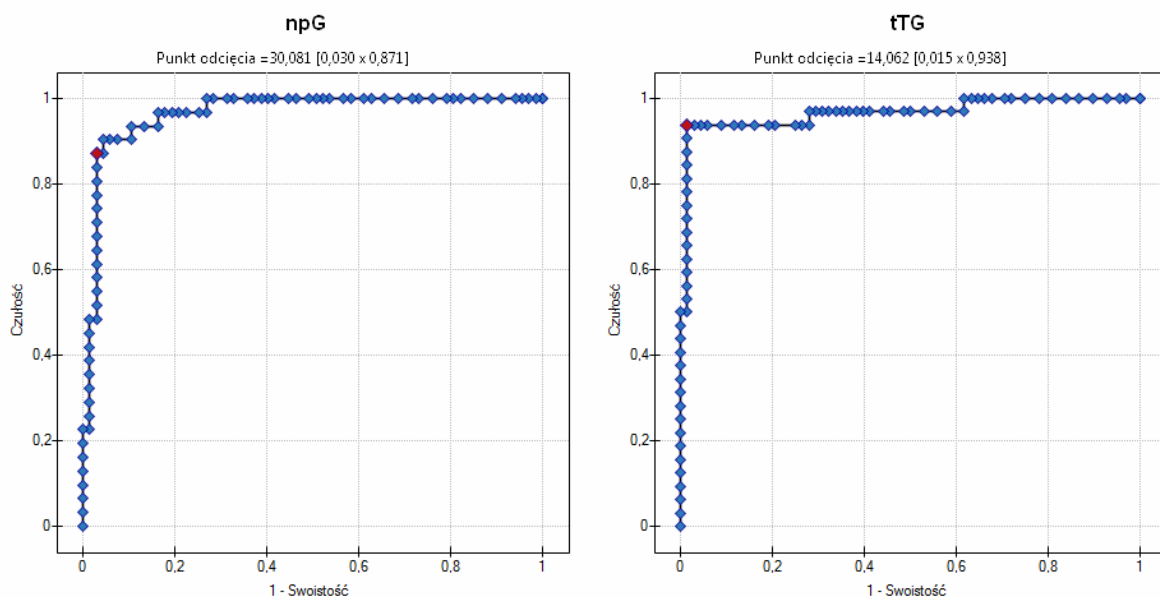
Ryc. 11. Wyniki analizy krzywych ROC uzyskane dla pacjentów z DH i grupy IgA/neutrofilowo-mediowanych dermatoz niebędących DH. Lewa strona ryciny przedstawia krzywą wykreśloną dla Anti-Gliadin (GAF-3X) IgA ELISA, a prawa strona ryciny przedstawia krzywą wykreśloną dla Anti-tTG IgA ELISA.

Tabela X. Czulość i swoistość dla różnych wartości IgA przeciwko npG w analizie pacjentów z DH i kontroli pozytywnej. W ramce ujęto wybrany punkt odcięcia.

IgA npG	Czulość	Swoistość
-3,586	1	0
-2,124	1	0,083333
-1,619	1	0,166667
-0,108	1	0,291667
0,076	1	0,375
0,467	1	0,458333
1,817	1	0,5
2,548	1	0,541667
3,438	1	0,625
4,081	0,967742	0,666667
4,749	0,967742	0,708333
6,307	0,967742	0,75
6,672	0,967742	0,791667
10,146	0,935484	0,791667
16,129	0,903226	0,833333
24,633	0,870968	0,875
30,081	0,870968	0,916667
42,129	0,774194	0,916667
53,707	0,709677	0,916667
107,553	0,483871	0,958333
314,736	0,193548	1
544,392	0,16129	1
713,172	0,129032	1
1090,312	0,064516	1
2516,448	0,032258	1

Tabela XI. Czulość i swoistość dla różnych wartości IgA przeciwko tTG w analizie pacjentów z DH i kontroli pozytywnej. W ramce ujęto wybrany punkt odcięcia.

IgA tTG	Czulość	Swoistość
0,776	1	0
1,585	1	0,08
2,023	1	0,16
3,224	0,96875	0,4
3,985	0,96875	0,48
5,277	0,9375	0,72
6,13	0,9375	0,76
7,915	0,9375	0,84
10,215	0,9375	0,88
11,484	0,9375	0,92
14,062	0,9375	0,96
17,199	0,90625	0,96
34,983	0,8125	0,96
53,712	0,6875	0,96
91,474	0,59375	0,96
192,232	0,5625	0,96
232,26	0,53125	0,96
290,572	0,4375	1
380,876	0,40625	1
537,352	0,3125	1
886,952	0,21875	1
1270,924	0,03125	1



Ryc. 12. Wyniki analizy krzywych ROC uzyskane dla wszystkich analizowanych grup. Lewa strona ryciny przedstawia krzywą wykreśloną dla Anti-Gliadin (GAF-3X) IgA ELISA, a prawa strona ryciny przedstawia krzywą wykreśloną dla Anti-tTG IgA ELISA.

Tabela XII. Czułość i swoistość dla różnych wartości IgA przeciwko npG w analizie grup łączonych. W ramce ujęto wybrany punkt odcięcia.

IgA npG	Czułość	Swoistość
-3,586	1	0
-2,052	1	0,044776
-1,424	1	0,238806
-0,458	1	0,313433
-0,108	1	0,373134
0,02	1	0,38806
0,062	1	0,432836
0,357	1	0,477612
1,034	1	0,537313
1,817	1	0,61194
2,702	1	0,686567
4,081	0,967742	0,776119
8,655	0,935484	0,865672
10,146	0,935484	0,895522
16,129	0,903226	0,940299
24,633	0,870968	0,955224
30,081	0,870968	0,970149
34,148	0,83871	0,970149
42,129	0,774194	0,970149
53,707	0,709677	0,970149
73,572	0,645161	0,970149
85,82	0,548387	0,970149
97,984	0,516129	0,970149
107,553	0,483871	0,985075
198,854	0,225806	0,985075
314,736	0,193548	1
544,392	0,16129	1
713,172	0,129032	1
866,708	0,096774	1
1090,312	0,064516	1
2516,448	0,032258	1

Tabela XIII. Czułość i swoistość dla różnych wartości IgA przeciwko tTG w analizie grup łączonych. W ramce ujęto wybrany punkt odcięcia.

IgA tTG	Czułość	Swoistość
0,518	1	0
0,842	1	0,044118
0,954	1	0,102941
1,314	1	0,25
1,585	1	0,338235
2,151	1	0,382353
2,411	0,96875	0,470588
3,098	0,96875	0,661765
3,662	0,96875	0,691176
4,308	0,9375	0,720588
4,815	0,9375	0,808824
5,277	0,9375	0,867647
6,884	0,9375	0,911765
7,915	0,9375	0,941176
10,215	0,9375	0,955882
11,484	0,9375	0,970588
14,062	0,9375	0,985294
17,199	0,90625	0,985294
21,114	0,875	0,985294
34,983	0,8125	0,985294
38,02	0,78125	0,985294
42,171	0,75	0,985294
53,712	0,6875	0,985294
86,31	0,65625	0,985294
192,232	0,5625	0,985294
232,26	0,53125	0,985294
380,876	0,40625	1
490,212	0,34375	1
537,352	0,3125	1
616,344	0,25	1
886,952	0,21875	1
1065,648	0,1875	1
1270,924	0,03125	1

4.5. Czynność eozynofiliów badana stężeniem EDN/RNAzy 2 a autoprzeciwciała IgA przeciwko eTG u chorych na DH

Łącznie badaniami objęto surowice pochodzące od 25 pacjentów z DH i 21 osób z grupy kontrolnej złożonej z bezobjawowych krewnych chorych na pęcherzycę (PV i PF). Poziom przeciwciał krążących IgA wobec eTG oraz uczynnienie eozynofiliów wyrażonej surowiczym stężeniem EDN/RNAzy 2 badano przy pomocy odpowiednich komercyjnych testów immunoenzymatycznych ELISA. Testem korelacyjnym rang Spearmana nie stwierdzono istotnej statystycznie korelacji ($r=0,082$) pomiędzy poziomem autoprzeciwciał IgA wobec eTG a stężeniem EDN/RNAzy 2 u chorych na DH. Testem Manna-Whitneya nie wykazano również istotnej statystycznie różnicy ($p=0,5093$) między stężeniem EDN/RNAzy 2 u chorych na DH w porównaniu z krewnymi chorych z pęcherzycą. Średnie

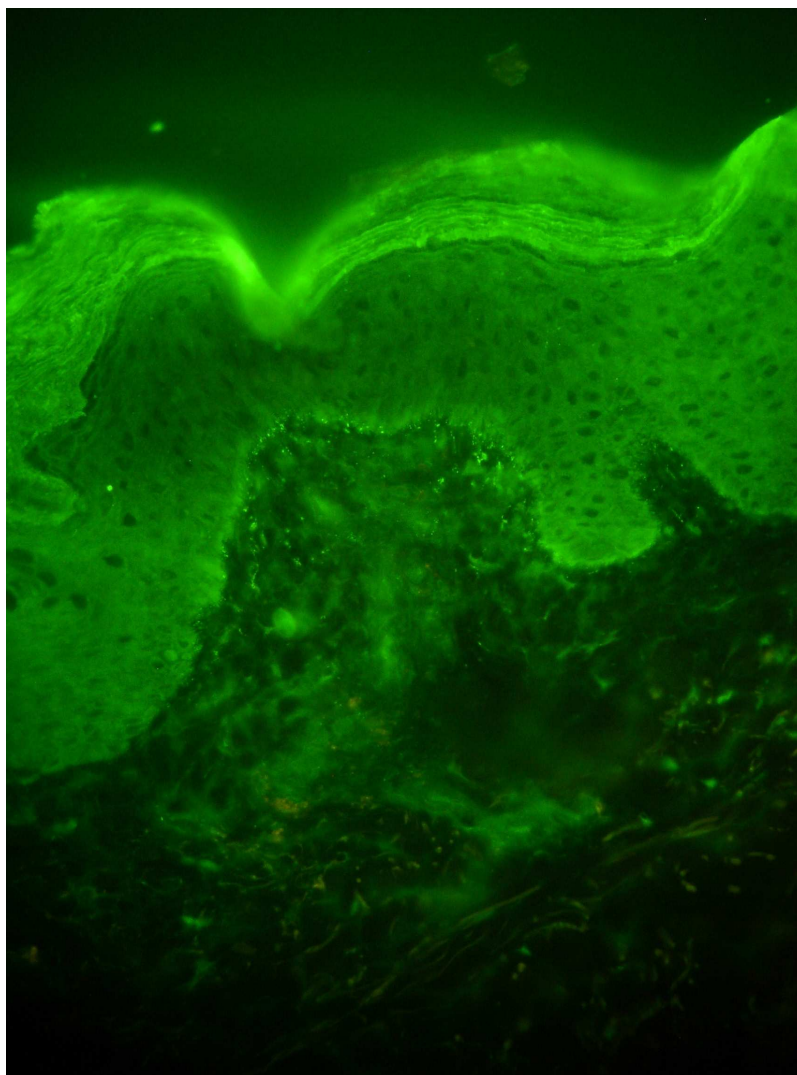
wartości stężenia EDN w surowicy chorych na DH i w grupie kontrolnej oraz odchylenia standardowe przedstawiono w tabeli XIV.

Tabela XIV. Parametry statystyczne surowiczego stężenia EDN u chorych z DH

Dg.	n	\bar{x} (ng/ml)	SD
DH	24	66,5833	56,7558
Grupa kontrolna	20	61,6750	54,1771

4.6. Zależność między nasileniem ekspresji eTG w skórze w sąsiedztwie DEJ u chorych na DH a poziomem przeciwciał krążących IgA wobec eTG.

Badaniem objęto 21 chorych z DH, od których pozyskano wycinki skórne przeznaczone do badania ekspresji eTG techniką DIF na skrawkach mrożonych i surowice przeznaczone do badania poziomu IgA wobec eTG techniką immunoenzymatyczną ELISA. Uzyskane wyniki półilościowej oceny ekspresji eTG oraz poziomu IgA anty-eTG przedstawiono w tabelach XV-XVI. Skórną ekspresję eTG uzyskaną techniką DIF w skórze reprezentatywnego pacjenta z DH przedstawiono na rycinie 13.



Ryc. 13. Ziarniste złoże eTG w skórze w sąsiedztwie DEJ u młodego mężczyzny z DH (oryginalne powiększenie x400), u którego testem ELISA w surowicy nie stwierdzono podwyższonego poziomu przeciwciał IgA wobec eTG (9,43 AU/ml przy punkcie odcięcia 18 AU/ml).

Tabela XV. Półilościowa ocena skórnej ekspresji eTG uzyskanej techniką DIF

Dg.	Skala	Ekspresja eTG (n)
DH (n=21)	-	8
	+/-	3
	+	5
	++	5

Tabela XVI. Uzyskane poziomy autoprzeciwciał IgA wobec eTG u chorych z DH

Dg.	Poziom IgA anty-eTG (n)			
DH (n=21)	0-18	18-50	50-100	>100
	10	3	4	4

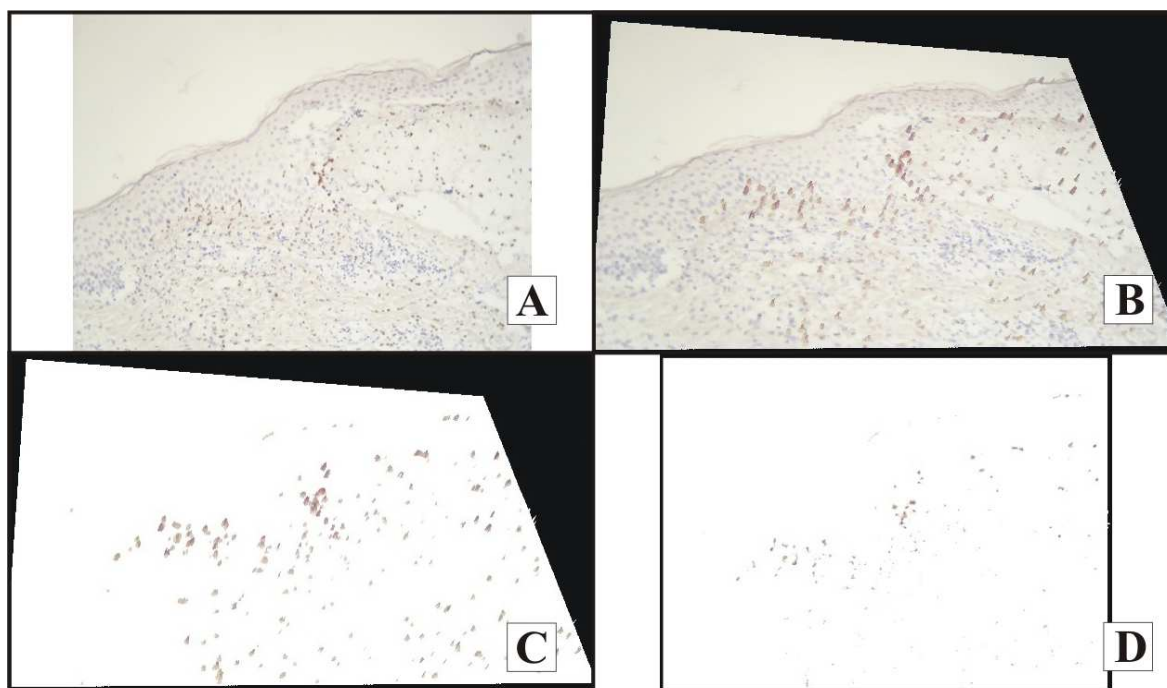
Analizą korelacji Spearmana uzyskano statystycznie nieistotną korelację ($r=0,1063$; $p=0,6554$) pomiędzy poziomem przeciwciał krążących IgA wobec eTG a nasileniem ekspresji eTG w skórze w sąsiedztwie DEJ u chorych na DH.

4.7. Czynność eozynofilów w skórze pęcherzowo zmienionej badana barwieniem immunohistochemicznym i analizą drobnowidową złogów MBP w tkankach pacjentów z BP oraz zależność pomiędzy nasileniem skórnych złogów MBP a poziomem przeciwciał krążących IgG wobec BP180 i BP230 oraz nasileniem skórnych złogów NEw BP

Badaniem objęto wycinki skórne 27 chorych z BP, którzy wykazywali kliniczno-biochemiczno-molekularne cechy choroby. Analogicznie do immunomappingu NE, w pierwszym etapie dokonano półilościowej oceny nasilenia ekspresji MBP (Tabela XVII), a następnie dokładniejszej, ilościowej morfometrii cyfrowej obrazów drobnowidowych. Średni poziom % reakcji MBP wynosił $0,25 \pm 0,37$, przy minimalnej wartości 0,00 i maksymalnej 1,53 % reakcji MBP. Intensywność złogów MBP przetworzonych przy wykorzystaniu cyfrowej analizy obrazów mikroskopowych w skórze reprezentatywnej pacjentki z BP przedstawiono na rycinie 14.

Tabela XVII. Półilościowa ocena barwienia IHC wykrywającego skórną ekspresję MBP w grupie chorych z BP

Skala	Grupa badana – BP (n=27)
-	1
+/-	6
+	15
++	5
+++	0



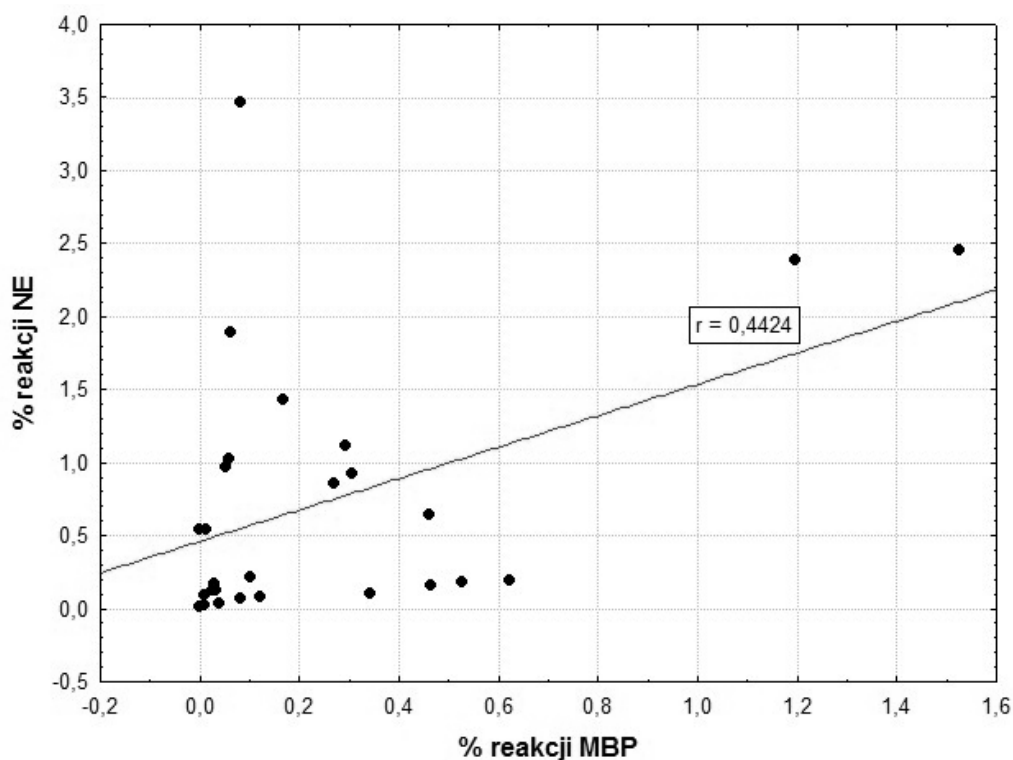
Ryc. 14. Złogi MBP w preparacie immunohistochemicznym skóry wykwitowej pacjentki w starszym wieku z BP, u której testem ELISA stwierdzono następujące poziomy autoprzeciwciał: anti-BP180 IgG w surowicy 73,96 U/ml, anti-BP180 IgG w płynie pęcherzowym 47,53 U/ml, anti-BP230 IgG w surowicy >150 U/ml, anti-BP230 IgG w płynie pęcherzowym 114,05 U/ml (immunoperoxydazowe barwienie skrawków parafinowych, oryginalne powiększenie x200) (A). Intensywność złogów MBP przetworzona przy użyciu cyfrowej analizy obrazów mikroskopowych, nałożona na immunohistochemiczne złogi MBP: 3D (B). Intensywność złogów MBP przetworzona przy użyciu cyfrowej analizy obrazów mikroskopowych: 3D (C). Intensywność złogów MBP przetworzona przy użyciu cyfrowej analizy obrazów mikroskopowych: 2D (D)

Badaniem z użyciem techniki ELISA na przeciwciała krążące IgG wobec BP180 i BP230 objęto 28 pacjentów z BP. Zależność pomiędzy nasileniem skórnych złogów MBP a poziomem przeciwciał krążących IgG wobec BP180 i BP230 w BP zbadano przy użyciu testu korelacji rang Spearmana. Wykazano brak statystycznie istotnych korelacji pomiędzy procentem reakcji MBP a poziomem anti-BP180 i anti-BP230 IgG w surowicy i płynie pęcherzowym, co przedstawiono w tabeli XVIII.

Tabela XVIII. Uzyskane nieistotne korelacje pomiędzy poziomem przeciwciał anti-BP180/BP230 IgG a intensywnością skórnej ekspresji MBP, wyrażonej w procencie reakcji

	n	r	p testu
% reakcji MBP vs. anti-BP180 IgG w surowicy	27	r=-0,0452	0,8229
% reakcji MBP vs. anti-BP230 IgG w surowicy	27	r=0,0318	0,8750
% reakcji MBP vs. anti-BP180 IgG w płynie pęcherzowym	22	r=-0,2141	0,3388
% reakcji MBP vs. anti-BP230 IgG w płynie pęcherzowym	23	r=-0,1151	0,6009

Testem Manna-Whitneya porównano % reakcji MBP z % reakcji NE u chorych z BP i wykazano statystycznie istotną różnicę między nimi – średni poziom % reakcji NE $0,74 \pm 0,90$ przy średnim poziomie % reakcji MBP $0,25 \pm 0,37$ ($p=0,0070$). Ponadto testem korelacji rang Spearmana ujawniono znamiennej korelację ($r=0,4424$) pomiędzy nasileniem skórnych złogów MBP a nasileniem skórnych złogów NE u chorych z BP, co przedstawiono na rycinie 15.



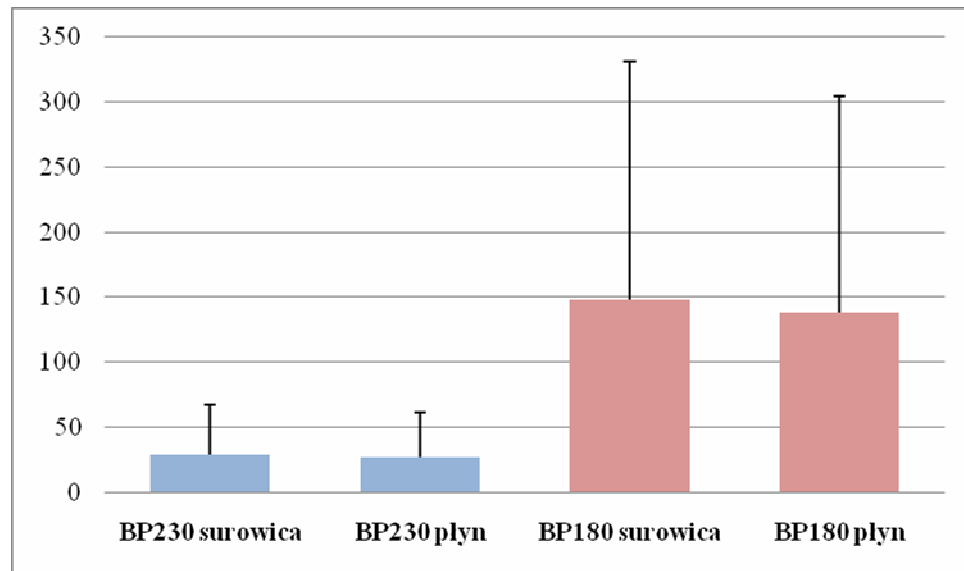
Ryc. 15. Uzyskana znamiennej korelacja pomiędzy intensywnością skórnej ekspresji NE a intensywnością skórnej ekspresji MBP, wyrażonych w procencie reakcji, u chorych z BP.

4.8. Przeciwciała IgG przeciwko BP180 i BP230 w surowicy i płynie pęcherzowym u chorych na BP

Badaniem łącznie objęto 28 surowic i 24 płynów pęcherzowych pozyskanych od chorych z BP. Średni poziom przeciwciał przeciwko BP180 i BP230 w surowicy chorych z BP przedstawiono w podrozdziale 4.2. Średni poziom przeciwciał przeciwko BP180 w płynie pęcherzowym chorych z BP wynosił $137,81 \pm 167,08$ U/ml przy minimalnej wartości 1,03 U/ml i maksymalnej 637,04 U/ml. Średni poziom przeciwciał przeciwko BP230 w płynie pęcherzowym chorych z BP wynosił $27,34 \pm 33,81$ U/ml przy minimalnej wartości 0,00 U/ml i maksymalnej 118,76 U/ml. Uzyskane wyniki przedstawiono graficznie na rycinie 16. Porównanie wyników otrzymanych przy analizie surowicy i płynu pęcherzowego przeprowadzono przy użyciu testu Wilcozona, który porównuje dane

parametry u jednego pacjenta i zobrazowano na rycinie 16. Uzyskano następujące wyniki wskazujące na brak istotnych statystycznie różnic między badanymi parametrami:

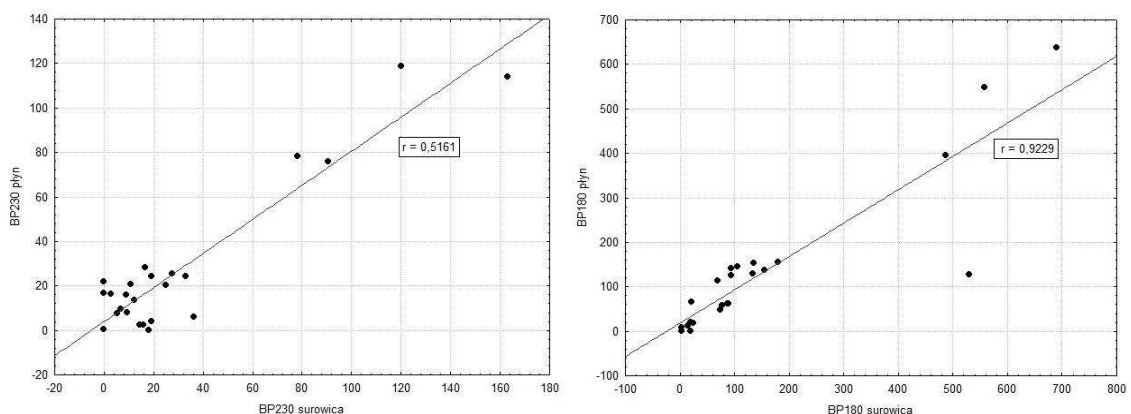
- BP180 surowica vs. BP180 płyn pęcherzowy → $p=0,3155$,
- BP230 surowica vs. BP230 płyn pęcherzowy → $p=0,5677$.



Ryc. 16. Graficzne porównanie poziomów auto przeciwciał IgG wobec BP180 i BP230 badanych w surowicach i płynach pęcherzowych pacjentów z BP.

Ponadto stosując test korelacji rang Spearmana analizowano korelacje między poziomem auto przeciwciał BP180 i BP230 w surowicy a poziomem tych auto przeciwciał w płynie pęcherzowym. Uzyskano istotnie statystycznie korelacje (ryc. 17):

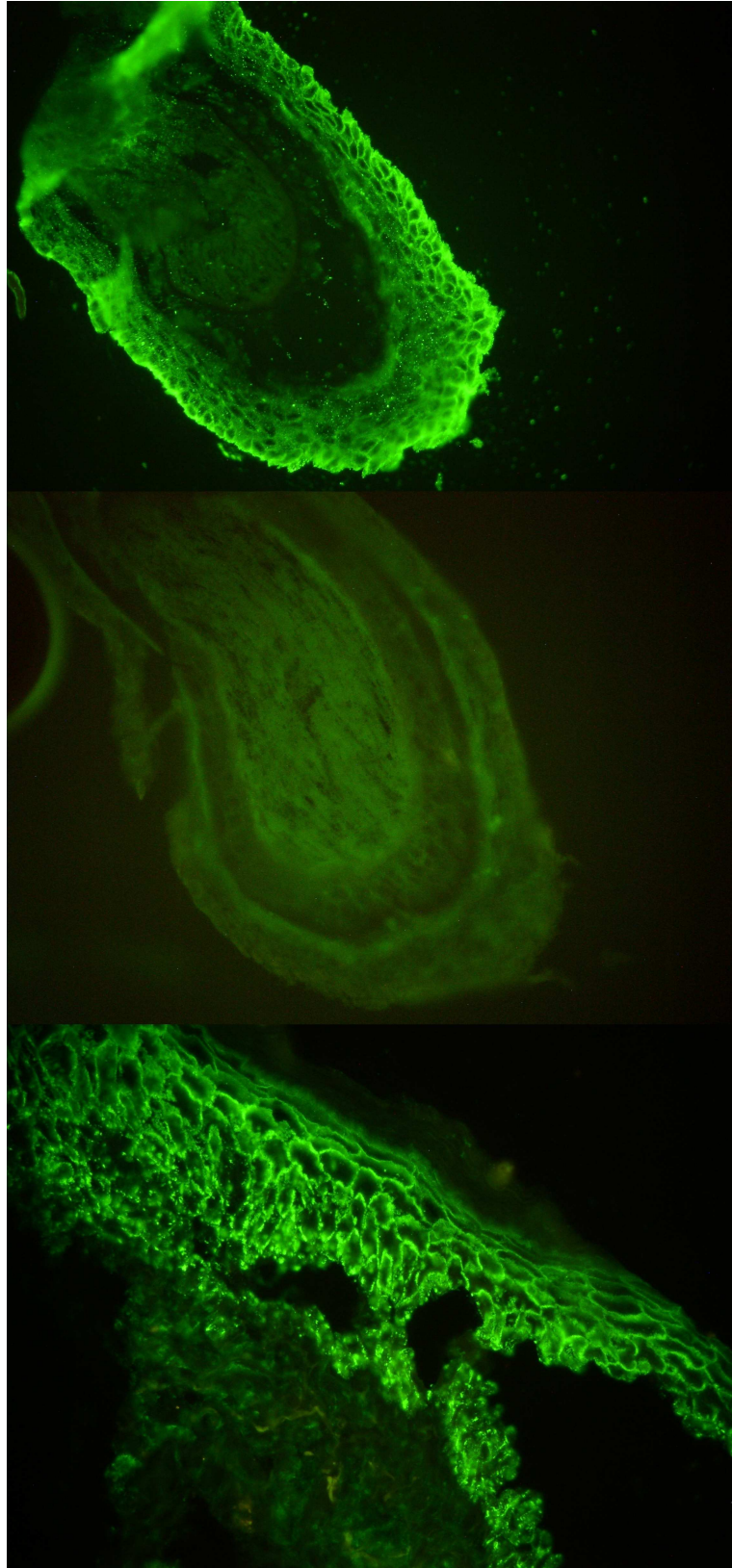
- BP180 surowica vs. BP180 płyn pęcherzowy → $r=0,9229$,
- BP230 surowica vs. BP230 płyn pęcherzowy → $r=0,5161$.



Ryc. 17. Uzyskane korelacje pomiędzy poziomami auto przeciwciał anti-BP180 i anti-BP230 IgG w surowicach i płynach pęcherzowych u chorych z BP.

4.9. Przeciwciała IgG przeciwko DSG1 i DSG3 w surowicy izłogi IgG, IgG1, IgG4 i C3 w zewnętrznej pochewce mieszka włosowego bezobjawowych krewnych chorych z pęcherzycą.

Ogółem przebadano 30 krewnych chorych z pęcherzycą. Test immunoenzymatyczny ELISA wykrywający przeciwciała IgG przeciwko DSG1 i DSG3 wykonano u 26 krewnych i u żadnego z analizowanych członków rodziny chorych nie stwierdzono wartości poziomu przeciwciał (WI) równego, bądź większego od punktu odcięcia testu (odpowiednio 41 U/ml i 40 U/ml). W siedmiu przypadkach stwierdzono poziom przeciwciał pomiędzy punktem odcięcia producenta (20 U/ml) a wyznaczonym analizą ROC dla laboratorium (41 U/ml dla Anty-DSG1 ELISA i 40 U/ml dla Anty-DSG3 ELISA), w tym 4 osoby miały niski poziom przeciwciał wobec DSG1 i DSG3, 2 wobec DSG1 i 1 wobec DSG3. Ponadto grupę 30 krewnych przeanalizowano pod kątem obecności złogów IgG, IgG1 i IgG4 w pochewce zewnętrznej mieszka włosowego techniką DIF we włosie, stwierdzając złogi IgG (+/-) i C3 (+/-) przy braku złogów IgG1 i IgG4 w dwóch przypadkach (ryc. 18). Cztery z analizowanych przypadków były niediagnostyczne, a upozostałych badanych krewnych nie wykazano techniką DIFh obecności złogów IgG, IgG1, IgG4 i C3 w pochewce zewnętrznej włosa.



Ryc. 18. Złogi IgG (+/-) (góra, oryginalne powiększenie x400) przy braku złogów IgG4 (środek, oryginalne powiększenie x400) w pochewce zewnętrznej włosa u syna (anty-DSG1 IgG 12,62 U/ml, anty-DSG3 IgG 4,10 U/ml) chorej ze skórno-słuzówkową postacią PV (anty-DSG1 IgG 130 U/ml, anty-DSG3 IgG 150 U/ml), wykazującej świecenie typu „pęcherzycowego” ujawnione przy pomocy DIF skóry okołowłoknitowej poszerzonego o oznaczanie złogów IgG4 (dół, oryginalne powiększenie x600).

5. DYSKUSJA

5.1. Uczynnienie neutrofilów mierzone intensywnością ekspresji NE a wzbudzenie procesu zapalnego w autoimmunizacyjnych dermatozach pęcherzowych

Interesującą i wciąż nie do końca zbadaną kwestią pozostaje fakt jakie czynniki wpływają na zastąpienie autoimmunizacji fizjologicznej autoimmunizacją patologiczną oraz jakie molekularne mechanizmy doprowadzają do powstania pęcherza w autoimmunizacyjnych dermatozach pęcherzowych. W związku z powyższym, patogenezą DH, BP i pęcherzycy jak dotąd, wciąż nie jest dostatecznie poznana. Jednym z wielu nie w pełni zidentyfikowanych, zwłaszcza na poziomie molekularnym, zagadnień dotyczących tych chorób jest precyzyjny mechanizm powstawania zmian skórnych charakterystycznych dla danej dermatozy. Istotną rolę w procesie powstania pęcherzy odgrywać mogą enzymy uwalniane przez komórki nacieku zapalnego. Wydaje się, że komórki zapalne wydzielają enzymy proteolityczne trawiące białka strukturalne DEJ i/lub desmosomalne, co prowadzi do tworzenia zmian skórnych i formowania pęcherza. Biologiczna funkcja enzymów proteolitycznych obejmuje również modulację funkcji różnych receptorów komórkowych (FcRs), badania ich molekularnych właściwości zdają się kluczowe do zrozumienia patofizjologii autoimmunizacyjnych dermatoz pęcherzowych i mogą się przyczynić do stworzenia nowych strategii terapeutycznych tej grupy chorób.

Zapewne zaktywowane procesem zapalnym neutrofile wydzielają enzymy proteolityczne, takie jak NE, prowadząc do destrukcji DEJ, a w konsekwencji prawdopodobnie do uformowania pęcherza. Uważa się, że NE jest głównym produktem uczynnionych neutrofilów i ważnym markerem immunohistochemicznym (Shapiro 2002), należącym do grupy proteaz serynowych produkowanych przez neutrofile. Fizjologicznie jest ona szybko i nieodwracalnie inhibowana przez antyproteazy osocza (Weiss 1989). Biologiczna funkcja NE jest związana z migracją neutrofilów za pomocą ogniskowej proteolizy, uśmiercaniem mikroorganizmów, degradacją lub aktywacją różnych białek (Shapiro 2002, Chua i wsp. 2006). Prawdopodobny mechanizm aktywacji proteazy (lub ochrony przez unieczynnieniem antyproteazami) może obejmować interakcje z tlenowymi metabolitami wywodzącymi się z dinukleotydu nikotynamidoadeninowego fosforanuoksydazy, który unieczynia antyproteazy i aktywuje MMPs. Sugeruje się, że krążące autoprzeciwciała wobec odpowiednich autoepitopów mogą mieć wpływ na pobudzenie komórek zapalnych i zapoczątkowanie procesu autoimmunizacyjnego. Opierając się na tych przesłankach w niniejszej pracy podjęto próbę

zbadań wpływu odpowiednich autoprzeciwciał (anty-DSG1/DSG3 IgG, anty-BP180/BP230 IgG, anty-eTG/tTG/npG IgA) na uczynnienie neutrofilów, mierzone poziomem NE (ryc. 5-7), i wyzwolenie procesu chorobowego, a także ustalenia czy NE może być biomarkerem procesu zapalnego w przebiegu DH, BP i pęcherzycy.

W przeprowadzonych badaniach wykazano istotną statystycznie różnicę intensywności ekspresji NE między chorymi na DH a chorymi na pęcherzycę i BP. Nie stwierdzono natomiast istotnej statystycznie różnicy między ekspresją NE u chorych z pęcherzycą i u chorych z BP, jednak ekspresja NE w grupie chorych z pęcherzycą była najmniejsza z analizowanych grup, chociaż nie były to dane znamienne statystycznie (ryc. 8). W żadnej z badanych grup (DH, BP i pęcherzycy) uczynnienie neutrofilów zdaje się nie być związane z uważanymi za patogenne krążącymi autoprzeciwciałami IgG oraz IgA, zatem przypuszczalnie nie stanowią one czynnika pobudzającego do uwalniania proteaz, w tym NE.

5.1.1. Uczynnienie neutrofilów mierzone intensywnością ekspresji NE i uczynnienie eozynofiliów mierzone surowiczym stężeniem EDN a autoimmunizacja wobec eTG, tTG, npG u chorych z DH

Dość paradoksalnym wydaje się, że DH będącą autoimmunizacyjną dermatozą pęcherzową o potencjalnie najwyższym stopniu złożoności i wieloaspektowości patogenezy, jest jednocześnie jednostką najmniej poznaną z tej grupy chorób. W związku z tym w niniejszej pracy stosunkowo sporą uwagę poświęcono zagadnieniom związanym z wyzwoleniem patologicznej odpowiedzi autoimmunizacyjnej w DH, a także kwestii optymalnej diagnostyki i sposobu monitorowania przebiegu choroby. Jak wspomniano w rozdziale. Dyskurs środowiska naukowego dotyczy również kwestii nozologicznych oraz klasyfikacji i jej kryteriów wobec jednostki chorobowej opisywanej jako DH. Dane uzyskane w prezentowanej pracy ujawniają, że proces zapalny pęcherzycy i BP jest odmienny od tego charakteryzującego DH. Można postawić taką hipotezę opierając się na wynikach przeprowadzonych w pracy badań, które ujawniły statystycznie istotną różnicę pomiędzy nasileniem ekspresji NE w DH a nasileniem ekspresji NE w BP oraz w pęcherzycy. W związku z tym wydaje się, że zgrupowanie DH wraz z BP, oparte jedynie na kryterium podnaskórkowego umiejscowienia pęcherza, a pomijające molekularno-specyficzne procesy i swoistości autoantygenowe charakterystyczne dla tych dermatoz wymagać może weryfikacji. Ponadto wykazany w pracy brak korelacji pomiędzy intensywnością skórnej ekspresji NE a poziomami autoprzeciwciał IgA wobec eTG, tTG

i npG może sugerować, że związanie tych autooprzeciwciał na skórných neutrofilach zdaje się nie być kluczowym bodźcem do uwalniania NE (Gornowicz-Porowska i wsp. 2012a). Należy rozważyć wówczas możliwość, że owy bodziec jest dostarczany nie przez zbiorczą populację IgA wobec tTG, eTG czy npG, lecz swoiście przez podklasę IgA1 (Bowszyc-Dmochowska i wsp. 2009). Ponadto wykazany w pracy brak powiązania pomiędzy uwalnianiem degradujących DEJ molekuł a pozornie patogennymi autooprzeciwciałami, może dowodzić znaczenia zjawisk nieautoimmunizacyjnych w patofizjologii DH.

Jak wskazują wyniki niniejszej pracy, prawdopodobnie neutrofile odgrywają istotniejszą rolę w tworzeniu się pęcherza w DH niż w BP i w pęcherzycy, co może być powiązane z bogatym naciekiem neutrofilowym obecnym w DH. Przy czym należy zauważyć, że liczne neutrofile występują w miejscach złogów IgA, co może sugerować, że owe złogi mogą przyczyniać się do rekrutacji i/lub lokalizacji neutrofilów wskutek zjawiska przylegania immunologicznego (*immuneadherence*) (Gornowicz-Porowska i wsp. 2012b). Przypuszcza się, że neutrofile wiążąc się do zagregowanych IgA mogą wzmacniać swoją degranulację i pobudzać do uwalniania enzymów (Gornowicz-Porowska i wsp. 2012b). Wczesne badania ujawniły obecność elastazy, zapewne NE, w treści pęcherzy u pacjentów z DH (Oikarinen i wsp. 1983), co może potwierdzać jej znaczenie patogenetyczne. Oikarinen i wsp. (Oikarinen i wsp. 1983) badając aktywność enzymatyczną kolagenazy, żelatynazy, i elastazopodobnych enzymów w DH odkryli ich wysoką aktywność w świeżych pęcherzach. Ponieważ w mikroropniach zlokalizowanych w szczytach brodawek skórných u pacjentów z DH, oprócz dominujących neutrofilów, są obecne również eozynofile, nie można wykluczyć ich udziału w patogenezie zmian skórných DH. Niektórzy wcześniejsi autorzy, aczkolwiek przed stosowaniem techniki DIF w celach diagnostycznych, opisywali zwiększoną liczbę eozynofilów we krwi i w skórze pacjentów diagnozowanych jako DH. Dotychczas, poziomy MPO i ECP były analizowane w surowicach pacjentów z DH. Caproni i wsp. (Caproni i wsp. 2002) ukazali istotną różnicę pomiędzy poziomami surowicznych MPO i ECP w DH a ich obecnością w zdrowej grupie kontrolnej. Zatem wydaje się, że MPO i ECP mogą być dobrymi markerami obecności uczynnionych, odpowiednio neutrofilów i eozynofilów (Caproni i wsp. 2002). Przeprowadzone w pracy badania, potwierdzające wstępne dane, ujawniają, że skórna ekspresja NE jest znamienne wyższa w DH niż w BP (Dmochowski i wsp. 2011), podczas gdy uprzednie doniesienia wykazały, że skórna ekspresja MBP jest znamienne wyższa w BP niż w DH (Wolnik-Trzeciak i wsp. 2005b). Dane te mogą zatem sugerować, że w skórze DH działanie eozynofilów ma mniejsze znaczenie niż działanie neutrofilów (Gornowicz-Porowska i

wsp.2012b). Ponadto, analizując rolę eozynofiliów w DH podjęto się próby oceny poziomów surowiczego stężenia EDN u pacjentów z DH (Gornowicz i wsp. 2009). Dowiedziono, że surowicze stężenie EDN nie różni się istotnie statystycznie pomiędzy pacjentami z DH a grupą kontrolną. Ponadto nie ujawniono znamiennych korelacji pomiędzy poziomem autoprzeciwciał krążących IgA anty-eTG a surowiczym stężeniem EDN w DH. Zatem wydaje się, że surowicze stężenie EDN nie jest istotnym markerem uczynnienia eozynofiliów w DH (Gornowicz i wsp. 2009), a autoprzeciwciała IgA wobec eTG nie są powiązane z uczynnieniem eozynofiliów mierzonym uwalnianiem EDN. Ponadto w rozwoju manifestacji klinicznej DH bierze się również pod uwagę udział innych komórek zapalnych oraz wydzielanych przez nie cząsteczek. W kontekście tego zagadnienia szczególną uwagę poświęca się MMPs, których zwiększoną aktywność zaobserwowano w DH (Salmela i wsp. 2001) oraz enzymom wywodzącym się z komórek tłuszczowych (Kamińska i wsp. 1999).

Proponowany proces immunopatogenetyczny w DH przypuszczalnie obejmuje uczynnienie neutrofilów poprzez oddziaływanie ich receptorów CD89 z immunokompleksami (IC) IgA (szczególnie IgA1) (Bowszyc-Dmochowska i wsp. 2009, Gornowicz-Porowska i wsp. 2011b, 2012b). Zjawisko to zapewne prowadzi do uwalniania enzymów proteolitycznych, głównie NE, niszczących DEJ i ostatecznie wzbudzających tworzenie się pęcherzy w obrębie *lamina-lucida* (Oikarinen i wsp. 1983, Bowszyc-Dmochowska i wsp. 2009, Gornowicz-Porowska i wsp. 2012b). Możliwy mechanizm działania obejmuje „zrzucanie” cząsteczek komórkowego receptora CD89 z powierzchni komórki („ściananie” receptorów pod wpływem lokalnie uwalnianych proteaz, tzw. *receptorshedding*), oddziaływanie z IgA i zmiany w katabolizmie IgA (Wines i wsp. 2006). Jednakże, nie ma jednoznacznych danych jasno wskazujących, że ten proces jest w specyficzny sposób zależny od autoprzeciwciał. Dane uzyskane w niniejszej pracy ujawniają nieistotną korelację pomiędzy poziomami krążących autoprzeciwciał IgA wobec zarówno eTG, tTG, jak i npG a intensywnością skórnej ekspresji NE u pacjentów z DH, co jest zgodne z poprzednimi danymi (Bowszyc-Dmochowska i wsp. 2009, Dmochowski i wsp. 2009), w których Bowszyc-Dmochowska i wsp. wykazali tylko korelację niskiego stopnia pomiędzy ekspresją NE a IgA wobec eTG w DH. Zatem zdaje się, że w ludzkim DH uczynnienie neutrofilów, mierzone intensywnością ekspresji NE, nie jest powiązane z poziomami surowiczych autoprzeciwciał IgA wobec eTG, tTG i npG. Opierając się na tych obserwacjach można przypuszczać, że w patogenezie DH różne lokalne czynniki są prawdopodobnie bardziej istotne niż patogenetyczne powiązanie z GSE (Gornowicz-

Porowska i wsp. 2012c manuskrypt w recenzji). Przypuszczalnie, wspomniane czynniki lokalne mogą obejmować komórkowe FcRs (głównie zlokalizowane na neutrofilach), jako kluczowy pośrednik efektorowych funkcji IgA – i szczególnie ważnej w rozwoju DH IgA1 (Gornowicz-Porowska i wsp. 2012c manuskrypt w recenzji). Jednakże, powiązanie pomiędzy GSE i DH prawdopodobnie powinno być rozważane w kontekście zjawiska ES, które to zdaje się być odpowiedzialne za manifestację DH.

Badania nad rolą FcRs w rozwoju DH są zadziwiająco ubogie, w porównaniu z analizą BP. Przypuszcza się jednak, że mają one istotny wpływ na wzbudzenie procesu patofizjologicznego, chociaż jak dotąd nie opisano czynnościowych badań wiążących FcRs z gromadzeniem patogennych IgA1 u pacjentów z DH. Co ciekawie, badając GSE Lavö i wsp. (Lavö i wsp. 1991) ujawnili, że stosunek pomiędzy IgA i ścieżkami zależnymi od FcRs może być rozważany w kontekście zaburzenia klirensu krążących ICs. Ten stosunek może mieć miejsce na drodze jednej ścieżki, która prowadzi do akumulacji ICs i późniejszego nasycenia FcRs i zmniejszenia klirensu na drodze innej ścieżki (Lavö i wsp. 1991). Istnieją dwie hipotezy odnośnie zaburzonego klirensu ICs: może on być wynikiem (i) pierwotnego defektu w funkcji FcRs z wtórnym gromadzeniem się krążących ICs, (ii) nasycenia lub przeszkody w związaniu FcRs przez krążące ICs (Lavö i wsp. 1991). Przypuszcza się, że różne typy FcRs dla IgA mogą uczestniczyć w kolejnych etapach wyzwalających rozwój zmian skórnych w DH. Wydaje się, że CD89 jest zasadniczym receptorem, który może być zaangażowany w tworzenie/powielenie IgA-IC. Jednakże, nie powinno się marginalizować funkcji innych IgA FcRs, które powinny być szczegółowo zbadane. W tym kontekście należy rozważyć możliwą rolę receptora CD71. Wiadomo, że CD71 jest zaangażowany w transcytozę IgA w CD (Matysiak-Budnik i wsp. 2008, Meresse i wsp. 2009) i przypuszczalnie bierze udział w jej patogenezie (Matysiak-Budnik i wsp. 2008, Heyman i wsp. 2009). Ponadto CD71 został ostatnio zidentyfikowany jako nowy receptor dla polimerycznego IgA (Moura i wsp. 2001), który wykazuje powinowactwo do IgA1, w związku z czym powinien być zweryfikowany w DH jako pośredniczący w tworzeniu się skórnych złogów IgA1 (Gornowicz-Porowska i wsp. 2012c manuskrypt w recenzji). Co ciekawe, CD71, ale nie CD89, uczestniczy w chronionym transporcie gliadyny w CD (Matysiak-Budnik i wsp. 2008, Meresse i wsp. 2009). Warto również wziąć pod uwagę rolę innych izotopów IgA w procesie wiązania do FcRs podczas zapoczątkowania procesu zapalnego w DH (Gornowicz-Porowska i wsp. 2012c manuskrypt w recenzji). Wiadomo, że ludzki CD89 wykazuje homologię z receptorami

specyficznymi dla regionu Fc IgG (FcγRs) i IgE (FcεR1s) (Woof 2002). W związku z tym warto zastanowić się czy może on pobudzać do procesu zapalnego sam czy musi działać w tandemie z innymi prozapalnymi czynnikami (np. IgA-IgG lub IgA-IgE) (Gornowicz-Porowska i wsp. 2012c manuskrypt w recenzji). Co więcej, zdaje się, że uwalnianie prozapalnych cząstek, jak NE, może mieć miejsce w inny sposób niż poprzez ICs. W świetle powyższego, mutacje FcRs, które wpływają na poziom powinowactwa receptora, mogą odgrywać znaczącą rolę w immunopatogenezie DH.

W świetle definicji ES początkowy zapalny proces w DH może skutkować dalszym zniszczeniem DEJ, z uwalnianiem ukrytych lub sekwestrowanych antygenów, skutkiem tego wzbudzając autoimmunizacyjną odpowiedź przeciwko DEJ (Ameen i wsp. 2000). Ameen i wsp. (Ameen i wsp. 2000) sugerują, że elementy docelowe odpowiedzi immunologicznej nie pozostają stałe, ale mogą się rozszerzać w celu objęcia innych epitopów tego samego białka lub innych białek w tej samej tkance. W tym kontekście, DH bywa opisywane w powiązaniu z CD i BP (Sander i wsp. 1989, Setterfield i wsp. 1997, Stammaes i wsp. 2010). Można zatem postulować, że mediowana komórkowo immunizacja w GSE predysponuje do ES z rozwojem późniejszej i wzrastającej autoimmunizacji skórnej w DH (Gornowicz-Porowska i wsp. 2012c manuskrypt w recenzji). Zakłada się, że pacjenci z CD mają autoprzeciwciała wobec tTG, pacjenci z DH wobec eTG a pacjenci z ataksją glutenową wobec TG6 (Stammaes i wsp. 2010), chociaż w dalszym ciągu niewyjaśnionym zagadnieniem pozostaje czy te populacje autoprzeciwciał są wynikiem ES czy są one prawdziwie skierowane przeciwko wymienionym antygenom (Stammaes i wsp. 2010). Co ciekawe, u ludzi tTG i eTG są kodowane na tym samym chromosomie – 20q11-12 (Stammaes i wsp. 2010). W świetle tego, możliwość występowania reakcji krzyżowych i ES w obrębie rodziny TGs nie powinny być zaskoczeniem (Grenard i wsp. 2001). Hipoteza ta wydaje się być zgodna z danymi uzyskanymi w pracy wskazującymi, że autoprzeciwciała IgA wobec eTG, tTG i npG są produkowane w sposób skoordynowany (ryc. 9), co może odpowiadać sugestii pierwotnego zaangażowania ES i wtórnych oddziaływań krzyżowych w odpowiedzi autoimmunizacyjnej w DH. W związku z powyższym, możliwy ES do eTG zdaje się być odpowiedzialny za rozwój DH (Sárdy i wsp. 2002a,b, Zone i wsp. 2011). Z drugiej jednak strony, obecne dane (Hadjivassiliou i wsp. 2008) sugerują, że autoprzeciwciała u większości pacjentów nie oddziałują krzyżowo pomiędzy różnymi izoformami TGs.

Omawiając możliwe znaczenie lokalnych czynników w patogenezie zmian skórnych DH, warto rozważyć zróżnicowanie izotypów IgA zaangażowanych w proces autoimmunizacyjny DH. Obserwuje się, że IgA1 jest dominującą podklasą w surowicy pacjentów DH a IgA2 przeważa w błonie śluzowej jelita grubego (Dmochowski 2006b). Skórne złogi IgA w DH składają się zarówno z IgA1 i IgA2, przy czym IgA1 jest przeważającą podklasą, chociaż istnieją doniesienia o występowaniu jedynie IgA1 w skórze DH (Hall i wsp. 1985). Niedawno przeprowadzone badania ujawniły także wzrost potencjału wędrówki do skóry (*skin-homing*) plazmoblastów IgA1 w porównaniu z plazmoblastami IgA2 w DH (Kantele i wsp. 2009), co może być powiązane z wcześniejszymi doniesieniami ujawniającymi złogi IgA1 w skórze pacjentów z DH (Olbricht i wsp. 1986, Fry i wsp. 1995). W związku z powyższym, prezentowane dane mogą sugerować, że wzrost potencjału wędrówki do skóry molekuł IgA1 w porównaniu do molekuł IgA2 może przyczynić się do powstania złogów IgA1 w skórze pacjentów z DH. Warty uwagi pozostaje, że pacjenci z CD nie mają IgA1, co może być dowodem selektywnego wiązania komórek jednojądrzastych krwi w skórze DH (Hall i wsp. 1985). Można zatem przypuszczać, że IgA w skórze pacjentów DH nie jest produkowana w jelicie lub alternatywnie, jeśli wykazuje produkcję zależną od jelita, wówczas tylko IgA1 bierze udział w powstawaniu zmian skórnych (Kantele i wsp. 2009), co może wspierać tezę o znaczeniu lokalnych czynników w manifestacji DH. Ponadto lokalny proces zapalny w obecności złogów IgA1 wzdłuż DEJ może pozwalać na zjawisko toczenia się i wiązania neutrofilów w celu silnego przylegania do ściany naczyń i przejścia do DEJ z wytworzeniem charakterystycznych zmian skórnych (Hall i wsp. 2006).

W świetle powyższego wydaje się, że zdolności aktywacyjne neutrofilów mogą być epitopowo-specyficzne i przypuszczalnie zależne od zmieniającego się profilu autoprzeciwciał i dysfunkcji FcRs.

5.1.2. Uczynnienie neutrofilów mierzone intensywnością ekspresji NE i eozynofilów mierzone intensywnością ekspresji MBP a autoimmunizacja wobec BP180 i BP230 u chorych z BP

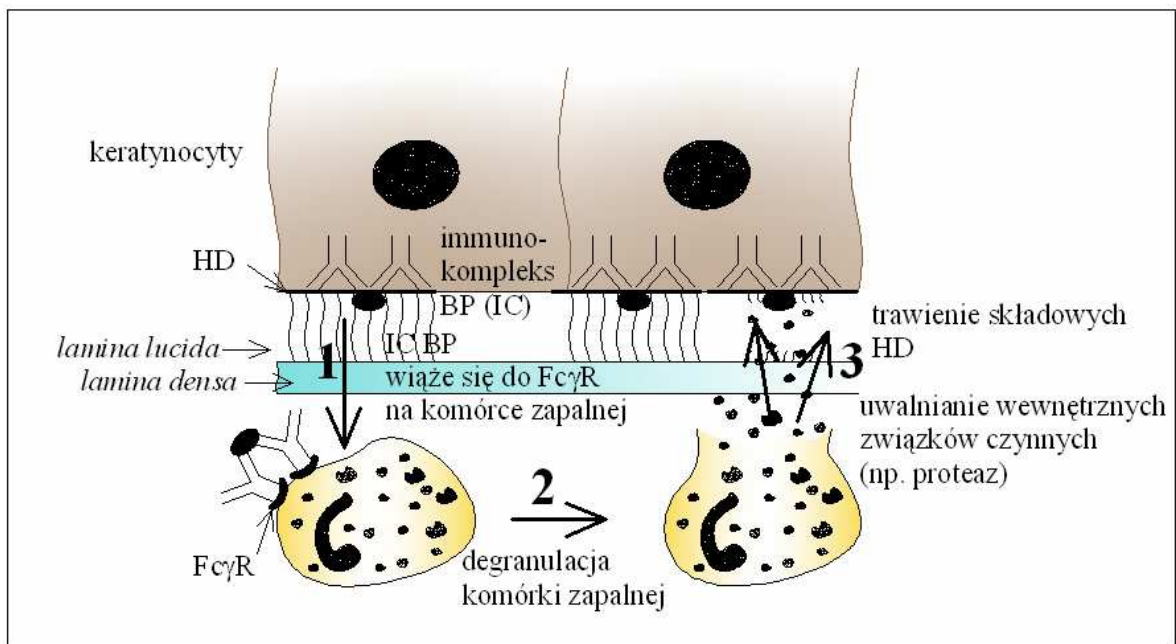
Jak wiadomo, pacjenci z BP mają krążące przeciwciała IgG przeciw dwóm białkom HD, BP180 i BP230 (Yancey 2005, Sitaru i wsp. 2005, Di Zenzo i wsp. 2007), jednak precyzyjny ich udział w powstaniu podnaskórkowego pęcherza nie został jak dotąd w pełni naświetlony. Jednak, w przeciwieństwie do pęcherzycy, liczne badania *in vivo* i *in vitro* ukazują proces patofizjologiczny BP, jako proteazo-specyficzny. Prawdopodobny

mechanizm immunopatogenezy BP obejmuje związanie patogennych autoprzeciwciał anti-BP180/BP230 IgG do antygenów w obrębie błony podstawnej keratynocytów, uczynnienie dopełniacza, degranulację komórek tucznych i infiltrację oraz aktywację neutrofilów oraz eozynofilów (ryc.19). Jednakże hipotezy naukowo-badawcze opisujące udział tych komórek zapalnych w patogenezie zmian skórnych BP nie są zgodne, w związku z czym w pracy podjęto próbę analizy autoimmunizacji wobec BP180 i BP230 na uczynnienie neutrofilów i eozynofilów. Uczynnienie neutrofilów skutkuje wydzielaniem specyficznych proteaz mających zdolność trawienia szeregu białek błony podstawnej. W przebiegu BP dochodzi również do miejscowego uczynnienia eozynofilów, które może mieć miejsce poprzez liczne eozynofilowe mediatory zapalne obecne w skórze zmienionej chorobowo i/lub płynie pęcherzowym, a obejmujące m.in. eozynofilowe białko kationowe (*eosinophil cationic protein* - ECP), główne białko zasadowe (*majorbasic protein* - MBP), neurotoksynę eozynofilową (*eosinophil-derived neurotoxin* - EDN) (Leighty i wsp. 2007, Neves i wsp. 2008). Neutrofile mogą odgrywać centralną rolę w BP poprzez wiązanie domeny Fc przeciwciał anti-BP180 do obecnych na swojej powierzchni FcγRs, co pobudza do wydzielania enzymów trawiących zewnątrzkomórkową macierz błony podstawnej (Zhao i wsp. 2006). Wcześniejsze dane ukazują, że NE degradowe błonę podstawną z wydzielaniem silnych czynników chemotaktycznych wpływających pierwotnie na neutrofile, a wtórnie na eozynofile (Bowszyc-Dmochowska i wsp. 2002). Udowodniono, że eozynofile są obecne w pęcherzach pacjentów BP, jednakże ich obecność nie jest bezwzględnym kryterium diagnostycznym (Gornowicz-Porowska i wsp. 2012b), a ich udział w procesie powstania pęcherzy w BP pozostaje niejednoznaczny. Ponadto ECP i MBP są wykrywane we krwi i w płynie pęcherzowym pacjentów BP (Frezolini i wsp. 2002). Bowszyc-Dmochowska i wsp. (Bowszyc-Dmochowska i wsp. 2002) ujawnili, że surowiczy poziom ECP nie jest przydatny do oceny intensywności procesu zapalnego u pacjentów z BP. Zatem można pokusić się o stwierdzenie, że zdarzenia patogenetyczne zależne od ECP nie są istotną częścią ogólnego procesu tworzenia pemfigoidowego pęcherza, a co się z tym wiąże eozynofile i ich uczynnienie mogą nie być kluczowym elementem wzbudzania patologicznej odpowiedzi autoimmunizacyjnej w BP. Jest to zgodne z uprzednimi badaniami na modelu mysim, które ujawniły, że patogenność autoprzeciwciał wobec mysiego BP180 jest zależna bardziej od aktywacji dopełniacza i neutrofilów niż eozynofilów (Liu i wsp. 1997). Tezę tą potwierdzają też wyniki uzyskane w niniejszej pracy, demonstrujące, że w BP średni poziom ekspresji NE jest znacząco wyższy od ekspresji MBP, co jest zgodne z badaniami

wstępny (Dmochowski i wsp. 2010, Gornowicz i wsp. 2011). Uzyskano też znamiennej statystycznie korelację pomiędzy intensywnością ekspresji NE a intensywnością ekspresji MBP (ryc. 15) oraz nieistotne korelacje pomiędzy poziomem krążących autoprzeciwciał anty-BP180 i anty-BP230 IgG a intensywnością ekspresji NE i MBP. W związku z powyższym, opierając się na przedstawionych wynikach, wydaje się, że w wykwitach w ludzkim BP uczynienie neutrofilów jest skoordynowane wraz z uczynieniem eozynofiliów, jednak aktywacje te nie są powiązane z poziomami surowiczymi lub obecnymi w płynie pęcherzowym przeciwciał IgG wobec BP180 i BP230. Mogłoby się zatem wydawać, że to jednak neutrofile odgrywają istotniejszą rolę immunopatogenetyczną w ludzkim BP od eozynofiliów. Niemniej jednak, MBP może pozostawać w tkance na długo po tym, jak eozynofile wykonają swoje czynności. Dlatego MBP może nie być optymalnym biomarkerem czynności eozynofiliów (Wolnik-Trzeciak i wsp. 2005a, Dmochowski i wsp. 2010). Bowszyc-Dmochowska i wsp. (Bowszyc-Dmochowska i wsp. 2002) przykładowo stwierdzili, że w BP czynność eozynofiliów skórnych oceniana uwalnianiem ECP jest ujemnie skorelowana z nasileniem pemfigoidowych złogów IgG4. Ponadto istnieją dane (Kagami i wsp. 2012) wskazujące, że poziom liganda dla receptora C-C chemokin typu 3, który ulega ekspresji na eozynofiliach i komórkach tucznych -CCL26 - jest znacząco podwyższony w surowicy i płynie pęcherzowym oraz ulega silnej ekspresji w skórze wykwitowej u pacjentów z BP. Jest zatem konieczne, by do oceny udziału eozynofiliów i neutrofilów w patogenezie BP stosować możliwie optymalne biomarkery, a wtedy wyjaśni się wpływ owych komórek na czynny proces chorobowy i gojenie się w tej chorobie. Wnioski te wydają się być w zgodzie z wynikami innych badaczy, którzy wykazali, że selektywne hamowanie NE lub MMP9/żelatynazy B może skutkować hamowaniem powstania pęcherzy w BP (Shimanovich i wsp. 2004, Liu i wsp. 1998). Ponadto Liu ujawnił (Liu 2003), że enzymy proteolityczne uwalniane z neutrofilów wpływają bezpośrednio na uszkodzenie błony podstawnej, powodując rozwarstwienie DEJ w BP. Przypuszczalnie niektóre z produktów uczynionych neutrofilów (NE, kolagenazy, mieloperoksydaza) są odpowiedzialne za oddzielenie naskórka od skóry właściwej w BP (Zhao i wsp. 2006). W świetle powyższego, Briggman i wsp. (Briggman i wsp. 1984) analizowali wpływ enzymów proteolitycznych, w tym NE, na integralność skóry wykazując, że najprawdopodobniej zasadnicze działanie tego enzymu dotyczy białek strukturalnych DEJ. W związku z tym można przypuszczać, że niewielka ekspresja NE w pęcherzycy opisana w rozdziale jest powiązana z lokalizacją procesu patofizjologicznego, który nie dotyczy białek strukturalnych DEJ, tylko białek desmosomalnych. Co więcej,

wyniki uzyskane przez Briggamana i wsp. (Briggaman i wsp. 1984) pozwalały stwierdzić, że enzymem powodującym najbardziej rozległe szkody wobec DEJ była NE. Ponadto zidentyfikowano substraty dla NE obejmujące kolagen typu IV i V, ale też prawdopodobnie lamininę i antygen KF1 (Briggaman i wsp. 1984). Prawdopodobny sposób działania NE polega na uczynieniu EGFR i wzbudzenie ekspresji IL-8 poprzez mechanizm angażujący receptory Toll-podobne (Wiedow i wsp. 2005, Korkmaz i wsp. 2008, Meyer-Hoffert i wsp. 2010). Przypuszczalnie zatem aktywacja EGFR może powodować rozłam HD (Mariotti i wsp. 2001). W związku z proponowaną nadrzędną rolą NE analizowano funkcje MMPs, a zwłaszcza MMP-9 w procesie powstania pęcherzy w BP. Niektóre dane wskazują, że w BP, NE przypuszczalnie działa bezpośrednio na BP180, podczas gdy MMP-9, które występuje w znacznie mniejszym stężeniu i tylko w postaci nieaktywnego zymogenu, zapewne odgrywa mniejszą rolę w rozszczepieniu DEJ (Verraes i wsp. 2001). W warunkach *in vitro* NE i MMP-9 są w stanie degradować rekombinowane białko BP180 (Liu 2003). Ponadto badania ujawniły zwiększoną ekspresję MMP-9 w BP (Niimi i wsp. 2006), jednak zdaje się, że MMP-9 bierze zapewne udział jedynie w utrzymaniu i powielaniu immunologicznego procesu leżącego u podstaw powstania pęcherza w BP. Chen i wsp. (Chen i wsp. 2001) ujawnili istotnie wyższy poziom MMPs w skórze wykwitowej BP w porównaniu ze skórą zdrową. Zademonstrowano, że uwalniana z eozynofików MMP-9 rozszczepia zewnątrzkomórkową domenę białka BP180, co może sugerować bezpośrednią rolę eozynofików w powstawaniu pęcherza w BP (Kasahara-Imamura i wsp. 2001). Możliwa rola eozynofików w aktywacji koagulacji może przyczyniać się do wystąpienia procesu zapalnego, uszkodzenia tkanek i powstania pęcherza (Chen i wsp. 2001). Zatem zdaje się, że zarówno zaktywowane neutrofile i eozynofile odgrywają istotną rolę w patogenezie ludzkiego BP, najbardziej prawdopodobnie poprzez uwalnianie enzymów degradujących DEJ, jak MMP-9 czy NE (Bowszyc-Dmochowska i wsp. 2002). Istotności omawianych komórek zapalnych w patogenezie BP dowodzą również badania czynnościowe, które obejmują systemy *in vitro* (hodowla komórkowa keratynocytów, hodowla skóry i składowych skóry inkubowanych z autoprzeciwciałami) i systemy *in vivo* (modele zwierzęce, głównie mysie, zarówno dojrzałych osobników, jak i noworodków). Liu i wsp. (Liu i wsp. 2000a) badając myszy model BP wykazali, że myszy z mutacją typu *null* genu kodującego NE lub MMP-9 nie tworzą pęcherzy. Zatem więc enzymy te zdają się być niezbędne w procesie powstania pęcherza w BP. Ta sama grupa badaczy (Liu i wsp. 2000b) odkryła też czynnościowy związek pomiędzy MMP-9 i NE mający wpływ na rozwarstwienie DEJ w

eksperymentalnym BP. Liu i wsp. (Liu i wsp. 2000b) ujawnili, że MMP-9 działa „upstream” w celu regulacji aktywności NE przez unieczynnienie inhibitora $\alpha 1$ proteinazy – $\alpha 1$ -PI, który jest fizjologicznym inhibitorem NE. (Liu i wsp. 2000b) Uzyskane dane sugerują, że NE jawi się kluczowym uszkodzającym tkankę enzymem powodującym degradację BP180 i separację DEJ, a zasadnicza rola MMP-9 polega na unieczynnieniu inhibitora proteinazy. W zawiązku z tym prawdopodobnie inaktywując $\alpha 1$ -PI MMP-9 działa w sposób pośredni pozwalając na niepohamowaną aktywność NE w celu strawienia białek strukturalnych w obrębie błony podstawnej (Liu i wsp. 2000b). Z drugiej jednak strony istnieją również dane ukazujące, że komórki zapalne nie są wymagane do wywołania patogenicznej kaskady zjawisk prowadzącej do powstania pęcherza w BP. Sugeruje to Yamamoto i wsp. (Yamamoto i wsp. 2002) klonując chemiczne cDNA BP180, ujawnili że dopełniacz i IgG anty-chemiczne BP180 zapoczątkowują rozwarstwienie DEJ bez obecności komórek zapalnych.



Ryc. 19. Proponowany mechanizm wzbudzonej autoimmunizacją modyfikacji enzymatycznej DEJ w BP, obejmujący trzy etapy: (1) patogenne IgG wiążąc się z antygenem tworzą immunokompleksy (IC). IC aktywują komórki zapalne (np. neutrofile, eozynofile) poprzez wiązanie z właściwym receptorem (FcRs). (2) Zaktywowane komórki zapalne podlegają degranulacji z wydzielaniem enzymów proteolitycznych. (3) Proteazy trawią składowe HD, prowadząc do powstania pęcherza. Według: Gornowicz-Porowska i wsp. 2012b

Opisując możliwy proces immunopatogenetyczny BP nie sposób pominąć znaczenia komórkowych FcRs, które rozpoznają wiążące się do antygenów w obrębie błony podstawnej autoprzeciwciała, co może prowadzić do wzbudzenia zdarzeń molekularnych, w szczególności enzymatycznych, obejmujących proteolizę elementów strukturalnych DEJ

(Gornowicz-Porowska i wsp. 2012b). Wiadomo, że FcRs mają kluczową funkcję w uczynnianiu lub ujemnej regulacji układu immunologicznego, a ich związanie z patogennymi przeciwciałami może skutkować uszkodzeniami tkanek. Opisano różne typy ludzkich FcRs dla każdej klasy przeciwciał: Fc γ R (Fc γ R I, Fc γ R II, Fc γ R III) dla IgG, Fc α Ri inne mniej poznane dla IgA, Fc ϵ R dla IgE, Fc μ R i Fc α/μ R dla IgM i IgA/IgM odpowiednio, Fc σ R dla IgD (Morton i wsp. 2001, Zhao i wsp. 2006). W celu analizy wpływu FcRs na uczynnienie komórek zapalnych w BP powstało również wiele modeli badawczych. Zhao i wsp. (Zhao i wsp. 2006) pracując na mysim modelu BP wykazali, że Fc γ RIII zdaje się być kluczowym receptorem dla patogennych anty-BP180 IgG, tym samym prowadząc do uczynnienia i infiltracji neutrofilów. Z kolei Yu i wsp. wykorzystując system *ex vivo* ludzkiego BP (skrawki mrożone) (Yu i wsp. 2010) udowodnili, że indukowany autoprzeciwciałami proces separacji DEJ jest zależny zarówno od Fc γ RII, jak Fc γ RIII (ale nie od Fc γ RI). W świetle powyższego, wydaje się, że Fc γ RII i Fc γ RIII są zaangażowane w patofizjologię BP. Badając zmiany FcRs na poziomie molekularnym ujawniono, że występowanie polimorfizmów może przyczyniać się do wystąpienia BP, jednak dane w tym względzie są niespójne. Proponuje się, że polimorfizm Fc γ RIIIA może wpływać na podatność nabycia BP (Weisenseel i wsp. 2007), z drugiej zaś strony Guilabert (Guilabert i wsp. 2010) postuluje, że polimorfizmy te nie mogą stanowić biomarkera BP. Jednakże niedawno (Weisenseel i wsp. 2007) wykazano, że genotyp Fc γ RIIIA-158FF (kodujący fenyloalaninę w pozycji 158 na obu chromosomach) znacząco częściej występuje w BP. Przypuszczalnie genotyp ten może wpływać na redukcję zależnego od makrofagów klirensu autoprzeciwciał IgG wobec BP180. Wiadomo, że pacjenci z BP posiadają też przeciwciała IgE, które mogą w przebiegu choroby odgrywać patogenną rolę (Fairley i wsp. 2007), zatem pod uwagę należy wziąć również receptory Fc ϵ Rs. W świetle tego, postuluje się, że Fc ϵ RI może być zaangażowany w manifestację BP. Prawdopodobnie uczynnienie eozynofiliów przez Fc ϵ RI może wpływać na patogenezę BP poprzez wyzwolenie degranulacji komórek tucznych (Kasahara-Imamura i wsp. 2001). Dane donoszące o roli komórek tucznych ujawniają, że wiązanie IgE do Fc ϵ Rs na komórkach tucznych i bazofilach wyzwała sygnalizację prowadzącą do degranulacji komórek tucznych i uwolnienia mediatorów immunologicznych (Gebbers 2001, Christy i wsp. 2007, Pate i wsp. 2010), co może mieć istotne znaczenie w patogenezie autoimmunizacyjnych dermatoz pęcherzowych (Bruns i wsp. 1978, Dresow i wsp. 2007).

Główny enzym komórek tucznych stanowi tryptaza (*mastcelltryptase* - MCT), która wraz z receptorem c-kit może aktywować sygnalizację komórkową poprzez wtórne przekaźniki.

W związku z powyższym możliwa rola IgE i MCT polega na pobudzaniu procesu zapalnego. Jednakże wciąż brak jednoznacznych dowodów wskazujących, że te molekuly wpływają na proces powstania pęcherza.

Znaczenie procesu ES w rozwoju odpowiedzi autoimmunizacyjnej ustroju zostało opisane w rozdziale 1, jednak w kontekście omawianych zjawisk należy zwrócić uwagę na wpływ ES na rozwój BP. Najprawdopodobniej ES może kształtować indywidualny przebieg BP i winno być traktowane jako istotny czynnik w ewolucji i postępie procesu chorobowego, a nie postrzegane jako epifenomen. Di Zenzo i wsp. (Di Zenzo i wsp. 2011) wykazali obecność ES u 49% analizowanych pacjentów BP. Zjawisko to miało miejsce zazwyczaj we wczesnym stadium choroby i było powiązane z zaawansowaniem choroby w chwili rozpoznania. W BP obserwowany jest wewnątrz- i międzycząsteczkowy ES, przy czym epitopy przemieszczają się z domen zewnątrzkomórkowych do wewnątrzkomórkowych (Hashimoto i wsp. 2011). U większości analizowanych przypadków ES zachodziło wewnątrzcząsteczkowo, głównie obejmując odpowiedź IgG wobec BP180 (Di Zenzo i wsp. 2011). Co ciekawe, odpowiedź IgG była zazwyczaj początkowo skierowana wobec BP180 i następnie celowała w BP230, podczas gdy IgG rozpoznające epitopy BP230 nigdy nie poprzedzały rozpoznawania epitopów BP180. Stwierdzono, że reaktywność IgG z zewnątrzkomórkowymi epitopami BP180 i wewnątrzkomórkowymi epitopami BP230 jest powiązana z ciężkością przebiegu choroby (Di Zenzo i wsp. 2011), co może sugerować patogenne znaczenie przeciwciał anti-BP230 (Hashimoto i wsp. 2011). Zatem wydaje się, że rozpoznanie ektodomeny BP180 przez IgG jest wczesnym i przełomowym wydarzeniem w rozwoju BP. Z przedstawionych zagadnień wynika złożoność immunopatogenezy BP, która obejmuje zdarzenia molekularne angażujące enzymy proteolityczne, FcRs i ES.

Co istotne, uzyskany w pracy brak istotnych statystycznie różnic pomiędzy intensywnością ekspresji NE w BP a intensywnością ekspresji NE w pęcherzycy może świadczyć o posiadaniu wspólnych nieautoimmunizacyjnych dróg patogenetycznych, w związku z czym zgrupowanie ich jako posiadających autoimmunizację wobec białek strukturalnych (Dmochowski 2006a), odpowiednio DEJ i desmosomalnych, wydaje się być uzasadnione.

5.1.3. Uczynnienie neutrofilów mierzone intensywnością ekspresji NE a autoimmunizacja wobec DSG1 i DSG3 u chorych z pęcherzycą

Większość pacjentów z pęcherzycą wykazywało niewielką ekspresję NE (0,14% reakcji NE), jednak wśród badanej grupy pięciu pacjentów posiadało zadziwiająco wysoki, w stosunku do wartości średniej, procent reakcji NE (od 3,60 do 7,80 % reakcji NE). Wiadomo, że infiltracja neutrofilowa może być związana z zakażeniami bakteryjnymi. Ponadto istnieją doniesienia o roli NE w procesie fotostarzenia (Rijken i wsp. 2009) i wzmacniającym działaniu promieniowania UV na adhezję neutrofilów do napromieniowanego naskórka w pęcherzycy indukowanej światłem (Kano i wsp. 2000). W związku z powyższym wysoka ekspresja NE w tych konkretnych przypadkach pęcherzycy może wynikać z zakażeń bakteryjnych lub długotrwałej ekspozycji na promieniowanie UVA/UVB. Wcześniejsze badania sugerowały, że w procesie akantolizy, charakterystycznego etapu patogenezy pęcherzycy, występuje pośrednictwo niektórych proteaz. Sądzono, że powstanie pęcherza w pęcherzycy pośrednio odbywa się przy udziale uwalnianych przez komórki zapalne proteaz wtórnie do wiązania przeciwciał (Farb i wsp. 1978). Jednakże uzyskane w niniejszej pracy wyniki, demonstrujące brak korelacji pomiędzy poziomem krążących autoprzeciwciał IgG anty-DSG1/DSG3 a intensywnością ekspresji NE, wskazują na brak związku pęcherzycowych autoprzeciwciał IgG z uczynnieniem neutrofilów, w związku z czym mogą potwierdzać tezę, że pęcherzycowe IgG wiążąc się do desmoglein nie wymagają zapalnych składników pośredniczących w procesie tworzenia pęcherza (Berkowitz i wsp. 2008). Jednakże należy zwrócić uwagę, że niektórzy autorzy podają istotność przeciwciał w klasie IgE, sugerując, że anty-DSG3 IgE ma korelować z aktywnością procesu chorobowego w PV (Nagel i wsp. 2010). Dane piśmiennicze ujawniają, że pęcherzycowe IgG indukują oderwanie komórek naskórka w sposób niezależny od fragmentu Fc, dopełniacza czy proteaz (Anhalt i wsp. 1986, Mascaró i wsp. 1997, Mahoney i wsp. 1999). Jednakże jako alternatywny mechanizm proponuje się hipotezę zawady przestrzennej (Yokouchi i wsp. 2009) jako bezpośredniego blokowania interakcji przylegania kadheryn desmosomalnych przez pęcherzycowe IgG, choć sam ten proces zapewne jest niewystarczający do wywołania efektu patogenicznego. Wyniki przedstawione w tej pracy są zgodne z rezultatami badań Liu i wsp. (Liu i wsp. 1999), którzy analizowali poszczególne role NE, żelatynazy B i plazminy/aktywatora plazminogenu w PV i PF stosując *in vivo* pasywny transfer IgG na modelu mysim z wyciszonym konkretnym genem. Zespół ten wykazał, że żaden z tych enzymów nie jest

wymagany w eksperymentalnym PV i PF, w związku z czym te proteolityczne enzymy nie są niezbędne do powstania pęcherza (Liu i wsp. 2004). Ponadto podobne wnioski zaprezentowała Mahoney i wsp. (Mahoney i wsp. 1999), którzy podejmując próbę badania proteaz zaangażowanych w patofizjologię pęcherzycy skupili się na aktywatorze plazminogenu (PA). Uzyskane dane ujawniają, że PA nie jest konieczny w procesie tworzenia pęcherzy i, co więcej, w dużej mierze nie wpływa na rozmiar i lokalizację pęcherzy (Mahoney i wsp. 1999). Wszystkie przedstawione powyżej dane wskazują, że raczej inne zjawiska, niż proteazo-specyficzne, są istotne w wzbudzaniu patologicznej autoimmunizacji w pęcherzycy.

Ponadto przeciwko idei proteaz jakokluczowemu czynnikowi w patogenezie pęcherzycy jest hipoteza „kompensacji desmogleinowej” (Mahoney i wsp. 1999). Hipoteza zakłada, że jeśli występuje nakładanie się ekspresji DSG1 i DSG3 w naskórku, przeciwciała skierowane tylko wobec jednego antygeny nie powodują spontanicznego powstania pęcherza, jeżeli natomiast wystąpią przeciwciała wobec obydwu desmoglein dochodzi do samorzutnego tworzenia pęcherza. Z drugiej strony jeśli DSG1 lub DSG3 ulega samodzielnej ekspresji, przeciwciała skierowane wobec tej konkretnej desmogleiny będą powodować pęcherz. To stwierdzenie popiera tezę o bezpośrednim oddziaływaniu przeciwciał pęcherzycowych na funkcję desmoglein, a nie potwierdza idei, że przeciwciała wiążące się do desmoglein powodują uwalnianie proteaz które powodują pęcherze (ponieważ w drugim przypadku druga desmogleina nie oczekuje kompensacji) (Mahoney i wsp. 1999). Zatem przypuszczalnie pęcherzycowe IgG powodują utratę adhezji komórkowej bezpośrednio przez oddziaływanie z funkcją desmoglein, aniżeli pośrednio przez uwalnianie proteaz.

W świetle powyższego, proponuje się zatem, że zasadnicze znaczenie ma w pęcherzycy przewodzenie sygnału wywołane wiązaniem się pęcherzycowych IgG do keratynocytów (ryc.20), co powoduje utratę przylegania typu komórka-komórka. Proponowanym jest, że anti-DSG IgG odgrywają rolę w patomechanizmie pęcherzycy raczej poprzez wpływ na segregację/przemieszczanie się desmoglein i aktywację specyficznych ścieżek sygnałowych niż przez pojedyncze oddziaływanie w przyleganie desmosomalne (Grando 2006). W związku z tym, zidentyfikowano i opisano szereg fosforylacji, odwracalnych modyfikacji regulujących aktywność i/lub funkcję określonych białek, zainicjowanych wiązaniem pęcherzycowych IgG do keratynocytu (Berkowitz i wsp. 2008, Gornowicz i wsp. 2010a). Propozycja ścieżki sygnałowej prowadzącej do akantolizy i zniszczenia keratynocytów wskazuje, że wiązanie pęcherzycowych IgG do błony keratynocytów

proceeds to autophosphorylation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) with subsequent activation of signaling pathways (Tron et al. 2005). The proposed mechanism of EGFR activation involves the non-specific aggregation of EGFR, followed by autophosphorylation, or with the participation of non-specific ligands, transactivation (Muller et al. 2000). Some studies conducted *in vitro* and *in vivo* show that pemphigoid IgG influences the activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK). Additionally, in the pemphigoid signaling pathway, it is postulated that small G proteins with GTPase activity, such as Rho, modulate – through regulation of cadherin activity – cell adhesion (Heupel et al. 2009). EGFR as a tyrosine kinase receptor activates the cell signaling network, including the MAPK cascade (leading to the activation of Erk and Akt), the signal transducer and activator of transcription (STAT), phospholipase C and RhoA (Gornowicz et al. 2010b). It is also worth noting the role of plakoglobin in the pemphigoid signaling pathway (Payne et al. 2004). In light of this, it should be remembered that EGF-mediated phosphorylation of plakoglobin leads to the loss of desmoplakins from desmosomes, as well as the loss of cell-cell adhesion (Heupel et al. 2009). On the other hand, some researchers have shown that acantholytic pemphigoid IgG is independent of EGFR signaling (Heupel et al. 2009). It is known that the binding of PV-IgG to the keratinocyte surface triggers a series of events, resulting in the reorganization of the cytoskeleton, activation of actin and the breakdown of intermediate filaments, including: activation of phosphatidylinositol-specific phospholipase C, increased production of 1,4,5-trisphosphate inositol and diacylglycerol, increased intracellular calcium levels, which ultimately leads to the activation of various kinases (including protein kinase C and p38 MAPK). Among the known substrates of PV-IgG-dependent phosphorylation are adhesion molecules such as E-cadherin, β -catenin and γ -catenin (plakoglobin), as well as heat shock protein 27 (HSP27) (Chernyavsky et al. 2006). Interestingly, according to published reports (Chernyavsky et al. 2006), early signaling events in PV-IgG-induced acantholysis point to the involvement of Src and EGFR. However, the mechanisms by which anti-DSG antibodies induce the loss of cell-cell adhesion in keratinocytes remain a matter of discussion. One of the explanations suggests the hypothesis of the above-mentioned spatial defect. Another explanation is based on the fact that the formation of pemphigus requires a response from cells, including m.in.

powiązane kadheryny, jak DSG3. Ponadto, cząsteczkowo-specyficzną proteolizę wobec DSG1 wykazuje też toksyna złuszcząca B (Amagai i wsp. 2002).

Warto także zauważyć, że desmogleiny pierwotnie są syntetyzowane w formie nieaktywnych prekursorów białkowych w siateczce śródplazmatycznej i później transportowane przez strefy cis i trans aparatu Golgiego (Gornowicz i wsp. 2010b). Następnie ulegają przekształceniom pod wpływem konwertazy probiałkowej (np. furyna), by stać się w pełni aktywnym biologicznie, dojrzałym białkiem i zostają zgromadzone w obrębie połączeń typu przylegania lub desmosomach (Yokouchi i wsp. 2009).

Przypuszczalnie, możliwa szybka degradacja DSG1 i/lub DSG3, a także wytypowanie ich nieaktywnych preform, może mieć związek z brakiem pobudzającego wpływu autoprzeciwciał wobec tych białek względem NE. Badania przeprowadzone w ramach pracy wykazały ponadto nieistotną korelację pomiędzy poziomami autoprzeciwciał IgG wobec DSG1 a poziomami autoprzeciwciał IgG wobec DSG3 w ludzkiej pęcherzycy, co może świadczyć, że produkcja tych populacji przeciwciał odbywa się w sposób nieskoordynowany (Dmochowski i wsp. 2012).

5.2. Przydatność testów immunoenzymatycznych ELISA wykrywających anty-eTG, anty-tTG i anty-npG IgA do diagnostyki różnicowej chorych z DH.

Wspomniana wcześniej złożoność immunopatogenezy DH wymaga ustalenia specyficznych, wiarygodnych i obiektywnych kryteriów dla diagnostyki i monitorowania stanu chorego z DH. Do chwili obecnej DIF skóry niewykwitowej pozostaje rozstrzygającym badaniem laboratoryjnym w diagnostyce DH, jednak jego inwazyjność stanowi poważne ograniczenie stosowania go w celach przesiewowych. Z kolei IIF jest techniką czasochłonną, stosunkowo kosztowną i subiektywną. Z drugiej jednak strony test ELISA wydaje się być pozbawiony tych wad i w związku z tym może być użyteczny do skryningu pacjentów DH. Aczkolwiek powstaje problem, który test ELISA jest najlepszy. Rynek proponuje szeroki wybór komercyjnych zestawów rekomendowanych do diagnostyki DH, wykrywających przeciwciała wobec różnych autoantygenów, głównie eTG, tTG i npG, i wykorzystujących autoantygeny uzyskane różnymi metodami inżynierii genetycznej. Obecnie uważa się, że ELISA jest metodą z wyboru do serologicznego przesiewu DH. Przedmiotem niniejszego zagadnienia była więc próba oceny przydatności diagnostycznej i dokładności testów ELISA wykrywających autoprzeciwciała wobec eTG, tTG i npG w prowadzeniu pacjentów z DH. Należy przy tym wspomnieć, że dane piśmiennicze ukazują rozbieżność tyczącą się specyficzności i powtarzalności wyników

uzyskanych przy pomocy wymienionych testów, co nastęrcza spore trudności w praktyce laboratoryjnej. Niektóre dane ukazują przeciwciała anty-eTG IgA u 52% pacjentów z DH (Hull i wsp. 2008), inne natomiast ujawniają ich obecność u ponad 90% chorych (Rose i wsp. 2009, 2010). Wcześniejsze doświadczenia własne wskazywały przeciwciała anty-eTG IgA u 52% pacjentów z DH (Bowszyc-Dmochowska i wsp. 2009), jednakże w analizowanej w niniejszej pracy serii pacjentów z DH tylko 47% miało podwyższony poziom anty-eTG IgA. Takie niezgodności mogą być wynikiem analizy pacjentów różniących się ciężkością/zaawansowaniem zmian skórnych charakterystycznych dla DH. W świetle powyższego istnieje potrzeba znalezienia nowego lub modyfikowanego antygeny/epitopu, który uczyni diagnostykę DH bardziej dokładną. Zatem, oprócz analizy poziomu anty-eTG IgA, winno się rozważyć przydatność testów wykrywających anty-tTG i anty-npG IgA. Aczkolwiek dane badawcze analizujące ten problem również są niespójne. Niektórzy badacze (Hull i wsp. 2008) wykryli jedynie 25% pozytywnych wyników na przeciwciała anty-tTG IgA u chorych z DH, podczas gdy inni osiągnęli ok. 79% dodatnich rezultatów (Rose i wsp. 2010, Kasperkiewicz i wsp. 2011). Wyniki analizowanych w tej pracy pacjentów z DH dały 90% seropozytywnych wyników stosując punkt odcięcia producenta. Wydaje się, że ważną kwestią pozostaje skład i model strukturalny wykrywanego antygeny/epitopu. Byrne i wsp. (Byrne i wsp. 2007) wskazują, że użycie nowego, mutagennego wariantu tTG pozbawionego triady katalitycznej zmniejsza wiązanie IgA to zmutowanego tTG ze średnią redukcją 58% w DH. Co ciekawe, Fernández i wsp. (Fernández i wsp. 2005) analizowali sześć różnych zestawów ELISA wykrywających ludzkie anty-tTG IgA, wykazując istnienie rozbieżności w czułości i specyficzności tych testów. Ponadto ujawnili, że dokładność diagnostyczna testu ulega znacznej poprawie w wyniku wyznaczenia wartości punktu odcięcia na podstawie analizy krzywych ROC, co wykonano w niniejszej pracy. Należy mieć na uwadze, że punkt odcięcia podawany przez producenta nie jest wystandaryzowany do warunków każdego laboratorium przeprowadzającego testy. Fernández i wsp. (Fernández i wsp. 2005) wykazali, że określenie punktu odcięcia z wykorzystaniem analizy krzywych ROC zmienia granicę tego punktu o ponad 50% w pięciu z sześciu analizowanych anty-tTG ELISA.

Niedawno (Sugai i wsp. 2010, Jaskowski i wsp. 2010) badacze zasugerowali przydatność syntetycznych deamidowanych peptydów wywodzących się z gliadyny (*synthetic deamidated gliadin-derived peptides* - GDR), jako antygeny wykorzystywanego w wykrywaniu wrażliwości na gluten u anty-tTG seronegatywnych pacjentów. Istnieje hipoteza, że jest to najbardziej wiarygodne narzędzie do identyfikacji wrażliwości na

gluten u pacjentów z DH (Sugai i wsp. 2006). Pacjenci z DH analizowani w niniejszej pracy wykazywali przeciwciała anty-npG w 90%, co może potwierdzać przydatność tego antygenu w celu poszerzenia informacji niezbędnych do postawienia właściwej diagnozy. Ponadto uzyskane wyniki są zbieżne z danymi Kasperkiewicza i wsp. (Kasperkiewicz i wsp. 2011), którzy wykazali przeciwciała anty-npG IgA u 84% chorych z DH. W niniejszej pracy stosując analizę krzywych ROC wyznaczono punkty odcięcia dla anty-tTG i anty-npG ELISA w warunkach laboratorium Pracowni Histopatologii i Immunopatologii Skóry, Katedry i Kliniki Dermatologii UM w Poznaniu (ryc. 10-12). W przypadku anty-tTG ELISA uzyskano 14,062 RU/ml w przypadku każdej analizowanej kombinacji badanych grup, przy punkcie odcięcia producenta równym 20 RU/ml. W przypadku anty-npG uzyskano trzy różne punkty odcięcia zależnie od stosowanej grupy kontrolnej (10,146 RU/ml u pacjentów z DH vs. kontrola negatywna, 6,672 RU/ml u pacjentów z DH vs. kontrola pozytywna i 30,081 RU/ml dla grup kontrolnych łączonych) przy punkcie odcięcia producenta 25 RU/ml. Wiadomo, że wartość punktu odcięcia zależy od geograficznej lokalizacji badanej populacji, np. ujawniono różne punkty odcięcia dla anty-tTG ELISA w populacji włoskiej i hiszpańskiej (Martini i wsp. 2001, Vivas i wsp. 2003). Co więcej, obszar AUC uzyskany w badaniu jest w każdym przypadku bliski 1, co oznacza dobrą dyskryminację i wskazuje na poprawne oddzielenie wartości badanych grup. Należy nadmienić, że ściśle kryteria włączenia do grupy badanej były w prezentowanej pracy bardzo skrupulatnie przestrzegane, a każda diagnoza była potwierdzana z użyciem technik mikroskopowych i biochemiczno-molekularnych. W negatywnej grupie kontrolnej nie stwierdzono obecności przeciwciał anty-tTG/anty-npG IgA u żadnego z analizowanych przypadków. Ponadto, odsetek seropozytywnych względem anty-tTG i anty-npG IgA przypadków w grupie IgA/neutrofilowo-mediowanych dermatoz niebędących DH był niewielki (odpowiednio 4% i 8%). Ludvigsson i wsp. (Ludvigsson i wsp. 2011) zauważyli, że przypadki z CD wykazują większe ryzyko wystąpienia łuszczycy (zarówno przed i po diagnozie CD). Zatem wydaje się, że CD może współistnieć z innymi dermatozami, nie tylko z DH. W świetle tego sugeruje się by nie rozpoznawać jedynie obecności samych anty-npG IgA u chorych z DH, pozostawiając tym samym DIF niezajętej skóry jako decydujące badanie w diagnostyce DH. Jednakże stosując metody biochemiczne wydaje się, że w warunkach laboratorium, w którym wykonywano badania do pracy, najbardziej optymalnym testem serologicznym w prowadzeniu/monitorowaniu chorych z DH jest wykrywający przeciwciała anty-tTG IgA.

5.3. Zależność między nasileniem ekspresji eTG w skórze u chorych na DH a poziomem przeciwciał krążących IgA wobec eTG

Dane naukowo-badawcze podają, że eTG jest dominującym autoantygenem w DH (Sárdy i wsp. 2002a), przy czym sugerowano, że w DH można wykryć eTG w miejscach gdzie umiejscawiają się złogi IgA (Sárdy i wsp. 2002a), a więc w skórze właściwej poniżej DEJ (Chruśliński i wsp. 2008). Istnieje sporo doniesień ukazujących autoprzeciwciała krążąceanty-eTG IgA u pacjentów z DH, jednak wciąż niewiele wiadomo odnośnie skórnej ekspresji eTG u chorych z DH. Do tej pory brakuje danych o powiązaniu ekspresji eTG w skórze i poziomie przeciwciał krążących IgA wobec eTG. Cannistraci i wsp. (Cannistraci i wsp. 2007) analizowali techniką immunofluorescencyjną i mikroskopią konfokalną złogi IgA i eTG u 11 pacjentów z CD, w tym dwóch z DH. Wykazali oni, że u osób cierpiących na DH istnieją zarówno złogi IgA i eTG, głównie w górnych warstwach skóry właściwej, lecz także w ścianach naczyń. U pozostałych pacjentów CD znaleziono niejednorodnie złogi IgA i eTG zarówno w brodawkach skórnych i w ścianach naczyń, aczkolwiek wykryto tu niższą intensywność sygnału fluorescencyjnego niż u pacjentów z DH. Ponadto wykonane podwójne barwienie z przeciwciałami anti-IgA i anti-eTG ukazały ich silną kolokalizację w górnych warstwach skóry właściwej u pacjentów z DH i słabszą kolokalizację u pacjentów bez DH (Cannistraci i wsp. 2007). Preisz i wsp. (Preisz i wsp. 2005) badali metodą DIF złogi eTG wzdłuż układu naczyniowego skóry DH. Zauważyli, że eTG kolokalizuje ze skórnymi złoгами IgA w ścianach naczyń i w obrębie organów okołonaczyniowych i wewnątrznaczyniowych rozsianych brodawek. Co więcej, ujawnili, że tTG nie kolokalizuje z badaną immunoglobuliną. Chruśliński i wsp. (Chruśliński i wsp. 2008) stosując techniki obrazowe ujawnili, że występowanie złogów eTG w skórze w sąsiedztwie DEJ (ryc. 13) ma miejsce jedynie u mniejszości chorych. Przeprowadzona w pracy analiza wykazała nieistotną korelację pomiędzy poziomem krążących anti-eTG IgA a skórną ekspresją eTG, co może świadczyć iż w DH procesy autoimmunizacji wobec eTG na poziomie krwi obwodowej i na poziomie skóry nie są od siebie zależne. Być może ujawniono by owe zależności, badając te zjawiska na poziomie epitopów eTG i podklasy IgA1.

5.4. Przeciwciała IgG przeciwko BP180 i BP230 w surowicy i płynie pęcherzowym u chorych z BP

Wydaje się, że spośród autoimmunizacyjnych dermatoz pęcherzowych, najczęstszą jednostką chorobową występująca w Europie, w tym w Polsce jest BP, przy czym dotyczy ona zazwyczaj ludzi starszych. Niestety wciąż brakuje precyzyjnych danych opisujących trend epidemiologiczny BP na terenie naszego kraju. Można jednak przypuszczać, że częstość występowania choroby może się zwiększać w związku z wydłużaniem średniej długości życia stanowiąc istotny problem społeczno-medyczny. Diagnostyka BP nastrocza sporo trudności i wymaga ustanowienia konsensusu naukowego. Postuluje się, że rozpoznanie BP winno opierać się na rozważnej analizie wszystkich dostępnych danych klinicznych i laboratoryjnych, a nie w wyniku ledwie jednego badania pracownianego (Pietkiewicz i wsp. 2011). W związku z tym, rutynowe metody diagnostyczne, jak ocena histologiczna, bezpośrednia i pośrednia immunofluorescencja oraz biochemiczne techniki molekularne (ELISA, immunobloting) zazwyczaj są łączone w celu określenia diagnozy (Patsatsi i wsp. 2008). Płyn pęcherzowy często powstaje spontanicznie podczas czynnej fazy BP. Udowodniono, że płyn pęcherzowy pacjentów z autoimmunizacyjnymi chorobami pęcherzowymi zawiera mediatory zapalne, cytokiny, proteazy, plazminogen czy czynniki chemotaktyczne (Schmidt i wsp. 1996, Katayama i wsp. 1984). Pierwsze spostrzeżenie obecności przeciwciał wobec błony podstawnej w płynie pęcherzowym BP pochodzi od Bean (Bean 1970).

W niniejszej pracy przy pomocy testu ELISA zbadano poziomy anty-BP180 IgG i anty-BP230 IgG w płynach pęcherzowych i surowicach nowo zdiagnozowanych pacjentów BP przed rozpoczęciem leczenia, celem sprawdzenia czy surowicę chorych, jako materiał diagnostyczny do stosowanego testu, można zastąpić płynem pęcherzowym. W pracy wykazano brak istotnych statystycznie różnic pomiędzy poziomami IgG wobec BP180 i IgG wobec BP230 w płynach pęcherzowych i surowicy (ryc. 16). Ponadto udowodniono znamienne korelacje pomiędzy poziomem anty-BP180 IgG w płynie pęcherzowym i surowicy oraz anty-BP230 IgG w płynie pęcherzowym i surowicy (ryc. 17). Rezultaty te są zgodne z przeprowadzonymi badaniami wstępnymi, które sugerowały dodatnią korelację pomiędzy poziomami IgG anty-BP180 i anty-BP230 w surowicy i płynie pęcherzowym oraz demonstrowały brak istotnej statystycznie różnicy pomiędzy ich poziomami (Dmochowski i wsp. 2007a, Bowszyc-Dmochowska i wsp. 2008, Dmochowski i wsp.

2010). W związku z powyższym wydaje się, że u chorych z BP nasilenie autoimmunizacji zależnej zarówno od IgG anty-BP180, jak i IgG anty-BP230, zapewne nie różni się na poziomie krwi obwodowej i skóry. Zatem więc u chorych z BP płyn pęcherzowy mógłby zastąpić surowicę jako materiał diagnostyczny dla testu ELISA, ułatwiając tym samym diagnozę na poziomie molekularnym w skórze zmienionej chorobowo (Bowszyc-Dmochowska i wsp. 2008). Przedstawioną tezę potwierdzają też wyniki uzyskane w populacji greckiej (Patsatsi i wsp. 2008), gdzie analizując poziomy przeciwciał IgG anty-BP180 i anty-BP230 metodą ELISA w surowicy i płynie pęcherzowym greckich pacjentów BP wykazano przeciwciała anty-BP180 IgG w 69,2% surowic i 61,5% płynów pęcherzowych. Ponadto ta sama grupa badaczy (Patsatsi i wsp. 2008) ujawniła przeciwciała anty-BP230 IgG w 61,5% surowic i 30,8% płynów pęcherzowych oraz wykazała, że poziomy anty-BP180 IgG i anty-BP230 IgG w surowicy i płynie pęcherzowym są skorelowane (uzyskali odpowiednio $r=0,91$ i $r=0,87$), co jest zgodne z naszymi danymi w populacji polskiej. Uzyskane wyniki wskazują, że ocena płynu pęcherzowego techniką ELISA może być przydatnym narzędziem diagnostycznym BP, zwłaszcza u starszych pacjentów, w szczególności zaś u tych, którzy odmawiają biopsji lub u których występuje słaby dostęp żylny oraz także u dzieci (Patsatsi i wsp. 2008). Stosując inne techniki badawcze, Zhou i wsp. (Zhou i wsp. 1998) analizowali płyn pęcherzowy do diagnostyki podnaskórkowych chorób pęcherzowych, w tym BP, przy pomocy IIF. Ujawnili, że miano przeciwciał w płynie pęcherzowym było takie samo, lub o jedno rozcieńczenie mniejsze, niż miano surowicze w większości przypadków, a także nie wykazano istotnych różnic pomiędzy tymi wynikami (Zhou i wsp. 1998). Kilka lat później podobne założenia przyjęli (Daneshpazhooh i wsp. 2004). Wykazali oni, że 92% z analizowanych pacjentów BP miało pozytywny wyniki IIF z surowicą i również 92% pacjentów BP miało pozytywny wynik IIF z płynem pęcherzowym. Miana przeciwciał uzyskane tymi dwoma sposobami również nie wykazywały różnic istotnych statystycznie. Badacze (Daneshpazhooh i wsp. 2004) sugerują, że wykonanie testu z płynem pęcherzowym jako dodatkowego do analizy surowicy zmniejszy liczbę wyników fałszywie ujemnych IIF uzyskanych przy wykorzystaniu tylko jednego substratu/materiału. Zauważono, że w rzadkich przypadkach, IIF z płynem pęcherzowym może być pozytywny, przy negatywnym wyniku IIF surowicy, zatem u pacjentów niedawno/świeżo prezentujących zmiany BP lub mających *localizedBP*, IIF z płynem pęcherzowym może być bardziej przydatne niż z surowicą (Daneshpazhooh i wsp. 2004).

Szukając alternatywy dla badania surowicy badacze analizowali autoimmunizację swoistą dla BP również na poziomach innych płynów ustrojowych. Allen *wsp.* (Allen *wsp.* 2001) przy pomocy IIF oceniali próbki moczu i surowicy pacjentów z BP. Wykazali, że wykrycie autoprzeciwciał IgG w moczu jest skorelowane z wysokim mianem autoprzeciwciał IgG w surowicy (Allen i *wsp.* 2001). W związku z tym, przeciwciała wobec składowych DEJ obecne w moczu mogą mieć znaczenie kliniczne. Zatem, opierając się na tych rezultatach, również można postulować analizę moczu w BP jako alternatywę badania surowicy. Takie rozwiązanie zmniejszy inwazyjność badania i uprości metodykę testu. Badanie moczu metodą ELISA u pacjentów z BP nie zostało jak dotąd wykonane. Wiadomo jednak, że ELISA cechuje się większą czułością w wykrywaniu przeciwciał BP niż IIF (Barnadas i *wsp.* 2008, Di Zenzo i *wsp.* 2008).

Jak przedstawiono powyżej, jedynie kilka prac ujawnia możliwość analizy płynu pęcherzowego techniką IIF, a dane z wykorzystaniem testu ELISA są wyjątkowo skąpe. Wyniki uzyskane w niniejszej pracy wraz z danymi piśmienniczymi sugerują, że płyn pęcherzowy może być stosowany jako alternatywny materiał diagnostyczny dla surowicy dla testu ELISA i IIF w BP. W związku z tym praca proponuje nowatorskie i mało inwazyjne rozwiązanie diagnostyczne, którego powszechne wprowadzenie do praktyki zwiększy bezpieczeństwo badań diagnostycznych.

5.5. Analiza genetycznego występowania pęcherzycy na podstawie badań bezobjawowych krewnych chorych z pęcherzycą

Przyczynkiem do podjęcia tej tematyki badań było opisywanie w piśmiennictwie pęcherzycy, jako choroby wykazującej skłonności genetyczne. Ponadto badanie to miało na celu ujawnienie biochemicznych wykładników autoimmunizacji pęcherzycowej w surowicach zdrowych biologicznych krewnych i ocenę przydatności mało inwazyjnej metody diagnostycznej bezpośredniej techniki immunofluorescencyjnej we włosie (Dmochowski i *wsp.* 2007b). Wiadomo, że czynniki immunogenetyczne i środowiskowe będąc wzajemnie powiązanymi mogą zapoczątkować utratę tolerancji immunologicznej wywołując produkcję patogennych przeciwciał. Dane przedstawiające badania genetyczne nad pęcherzycą w różnych populacjach zamieszkujących odrębne regiony geograficzne sugerują istnienie genetycznej predyspozycji do rozwoju choroby i podają powiązanie choroby z określonymi antygenami zgodności tkankowej klasy I i II (Torzecka i *wsp.* 2003a). Wpływ czynników środowiskowych, zwłaszcza u osób predysponowanych genetycznie umożliwia rozwój choroby. Badania populacji polskiej stwierdzają znamienne

statystycznie wyższą u chorych na pęcherzycę niż w populacji kontrolnej (zdrowe, niespokrewnione osoby populacji polskiej) częstość występowania HLA-DRB1*04 i DRB1*14 oraz niższą częstość występowania DRB1*07 (Torzecka i wsp. 2003a). Występowanie podłoża immunogenetycznego w pęcherzycy zostało szeroko udokumentowane. Liczne prace wykazały, że antygeny HLA-DR*4 i DR*14 występują istotnie częściej u pacjentów z PV należących do różnych grup etnicznych, w tym. u Żydów (Ahmed i wsp. 1990), Włochów (Lombardi i wsp. 1999) i Japończyków (Miyagawa i wsp. 1997, Miyagawa i wsp. 1999). Ponadto istnieją dane, że przeciwciała wobec DSG3 są produkowane w restrykcji HLA-DRB1*0402 i DQB1*0503 (będącym w silnym nierównoważnym sprzężeniu z DRB1*1401) i indukują powstanie zmian skórnych. Wykazano również, że spośród APC tylko te posiadające ekspresję HLA-DRB1*0402 i DQB1*0503 mają zdolność prezentowania DSG3 autoreaktywnym limfocytom Th1 i Th2 (Veldman i wsp. 2003). Powiązania PF z antygenami HLA jest słabiej udokumentowane. W tym kontekście badacze wykryli związek PF z HLA-DRB1*04 i HLA-DRB1*14 (Miyagawa i wsp. 1997, Lombardi i wsp. 1999). Udowodniono także, że prezentacja zewnątrzkomórkowej domeny DSG1 zachodzi w restrykcji określonych alleli. Jednak sama obecność właściwych antygenów nie determinuje jednoznacznie do rozwoju choroby (możliwość występowania choroby u osób niebędących nosicielami). Ponadto w piśmiennictwie opisywane są przypadki rodzinnego występowania pęcherzycy (Brenner i wsp. 1985, Feinstein i wsp. 1991, Narbutt i wsp. 2001). Jednakże, chociaż związek pęcherzycy z HLA został udokumentowany, przedstawiono tylko nieliczne dowody występowania rodzinnego pęcherzycy. Co ciekawe, analizując 234 przypadki pęcherzycy Beutner i Chorzelski ujawnili tylko 2 rodzinne przypadki wystąpienia tej choroby (Beutner i wsp. 1976). W licznych doniesieniach ukazywano przeciwciała krążące wobec DSG1/DSG3 u zdrowych biologicznych krewnych pierwszego stopnia chorych na pęcherzycę, jednakże ich znaczenie nie zostało w pełni wyjaśnione. Ahmed i wsp. wykazali niskie poziomy pęcherzycowych przeciwciał u 48% krewnych pacjentów z PV (Ahmed i wsp. 1993), a Kricheli i wsp. ujawnili takie przeciwciała u 15% zdrowych krewnych stosując metodę IIF (Kricheli i wsp. 2000). Ponadto, badania włoskiej populacji przy zastosowaniu IIF ujawniły 31% seropozytywnych krewnych pęcherzycowych chorych (Mohimen i wsp. 1993). Jak przedstawiają powyższe dane uzyskane wyniki nie są zgodne, cechując się dużą rozbieżnością. Badając poziomy krążących przeciwciał metodą ELISA i IIF ujawniono odpowiednio 42,8% i 19,8% seropozytywnych członków rodziny pacjentów z pęcherzycą (Torzecka i wsp. 2003b). Z przedstawionych rezultatów wynika

duża rozbieżność danych uzyskanych przy zastosowaniu tej samej metody (IIF lub DIF), jak również porównując dane uzyskane przy pomocy różnych technik. Analizując wyniki badaczy (Torzecka i wsp. 2003b) i opierając się na doświadczeniach własnych można stwierdzić, że test ELISA wykrywający przeciwciała antydesmogleinowe cechuje się wyższą specyficznością i jest najwłaściwszym testem do analizy specyficznosci chorobowej charakteryzującej się obecnością patogennych przeciwciał pęcherzycowych, a w wielu przypadkach miano ELISA koreluje z aktywnością choroby (Torzecka i wsp. 2007). Należy zauważyć, że niewiele jest danych o wykrywaniu pęcherzycowych przeciwciał u zdrowych krewnych metodą ELISA anty-DSG1/DSG3 a pozytywne rezultaty głównie wykrywane są u rodzeństwa chorych z pęcherzycą (Torzecka i wsp. 2007). Torzecka i wsp. (Torzecka i wsp. 2007) stosując test ELISA anty-DSG1/DSG3 uzyskali 19,4% dodatnich wyników u krewnych chorych z pęcherzycą. W niniejszej pracy, obierając za punkty odcięcia obliczone analizą ROC 40 AU/ml dla anty-DSG3 ELISA i 41 AU/ml dla anty-DSG1-ELISA (Dańczak-Pazdrowska 2005), nie uzyskano żadnego seropozytywnego wyniku wśród analizowanych członków rodziny chorych z pęcherzycą. Co ciekawe, w obydwóch badaniach zastosowano te same zestawy immunoenzymatyczne ELISA MBL, jednak obrano inne punkty odcięcia (w badaniu zespołu Torzecka i wsp. stosowano 14 AU/ml dla anty-DSG1 ELISA i 7 AU/ml dla anty-DSG3 ELISA). Przy czym należy wspomnieć, że producent obecnie rekomenduje podawanie wyników jako pozytywnych przy poziomie powyżej 20 AU/ml. Wśród krewnych analizowanych w tej pracy 7 osób (26,9% badanej grupy) miało poziomy przeciwciał anty-DSG1/DSG3 mieszczące się pomiędzy punktem odcięcia producenta, a wyznaczonym analizą ROC dla laboratorium (4 osoby miały krążące IgG wobec DSG1 i DSG3, 2 osoby wobec DSG1 i 1 osoba wobec DSG3). Przedstawione powyżej różnice między testem ELISA a IIF mogą wynikać z tego, że ELISA selektywnie wykrywa przeciwciała przeciwko zewnątrzkomórkowej domenie desmogleinowej. Ponadto przeciwciała u zdrowych krewnych rozpoznawać mogą inne komórkowe struktury niż desmogleiny (Torzecka i wsp. 2007). Rozważając powyższe wyniki należy stwierdzić, że niewątpliwie istotną w porównywaniu danych pozostaje kwestia interpretacji wyniku, a prawidłowa analiza krewnych technikami biochemicznymi wymaga uprzedniej prawidłowej standaryzacji warunków doświadczeń.

Wobec niewystarczającej specyficznosci biochemicznych technik diagnostycznych w pęcherzycy, istnieją także doniesienia o badaniu członków rodziny pacjentów z pęcherzycą z wykorzystaniem metody DIF. Jednakże analizowano w tym kontekście tylko tradycyjny

DIF wycinka skóry, a nie nowatorską technikę DIFh. Rezultaty te są jednak również niejednorodne i podają od 4% do 25% krewnych posiadających dodatnie wyniki DIF skóry (Brandsen i wsp. 1997, Kavala i wsp. 2007). Na możliwość występowania antygenów pęcherzycowych w mieszkcu włosowym jako pierwsi zwrócili uwagę Wilson i wsp. w latach 90. ubiegłego stulecia (Wilson i wsp. 1991), a z czasem zostały opisane cechy i implikacje diagnostyczne tego zjawiska (Wolnik-Trzeciak i wsp. 2006). Jak podają dane źródłowe (Dmochowski i wsp. 2007b) w DIFh wykrywa się pęcherzycowe złogi immunoreaktantów w zewnętrznej pochewce włosa u licznych chorych na nieleczoną pęcherzycę bez wykwitów na owłosionej skórze głowy i że takowe złogi można stwierdzić nie tylko u objawowych chorych na PV ale też u klinicznie bezobjawowych chorych na PV. Należy więc stwierdzić, że techniką tą można wykryć złogi w sposób niezależny od klinicznych cech zajęcia owłosionej skóry głowy procesem pęcherzycowym. W związku z powyższym w niniejszej pracy podjęto próbę sprawdzenia czy u bezobjawowych biologicznych krewnych chorych z pęcherzycą można wykryć złogi immunoreaktantów przy zastosowaniu DIFh. U żadnego z naszych analizowanych krewnych nie wykryto jednoznacznych pęcherzycowych złogów immunoreaktantów w pochewce zewnętrznej włosa metodą DIFh. W dwóch przypadkach stwierdzono wątpliwe złogi pęcherzycowe w klasie IgG (+/-) i składowej dopełniacza C3 (+/-), przy czym nie stwierdzono jednak złogów IgG4 i IgG1 (ryc. 18). Zatem, wydaje się że w niektórych przypadkach krewnych tylko surowicze przeciwciała wobec DSG1 i DSG3, ale nie pęcherzycowe złogi w mieszkcu włosowym, są wykrywalne co może sugerować że procesy patofizjologiczne na poziomie naskórkowym mają większe znaczenie diagnostyczne i przypuszczalnie patogenne niż te na poziomie surowiczym (Dmochowski i wsp. 2007b). Konkludując można stwierdzić, że wobec niemierności wyników surowicznych testów biochemicznych (ELISA, IIF), DIFh jawi się jako najbardziej specyficzne z małoinwazyjnych metod pracownianej diagnostyki pęcherzycy (Dmochowski i wsp. 2007b).

Pomimo istnienia genetycznych predyspozycji kwestią do rozważenia pozostaje dlaczego biologiczni krewni pierwszorzędowi nie rozwijają klinicznej manifestacji choroby. Wyjaśnieniem tego może być hipoteza Kricheli i wsp. (Kricheli i wsp. 2000), która sugeruje, że poziomy produkowanych u krewnych przeciwciał są na tyle niskie, że nie wiążą się do antygenów desmosomalnych i nie indukują akantolizy. Jak przedstawiono powyżej, większość badań podaje obecność przeciwciał krążących przy braku złogów immunoreaktantów w skórze, co może sugerować istnienie immunologicznej lub mechanicznej bariery, która przeszkadza w interakcji pomiędzy krążącymi IgG a

strukturami skóry (Kavala i wsp. 2007). Tezę tą potwierdzają doniesienia naukowe (Torzecka i wsp. 2007), gdzie DIF skóry wykonany w pozytywnych przypadkach IIF i/lub ELISA dawał zawsze negatywny rezultat. Bariera ta może być zaburzona czynnikami zewnętrznymi (egzogennymi), co może skutkować klinicznym rozwojem dermatozy. Jednakże takie wyniki mogą być też spowodowane przez ukryte epitopy, nie ekspozowane *in vivo* lub przez małe stężenie krążących przeciwciał (Torzecka i wsp. 2007).

Zwrócono także uwagę na odmienną dystrybucję podklas u chorych i ich krewnych: poziomy IgG1 są zbliżone u krewnych i chorych, natomiast poziomy IgG4 są wyższe u chorych a niższe u krewnych (Krichelli i wsp. 2000). Z drugiej jednak strony istnieją dane, w których nie stwierdzono różnic pomiędzy dystrybucją IgG1 a IgG4 u krewnych (Dańczak-Pazdrowska 2005). Należy zatem rozważyć możliwość istotnej roli podklas w patogenezie pęcherzycy. Proponowana hipoteza głosi, że profil podklas u zdrowych krewnych jest podobny jak ten zaobserwowany u pacjentów w okresie klinicznej remisji (Torzecka i wsp. 2007). W piśmiennictwie można napotkać też dane, że u krewnych dominuje IgG1 (Hertl i wsp. 2001), a u pacjentów w czynnym stanie choroby IgG4. Zjawisko to pozostaje w zgodzie z obserwowaną w surowicy chorych przewagą limfocytów Th2, które pobudzają limfocyty B do produkcji IgG4 (Kricheli i wsp. 2000, Veldman i wsp. 2003). Jak wykazali Veldman i wsp. autoreaktywne w stosunku do DSG3 limfocyty Th2 wykrywane są z równą częstością w surowicach PV niezależnie od fazy choroby, ale w fazie przewlekłej nad limfocytami Th2 ilościowo przeważają limfocyty Th1 (Veldman i wsp. 2003). Dodatkowo stwierdzono, że zdrowi nosiciele antygenów zgodności tkankowej predysponujących do rozwoju PV posiadają w surowicy wyłącznie limfocyty Th1 autoreaktywne w stosunku do DSG3. Zdrowi ochotnicy natomiast, niebędący nosicielami wspomnianych antygenów, nie posiadali żadnych limfocytów, które wykazywałyby reaktywność w stosunku do DSG3. Sam brak patogenności przeciwciał pęcherzycowych pochodzących od zdrowych krewnych, niezależnie od podklasy w której występują, potwierdza fakt, iż nie wzbudzają one akantolizy po stymulacji hodowli komórkowych (Krajewski i wsp. 2004).

Jednakże samo występowanie przeciwciał nie jest wystarczające do rozwoju choroby (seropozytywni krewni nie rozwijają pęcherzycy), w związku z czym rodzi się pytanie czy rodziny chorych są obarczone ryzykiem wystąpienia choroby. Wygląda na to, że przeciwciała krewnych nie rozpoznają patogennych epitopów, jednak dalsze mapowanie tych przeciwciał powinno rozwikłać tę kwestię (Torzecka i wsp. 2007). Wydaje się zatem, że zdrowi krewni chorych z pęcherzycą, u których stwierdzono dodatnie wyniki IIF lub

ELISA, powinni być monitorowani kliniczno-laboratoryjnie z uwagi na prawdopodobieństwo klinicznego ujawnienia się pęcherzycy. Stwierdzić również można, że badanie DIFh, rozszerzone o ocenę złogów IgG4 i IgG1, posiada większą wartość diagnostyczną, niż metody biochemiczne służące ocenie przeciwciał krążących.

6. WNIOSKI

- Wydaje się, że proces zapalny DH jest odmienny od tego charakteryzującego pęcherzycę i BP -istotnie większeuczynnienie neutrofilów, mierzoneintensywnością ekspresji NE jako biomarkera, jest obserwowane w DH.
- Wydaje się, żeautoprzeciwciała anty-eTG, anty-tTG, anty-npG IgA w DH, anty-BP180 i anty-BP230 IgG w BP oraz anty-DSG1 i anty-DSG3 IgG w pęcherzycy nie mają bezpośredniego wpływu na pobudzenie neutrofilów do uwalniania NE.
- DIF pozostaje testem definiującym w diagnostyce DH, jednak testy immunoenzymatyczne wykrywające anty-eTG, anty-tTG i anty-npG IgA można zastosować w celu poszerzenia wiedzy o chorym, kluczowej przy podejmowaniu decyzji odnośnie terapeutycznego prowadzenia chorego, przy czym anty-tTG ELISA wydaje się optymalną techniką serologiczną do badań przesiewowych w kierunku DH.
- Wydaje się, że u chorych z DH autoprzeciwciała anty-eTG IgA nie mają bezpośredniego wpływu na uczynnienie eozynofilów mierzone uwalnianiem EDN.
- Wydaje się, że u chorych z DH poziomautoprzeciwciałIgA wobec eTG nie jest związany z ekspresją eTG w skórze w sąsiedztwie DEJ.
- Wydaje się, że u chorych z BP czynność neutrofilów, badanaintensywnością ekspresji NE jako biomarkera, jest wzajemnie skoordynowana z czynnością eozynofilów, badanaintensywnością ekspresji MBP jako biomarkera.
- Autoimmunizacja wobec BP180 i BP230 w BP nie różni się na poziomie krwi obwodowej i skóry, w związku z czym możnaby stosować płyn pęcherzowy jako nieinwazyjny materiał diagnostyczny alternatywny dla surowicy.
- U bezobjawowych krewnychchorych z pęcherzycą wykrywa się autoprzeciwciała anty-DSG1 i anty-DSG3 IgG w niskim/miernym mianieprzy braku jednoznacznych pęcherzycowych złogów immunoreaktantów w mieszku włosowym, co może świadczyć o istotności patofizjologii mieszkowej w rozwoju pęcherzycy (DIFh poszerzona o oznaczanie złogów IgG4 jest bardziej miarodajnaod metod biochemicznych służących do ocenyautoprzeciwciał).

7. STRESZCZENIE

Precyzyjne molekularne mechanizmy wzbudzające proces zastąpienia autoimmunizacji fizjologicznej autoimmunizacją patologiczną i warunkujące powstawanie pęcherzy w pęcherzycy zwykłej (PV) i liściastej (PF), pemfigoidzie pęcherzowym (BP) i opryszczkowatym zapaleniu skóry (DH), jak dotąd, nie zostały poznane. Przymuszczalnie istotną rolę odgrywać mogą komórki nacieku zapalnego, zwłaszcza neutrofile, które uczynnione procesem zapalnym wydzielają szereg enzymów proteolitycznych, w tym elastazę neutrofilów (NE). NE zapewne jest enzymem odpowiedzialnym w procesie powstawania pęcherzy za zniszczenie połączenia skórno-naskórkowego (DEJ), jednak jego rola nie została jednoznacznie naświetlona, zwłaszcza w kontekście autoimmunizacji wobec poszczególnych autoantygenów: desmogleiny 1 (DSG1) i desmogleiny 3 (DSG3) w pęcherzycy, białka BP180 i BP230 w BP, transglutaminazy naskórkowej (eTG), transglutaminazy tkankowej (tTG) i nonapeptydów gliadyny (npG) w DH. W związku z powyższym podjęto badania, których celem była:

- ocena czynności neutrofilów w skórze pęcherzowo zmienionej poprzez barwienie immunohistochemiczne NE w DH, BP, PV i PF;
- ocena zależności pomiędzy poziomem autoprzeciwciał (anty-eTG, anty-tTG i anty-npG IgA w DH; anty-BP180 i anty-BP230 IgG w BP; anty-DSG1 i anty-DSG3 IgG w PV/PF) a nasileniem skórnych złogów NE;
- ocena przydatności testów immunoenzymatycznych ELISA wykrywających autoprzeciwciała anty-eTG, anty-tTG i anty-npG IgA do diagnostyki różnicowej chorych z DH;
- ocena czy u chorych na DH autoprzeciwciała anty-eTG IgAsą związane z uczynnieniem eozynofiliów badanym stężeniem EDN/RNazy 2;
- ocena zależności między nasileniem ekspresji eTG w skórze w sąsiedztwie DEJ a poziomem autoprzeciwciał anty-eTG IgAu chorych na DH;
- ocena czynności eozynofiliów w skórze pęcherzowo zmienionej poprzez barwienie immunohistochemiczne MBP w BP;
- ocena poziomu autoprzeciwciał anty-BP180 i anty-BP230 IgG w surowicy i płynie pęcherzowym u chorych z BP;
- analiza występowania pęcherzycowych złogów włosowych i autoprzeciwciał anty-DSG1 i anty-DSG3 IgG u pierwszorzędowych bezobjawowych krewnych osób z pęcherzycą.

Badaniami objęto łącznie 56 chorych z DH, 28 chorych z BP, 28 chorych z pęcherzycą, 30 bezobjawowych krewnych pierwszego stopnia chorych z pęcherzycą, 25 pacjentów z IgA/neutrofilowo-mediowanymi dermatozami niebędącymi DH i 24 osoby zdrowe. Materiał do badań stanowiły surowice, płyn pęcherzowy, parafinowe skrawki skóry oraz mrożone skrawki skóry/błony śluzowej oraz włosów. Zastosowano następujące metody diagnostyczne i badawcze:

- Badanie histologiczne skrawków parafinowych H+E,
- Badanie złogów IgA, IgM, IgG, IgG1, IgG4 i C3 techniką DIF w skórze/błonie śluzowej na skrawkach mrożonych,
- Badanie krążących przeciwciał IgG, IgG1, IgG4 techniką IIF na substracie przełyku mały,
- Badanie krążących przeciwciał IgG przeciwko DSG1 i DSG3 metodą immunoenzymatyczną ELISA w pęcherzycy,
- Badanie krążących przeciwciał IgG przeciwko BP180 i BP230 metodą immunoenzymatyczną ELISA w BP,
- Badanie krążących przeciwciał IgA przeciwko eTG, tTG i npG metodą immunoenzymatyczną ELISA w DH,
- Badanie NE w skórze wykwitowej pacjentów z DH, BP i pęcherzycą metodą immunohistochemiczną streptawidyna/peroksydaza na skrawkach parafinowych,
- Badanie głównego białka zasadowego eozynofików (MBP) w skórze wykwitowej pacjentów z BP metodą immunohistochemiczną streptawidyna/peroksydaza na skrawkach parafinowych,
- Analiza numeryczna nasilenia skórnych złogów NE i MBP przy użyciu programu komputerowego „Analizator 4D”,
- Badanie złogów IgG, IgG1, IgG4 i C3 metodą DIF we włosach na skrawkach mrożonych.

Analiza statystyczna wykazała, że średni poziom intensywności ekspresji NE, wyrażony w procencie reakcji, jest statystycznie istotnie wyższy u chorych z DH niż u chorych z BP czy pęcherzycą. Nie wykazano natomiast różnicy pomiędzy procentem reakcji NE u pacjentów z pęcherzycą i pacjentów z BP. Ponadto nie uzyskano korelacji pomiędzy intensywnością ekspresji NE a poziomem IgA/npG, IgA/tTG, IgA/npG w DH, poziomem IgG/BP230 i IgG/BP180 w BP oraz IgG/DSG1 i IgG/DSG3 w pęcherzycy. W grupie chorych z DH udowodniono istotne statystycznie korelacje pomiędzy poziomem

surowicznych IgA anty-eTG vs. IgA anty-tTG, IgA anty-eTG vs. IgA anty-npG, IgA anty-tTG vs. IgA anty-npG. Nie wykazano znamiennych korelacji pomiędzy poziomem krążących anty-BP180 a anty BP230 IgG w BP oraz pomiędzy anty-DSG1 i anty-DSG3 IgG w pęcherzycy. Ujawniono, że w BP intensywność ekspresji NE jest znamienne wyższa niż intensywność ekspresji MBP, przy czym udowodniono znamienne dodatnią korelację pomiędzy ekspresją MBP i NE w BP. Analiza surowicy i płynu pęcherzowego u chorych z BP ujawniła, że średni poziom IgG/BP230 i IgG/BP180 w surowicy i płynie pęcherzowym w BP nie różni się znamienne. Ponadto uzyskano istotne statystycznie korelacje pomiędzy poziomem autoprzeciwciał IgG wobec BP180 i BP230 w surowicy a poziomem tych autoprzeciwciał w płynie pęcherzowym. U krewnych chorych z pęcherzycą nie stwierdzono się jednoznacznych pęcherzycowych złogów włosowych IgG, IgG1, IgG4 i C3 oraz nie wykryto wartości przeciwciał krążących IgG wobec DSG1 i DSG3 równego bądź większego od punktu odcięcia testu wyznaczonego dla danego laboratorium. Udowodniono także, że w ludzkim DH poziom przeciwciał IgA wobec eTG nie jest związany ani z surowicznym stężeniem EDN/RNAzy 2 ani ze skórą ekspresją eTG. Stosując analizę krzywych ROC wyznaczono punkty odcięcia dla testów ELISA wykrywających anty-tTG i anty-npG IgA. Wykazano, że testy ELISA wykrywające anty-eTG/tTG/npG IgA stanowią przydatne rozszerzenie procesu diagnostycznego DH w celu uzupełnienia całości wiedzy o chorym.

Na podstawie uzyskanych wyników wysunięto następujące wnioski:

- Wydaje się, że proces zapalny DH jest odmienny od tego charakteryzującego pęcherzycę i BP - istotnie większeuczynnienie neutrofilów, mierzoneintensywnością ekspresji NE jako biomarkera, jest obserwowane w DH.
- Wydaje się, że autoprzeciwciała anty-eTG, anty-tTG, anty-npG IgA w DH, anty-BP180 i anty-BP230 IgG w BP oraz anty-DSG1 i anty-DSG3 IgG w pęcherzycy nie mają bezpośredniego wpływu na pobudzenie neutrofilów do uwalniania NE.
- DIF pozostaje testem definiującym w diagnostyce DH, jednak testy immunoenzymatyczne wykrywające anty-eTG, anty-tTG i anty-npG IgA można zastosować w celu poszerzenia wiedzy o chorym, kluczowej przy podejmowaniu decyzji odnośnie terapeutycznego prowadzenia chorego, przy czym anty-tTG ELISA wydaje się optymalną techniką serologiczną do badań przesiewowych w kierunku DH.

-
- Wydaje się, że u chorych z DH autoprzeciwciała anty-eTG IgA nie mają bezpośredniego wpływu na uczynnienie eozynofilów mierzone uwalnianiem EDN.
 - Wydaje się, że u chorych z DH poziom autoprzeciwciał IgA wobec eTG nie jest związany z ekspresją eTG w skórze w sąsiedztwie DEJ.
 - Wydaje się, że u chorych z BP czynność neutrofilów, badana intensywnością ekspresji NE jako biomarkera, jest wzajemnie skoordynowana z czynnością eozynofilów, badaną intensywnością ekspresji MBP jako biomarkera.
 - Autoimmunizacja wobec BP180 i BP230 w BP nie różni się na poziomie krwi obwodowej i skóry, w związku z czym można stosować płyn pęcherzowy jako nieważny materiał diagnostyczny alternatywny dla surowicy.
 - U bezobjawowych krewnych chorych z pęcherzycą wykrywa się autoprzeciwciała anty-DSG1 i anty-DSG3 IgG w niskim/miernym mianie przy braku jednoznacznych pęcherzycowych złogów immunoreaktantów w mieszkcu włosowym, co może świadczyć o istotności patofizjologii mieszkowej w rozwoju pęcherzycy (DIFh poszerzona o oznaczanie złogów IgG4 jest bardziej miarodajna od metod biochemicznych służących do oceny autoprzeciwciał).

W niniejszej rozprawie uwzględniono, możliwie jak najwszechstronniej, piśmiennictwo rodzime dotyczące omawianych w niej zagadnień.

8. ABSTRACT

Expression of neutrophil elastase in relation to the autoimmunity to epidermal transglutaminase, BP180, BP230, desmoglein 1 and 3 in autoimmune blistering dermatoses

Precise molecular mechanisms leading to the replacement of physiological autoimmunity by pathological autoimmunity and triggering blister formation in pemphigus vulgaris (PV), pemphigus foliaceus (PF), bullous pemphigoid (BP) and dermatitis herpetiformis (DH) still remain unexplored. Activated inflammatory cells, especially neutrophils, may play a significant role by secreting a range of proteases, e.g. neutrophil elastase (NE). NE seems to be the key enzyme responsible for degradation of many DEJ components and finally for blister development. However, the role of NE in the light of autoimmunity against specific autoantigens (anti-DSG1/DSG3 IgG in pemphigus, anti-BP180/BP230 in BP, anti-eTG/tTG/npG in DH) has not been clearly explained. Thus, this study aimed at:

- Evaluation of neutrophils activity in lesional skin using immunohistochemical staining of NE in DH, BP and pemphigus.
- Evaluation of association between levels of autoantibodies (anti-eTG/tTG/npG IgA in DH, anti-BP180/BP230 IgG in BP, anti-DSG1/DSG3 IgG in PV/PF) and the intensity of cutaneous NE deposition.
- Evaluation of the applicability and accuracy of ELISA tests evaluating serum IgA autoantibodies against eTG, tTG and npG in the differential diagnosis of DH.
- Evaluation whether in DH patients autoantibodies against eTG are associated with activation of eosinophils, judged by the concentration of EDN/RNase 2 in serum.
- Evaluation of the association between the intensity of eTG expression in the skin adjacent to the DEJ and the level of IgA autoantibodies against eTG in DH patients.
- Evaluation of eosinophils activity in lesional skin using immunohistochemical staining of MBP in BP.
- Evaluation of the level of IgG autoantibodies against BP180 and BP230 in the serum and blister fluid in BP patients.
- Analysis of the occurrence of pemphigus deposits in outer root sheath in DIF of plucked scalp hair and analysis of IgG against DSG1 and DSG3 autoantibodies level in healthy relatives of pemphigus patients.

Altogether, 56 DH patients, 28 BP patients, 28 patients with pemphigus, 30 asymptomatic relatives of pemphigus patients, 25 patients with IgA/neutrophil-mediated non-DH dermatoses, and 24 healthy individuals were investigated. Material for examination involved sera, blister fluids, paraffin-embedded sections of lesional skin, and frozen sections of perilesional skin/mucosa and scalp hair. In this study following diagnostic and research methods were used:

- Histologic hematoxylin and eosin staining (H+E) on paraffin-embedded sections,
- DIF to detect IgA, IgM, IgG, IgG1, IgG4 deposits in perilesional skin/mucosa on frozen sections,
- IIF to detect IgG antibodies with the use of monkey esophagus as a substrate,
- ELISA test to detect circulating IgG antibodies against DSG1 and DSG3 in pemphigus,
- ELISA test to detect circulating IgG antibodies against BP180 and BP230 in BP,
- ELISA test to detect circulating IgA antibodies against eTG, tTG and npG in DH,
- Immunohistochemical staining using streptavidin peroxidase method on paraffin-embedded sections to detect NE deposits in lesional skin of pemphigus, BP and DH patients,
- Immunohistochemical staining using streptavidin peroxidase method on paraffin-embedded sections to detect MBP deposits in lesional skin of BP patients,
- Computational analysis of the NE and MBP cutaneous deposits intensity with the use of “Analyzer4D” software,
- DIF of plucked scalp hair on frozen sections to detect IgG, IgG1, IgG4 and C3 deposits.

Statistical analysis showed that the mean intensity of NE expression in pemphigus and BP patients was statistically significantly lower than in DH patients, but it was not significantly different in pemphigus and BP. The analysis of correlation showed insignificant correlation between the intensity of NE expression and the level of IgA against eTG/tTG/npG in DH, IgG against BP180/BP230 in BP, IgG against DSG1/DSG3 in pemphigus. There were statistically significant correlations between the levels of eTG, tTG, npG IgA autoantibodies in DH patients. There were no significant correlations between levels of IgG to DSG1 and IgG to DSG3 in pemphigus, and IgG to BP180 and IgG to BP230 in BP. It was revealed that in BP the mean intensity of NE expression was statistically significantly higher than the intensity of MBP expression. There was a

significant correlation between the intensity of NE and MBP expressions. In BP patients levels of IgG to BP180 and IgG to BP230 in sera were not significantly different from those in blister fluids. In BP levels of IgG/BP180 and IgG/BP230 in sera correlated with those in blister fluids. Examined relatives of pemphigus patients did not demonstrate univocal IgG, IgG1, IgG4, C3 pemphigus deposits in outer root sheath. In human DH the level of IgA to eTG is unrelated with either serum concentration of EDN/RNase 2 or the cutaneous eTG expression. Obtained results allow to draw following conclusions:

- It seems that inflammatory process in pemphigus and BP is different from the one characterized in DH – significantly higher activity of neutrophil, judged by NE releasing, is observed in DH.
- It seems that autoantibodies anti-eTG/tTG/npG IgA in DH, anti-BP180/BP230 IgG in BP, anti-DSG1/DSG3 IgG in pemphigus do not have a direct impact on the activation of neutrophils to NE release.
- DIF remains the definitive laboratory test for DH diagnosing, however immunoenzymatic tests to detect anti-eTG, anti-tTG, anti-npG IgA may be used to broaden knowledge about DH patients, essential for deciding on therapeutic strategy. Anti-tTG ELISA seems to be the optimal serological technique for DH screening.
- It seems that in DH patients anti-eTG IgA autoantibodies do not have a direct impact on eosinophils activation, judged by EDN/RNase 2 release.
- It seems, that in DH patients the level of IgA autoantibodies to eTG is unrelated with the eTG expression in the skin adjacent to the DEJ.
- It seems that in BP patients, the activity of neutrophils, judged by NE release, is coordinated with the activity of eosinophils, judged by MBP release.
- Autoimmunity to BP180 and BP230 is not different at the level of peripheral blood and skin, therefore, blister fluid can replace serum as a non-invasive diagnostic material in ELISA.
- Asymptomatic relatives of pemphigus patients have rather IgG autoantibodies to DSG1 and DSG3 than unequivocal pemphigus deposits in the hair follicle, what may suggest that follicular pathophysiology is important in pemphigus development

(DIFh is, including IgG4 deposits evaluation, more reliable than biochemical methods detecting circulating autoantibodies).

In this PhD thesis, possible most comprehensive native literature regarding issues discussed in this study, was included.

9. PIŚMIENNICTWO

- Abenavoli L., Proietti I., Ferrulli A., Vonghia L., Capizzi R., Rotoli M., Amerio P.L., Gasbarrini G., Addolorato G.: Cutaneous manifestations in celiac disease. *World J Gastroenterol* 2006;12:843-852.
- Aeschliman D., Kaupp O., Paulsson M.: Osteonectin is a major glutaminyl substrate for transglutaminase-catalyzed cross-linking in cartilage matrix. *J. Cell. Biol.*, 1995, 129, 881-892.
- Ahmed A.R., Mohimen A., Yunis E.J., Mirza N.M., Kumar V., Beutner E.H., Alper C.A.: Linkage of pemphigus vulgaris antibody to the major histocompatibility complex in healthy relatives of patients. *J Exp Med* 1993;177:419-24.
- Ahmed A.R., Tunis E.J., Khatri K.: Major histocompatibility complex haplotype studies in Ashkenazi Jewish patients with pemphigus vulgaris. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:7658-62.
- Allen J., Shears E., Powell J., Wojnarowska F.: Assessment of skin basement membrane zone antibodies in the urine of patients with acquired subepidermal immunobullous diseases. *Br J Dermatol* 2001;144:540-5.
- Alonso-Llamazares J., Gibson L.E., Rogers R.S.: Clinical, pathologic, and immunopathologic features of dermatitis herpetiformis: review of the Mayo Clinic experience. *Int J Dermatol.* 2007;46:910-919.
- Amagai M., Klaus-Kovtun V., Stanley J.R.: Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell* 1991;67:869-877.
- Amagai M., Matsuyoshi N., Wang Z.H., Andl C., Stanley J.R.: Toxin in bullous impetigo and staphylococcal scalded-skin syndrome targets desmoglein 1. *Nat Med* 2000;6:1275-7.
- Amagai M., Yamaguchi T., Hanakawa Y., Nishifuji K., Sugai M., Stanley J.R.: Staphylococcal exfoliative toxin B specifically cleaves desmoglein 1. *J Invest Dermatol* 2002;118:845-50.
- Ameen M., Bhogal B.S., Black M.M.: Dermatitis herpetiformis evolving into bullous pemphigoid: a probable example of epitope spreading. *Clin Exp Dermatol* 2000;25:398-400.
- Anhalt G.J., Till G.O., Diaz L.A., Labib R.S., Patel H.P., Eaglstein N.F.: Defining the role of complement in experimental pemphigus vulgaris in mice. *J Immunol* 1986;137:2835-40.
- Balas A., Vicario J.L., Zambrano A., Acuña D., Garca-Novo D.: Absolute linkage of celiac disease and dermatitis herpetiformis to HLA-DQ. *Tissue Antigens* 1997;50:52-56.
- Barnadas M.A., Rubiales M.V., González M.J., Puig L., García P., Baselga E., Pujol R., Alomar A., Gelpí C.: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and indirect immunofluorescence testing in a bullous pemphigoid and pemphigoid gestationis. *Int J Dermatol* 2008;47:1245-9.
- Bastuji-Garin S., Souissi R., Blum L., Turki H., Nouria R., Jomaa B., Zahaf A., Osman A.B., Mokhtar I., Faza'a B., Revus J., Roujeau J.C., Kamoun M.R.: Comparative epidemiology of pemphigus in Tunisia and France: unusual incidence of pemphigus foliaceus in young Tunisian women. *J Invest Dermatol* 1995;104:302-305.
- Bean S.F.: Blister fluid in bullous pemphigoid. *Acta Derm Venereol.* 1970;50:95-6.
- Berkowitz P., Chua M., Liu Z., Diaz L.A., Rubenstein D.S.: Autoantibodies in the autoimmune disease pemphigus foliaceus induce blistering via p38 mitogen-activated protein kinase-dependent signaling in the skin. *Am J Pathol* 2008;173:1628-36.
- Beutner E.H., Chorzelski T.P.: Studies on etiologic factors in pemphigus. *J Cutan Pathol* 1976;3:67-74.
- Bickle K.M., Roark T.R., Hsu S.: Autoimmune bullous dermatoses: A review. *Am Fam Physician* 2002;65:1861-1871.
- Bolotin D., Petronic-Rosic V.: Dermatitis herpetiformis. Part I. Epidemiology, pathogenesis, and clinical presentation. *J Am Acad Dermatol* 2011;64:1017-1024.
- Borradori L., Sonnenberg A.: Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes. *J Invest Dermatol* 1999;112:411-418.
- Bowszyc-Dmochowska M.: Badania nad patogenezą pemfigoidu pęcherzowego. *Rozprawa habilitacyjna.* Poznań 2002
- Bowszyc-Dmochowska M., Dmochowski M.: Immediate hypersensitivity phenomena in bullous pemphigoid: critical concepts. *J Med* 2002;33:189-98.
- Bowszyc-Dmochowska M., Dmochowski M.: Poziomy przeciwciał IgG przeciwko BP180 w płynach pęcherzowych i surowicach nie różnią się znacząco u chorych na pemfigoid pęcherzowy – badanie wstępne. *Dermatol Klin* 2008;10:7-8.
- Bowszyc-Dmochowska M., Seraszek A., Kaczmarek E., Gornowicz J., Dmochowski M.: Low strength of correlation between the intensity of neutrophil elastase expression in lesional skin and the level of serum IgA antibodies to epidermal transglutaminase in dermatitis herpetiformis. *The Open Autoimmunity Journal*, 2009;1: 1-4.
- Brandão M.L., Fernandes N.C., Batista D.P., Santos N.: Refractory pemphigus vulgaris associated with herpes infection: case report and review. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2011;53:113-117.

- Brandesen R., Frusic-Zlotkin M., Lyubimov H., Yunes F., Michael B., Tamir A., Milner Y., Brenner S.: Circulating pemphigus IgG in families of patients with pemphigus: comparison of indirect immunofluorescence, direct immunofluorescence, and immunoblotting. *J Am Acad Dermatol* 1997;36:44-52.
- Brenner S., Dorfman B., Himelfarb M.: Familial pemphigus vulgaris. *Dermatologica* 1985;171:38-40.
- Brenner S., Wolf R., Ruocco V.: Contact pemphigus: a subgroup of induced pemphigus. *Int J Dermatol* 1994a;33:843-845.
- Brenner S., Wolf R.: Possible nutritional factors in induced pemphigus. *Dermatology* 1994b;189:337-339.
- Brenner S., Ruocco V., Wolf R., de Angelis E., Lombardi M.L.: Pemphigus and dietary factors. In vitro acantholysis by allyl compounds of the genus *Allium*. *Dermatology* 1995;190:197-202.
- Briggaman R.A., Wheeler C.: The epidermal-dermal junction. *J Invest Dermatol* 1975;65:71-84.
- Briggaman R.A., Schechter N.M., Fraki J., Lazarus G.S. Degradation of the epidermal-dermal junction by proteolytic enzymes from human skin and human poly morphonuclear leukocytes. *J Exp Med* 1984;160:1027-42..
- Brow J.R., Parker F., Weinstein W.M., Rubin C.E.: The small intestinal mucosa in dermatitis herpetiformis I: severity and distribution of the small intestinal lesion and associated malabsorption. *Gastroenterology* 1971;66: 355-61.
- Bruce S.E., Bjarnason I., Peters T.J.: Human jejunal transglutaminase: demonstration of activity, enzyme kinetics and substrate specificity with special relation to gliadin and coeliac disease. *Clin Sci* 1985; 68:573-9.
- Bruns G.R., Ablin R.J, Guinan P.D.: Serum immunoglobulin E in pemphigus. *J Invest Dermatol* 1978;71:217-8.
- Burgeson R.E., Christiano A.M.: The dermal-epidermal junction. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:651-658.
- Byrne G., Ryan F., Jackson J., Feighery C., Kelly J.: Mutagenesis of the catalytic triad of tissue transglutaminase abrogates coeliac disease serum IgA autoantibody binding. *Gut* 2007;56:336-41.
- Cannistraci C., Lesnoli La Parola I., Cardinali G., Bolasco G., Aspate N., Stigliano V., Picardo M.: Co-localization of IgA and TG3 on healthy skin of celiac patients. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2007;21:509-14.
- Caproni M., Feliciani C., Fuligni A., Salvatore E., Atani L., Bianchi B., Pour S.M., Proietto G., Toto P., Coscione G., Amerio P., Fabbri P.: Th2-like cytokine activity in dermatitis herpetiformis. *Br J Dermatol* 1998;138:242-247.
- Caproni M., Cardinali C., D'Agata A., Selvaggi W., Fabbri P.: Serum eosinophil cationic protein, myeloperoxidase, tryptase, eotaxin and Th2-L-like cytokines in dermatitis herpetiformis. *Int Arch Allergy Immunol.* 2002;128:67-72.
- Caproni M., Torchia D., Antiga E., Deg'Innocenti D., Barletta E., Baroni G., Santucci M., Fabbri P.: The role of apoptosis in the pathogenesis of dermatitis herpetiformis. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2005, 18, 691-699.
- Caproni M., Antiga E., Melani L., Fabbri P.: Guidelines for the diagnosis and treatment of dermatitis herpetiformis. *JEADV* 2009;23:633-638.
- Chamson A., Germain N., Claudy A., Perier C., Frey J.: Study of basement membrane formation in dermal-epidermal recombinants in vitro. *Arch Dermatol Res* 1989;281:267-272.
- Chen R., Ning G., Zhao M.L., Fleming M.G., Diaz L.A., Werb Z., Liu Z.: Mast cells play a key role in neutrophil recruitment in experimental bullous pemphigoid. *J Clin Invest* 2001;108:1151-8.
- Chernyavsky A.I., Arredondo J., Kitajima Y., Sato-Nagai M., Grando S.A.: Desmoglein versus non-desmoglein signaling in pemphigus acantholysis (characterization of novel signaling pathways downstream of pemphigus vulgaris antigens). *J Biol Chem* 2006;282:13804-12.
- Christy A.L., Brown M.A.: The multitasking mast cell: positive and negative roles in the progression of autoimmunity. *J Immunol* 2007;179:2673-9.
- Chruśliński A., Niškiewicz I., Puchała A., Bowszyc-Dmochowska M., Dmochowski M.: Rozbieżność wyników oceny transglutaminazy naskórkowej w okolicy połączenia skórno-naskórkowego w skórze bezwykwitowej i surowicznych przeciwciał IgA przeciwko transglutaminazie naskórkowej w opryszczkowatym zapaleniu skóry. *Dermatol Klin* 2008;10:142-44.
- Chua F., Laurent G.J.: Neutrophil elastase: mediator of extracellular matrixdestruction and accumulation. *Proc Am Thorac Soc* 2006;3:424-7.
- Collin P., Pukkala E., Reunala T.: Malignacy and survival in dermatitis herpetiformis: a comparison with celiac disease. *Gut* 1996;38:528-530.
- Collin P., Reunala T.: Recognition and management of the cutaneous manifestations of celiac disease: a guide for dermatologists. *Am J Clin Dermatol* 2003;4:13-20.
- Corazza G.R., Gasbarrini G.: Coeliac disease in adults. *Baillières Clin Gastroenterol* 1995; 9:329-50.

-
- Cornell H., Wieser H., Belitz H.D.: Characterization of the gliadin-derived peptides which are biologically active in coeliac disease. *Chin Chim Acta* 1992;213:37-50.
- Cruz P.D.Jr., Coldiron B.M., Sontheimer R.D.: Concurrent features of cutaneous lupus erythematosus and pemphigus erythematosus following myasthenia gravis and thymoma. *J Am Acad Dermatol* 1987;16:472-480.
- Cuartero B.G., Santamaría M.J., Acuña Quirós M.D., Martínez Gómez J., Romero Portilla M., Pedrón Giner C., Pérez B., Vicario J.L., García Novo M.D. Dermatitis herpetiformis vs. celiac disease. *An Esp Pediatr* 1992;37:307-310.
- Daneshpazhooh M., Shahdi M., Aghaeepoor M., Hasiri G., Chams C.: A comparative study of antibody titers of blister fluid and serum in patients with subepidermal immunobullous diseases. *Int J Dermatol* 2004;43:348-51.
- Dańczak-Pazdrowska A.: Przeciwciała IgG, IgG1 i IgG4 przeciwko desmogleinie 1 w chorobach kręgu pęcherzycy. Rozprawa doktorska, UM im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań 2005.
- Delva E., Jennings J.M., Calkins C.C., Kottke M.D., Faundez V., Kowalczyk A.P.: Pemphigus vulgaris IgG-induced desmoglein-3 endocytosis and desmosomal disassembly are mediated by a clathrin- and dynamin-independent mechanism. *J Biol Chem* 2008 27;28:18303-13.
- Démoulin-Giacco N., Gagey V., Teillac-Hamel D., Fraïtag S., Caillat-Zucman S., Schmitz J., de Prost Y.: Dermatitis herpetiformis occurring in patients with celiac disease in childhood. *Arch Pediatr* 1996;3:541-548.
- Derbinski J., Schulte A., Kyewski B., Klein L.: Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat Immunol* 2001;2:1032-1039.
- Di Zeno G., Marazza G., Borradori L.: Bullous pemphigoid: physiopathology, clinical features and management. *Adv Dermatol* 2007;23:257-288.
- Di Zeno G., Thoma-Uszynski S., Fontao L., Calabresi V., Hofmann S.C., Hellmark T., Sebbag N., Pedicelli C., Sera F., Lacour J.P., Wieslander J., Bruckner-Tuderman L., Borradori L., Zambruno G., Hertl M.: Multicenter prospective study of the humoral autoimmune response in bullous pemphigoid. *Clin Immunol* 2008;128:415-26.
- Di Zeno G., Thoma-Uszynski S., Calabresi V., Fontao L., Hofmann S.C., Lacour J.P., Sera F., Bruckner-Tuderman L., Zambruno G., Borradori L., Hertl M.: Demonstration of epitope-spreading phenomena in bullous pemphigoid: results of a prospective multicenter study. *J Invest Dermatol* 2011;131:2271-80.
- Diaz L.A., Sampaio S.A., Rivitti E.A., Martins C.R., Cunha P.R., Lombardi C., Almeida F.A., Castro R.M., Macca M.L., Levarado C., Filho G., Borges P., Chaul A., Minelli L., Empinotti J.C., Friedman H., Campbell I., Labib R.S., Anhalt G.J.: Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem): II. Current and historic epidemiologic studies. *J Invest Dermatol* 1989;92:4-12.
- Diaz L.A., Rattie H., Saunders W.S., Futamura S., Squiquera H.L., Anhalt G.J., Giudice G.J.: Isolation of a human epidermal cDNA corresponding to the 18-kD autoantigen recognized by bullous pemphigoid and herpes gestationis sera. Immunolocalization of this protein to the hemidesmosome. *J Clin Invest* 1990;86:1088-1094.
- Dieterich W., Ehnis T., Bauer M., Donner P., Volta U., Riecken E.O., Schuppan D.: Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med* 1997; 3:797-801.
- Dieterich W., Laag E., Bruckner-Tuderman L., Reunala T., Kárpáti S., Zágoni T., Riecken E.O., Schuppan D.: Antibodies to tissue transglutaminase as serologic markers in patients with dermatitis herpetiformis. *J Invest Dermatol* 1999;113:133-136.
- Dmochowski M.: Autorska klasyfikacja autoimmunizacyjnych dermatoz pęcherzowych. [w:] Autoimmunizacyjne dermatozy pęcherzowe. Wydawnictwo Naukowe UM im. K. Marcinkowskiego; Poznań 2006a:9-12.
- Dmochowski M. : Opryszczkowate zapalenie skóry. [w:] Autoimmunizacyjne dermatozy pęcherzowe. Wydawnictwo Naukowe UM im. K. Marcinkowskiego; Poznań 2006b:281-311.
- Dmochowski M.: Budowa głównych autoantygenów strukturalnych w autoimmunizacyjnych dermatozach pęcherzowych. [w:] Autoimmunizacyjne dermatozy pęcherzowe. Wydawnictwo Naukowe UM im. K. Marcinkowskiego; Poznań 2006c:13-27.
- Dmochowski M.: Pęcherzyca zwykła i pęcherzyca paraneoplastyczna. [w:] Autoimmunizacyjne dermatozy pęcherzowe. Wydawnictwo Naukowe UM im. K. Marcinkowskiego; Poznań 2006d:54-115.
- Dmochowski M., Bowszyc-Dmochowska M., Kaczmarek E.: The expression of neutrophil elastase, but not the expression of eosinophil major basic protein, in blister-containing skin is related to the level of blister fluid IgG antibodies to the NC16a domain of BP180 in human bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol* 2007a;127:S6.

- Dmochowski M., Bowszyc-Dmochowska M.: Brak pęcherzycowych mieszkowych złogów immunoreaktantów u biologicznych krewnych bez pęcherzy chorych na pęcherzycę nieendemiczną. *Doniesienie wstępne. Dermatol Klin* 2007b;9:211-2.
- Dmochowski M., Gornowicz J., Bowszyc-Dmochowska M., Seraszek A., Kaczmarek E.: Low strength of correlation between the intensity of neutrophil elastase expression in lesional skin and the level of serum IgA antibodies to epidermal transglutaminase in dermatitis herpetiformis. *J Invest Dermatol* 2009;129 (suppl. 1):S9.
- Dmochowski M., Gornowicz J., Seraszek A., Kaczmarek E., Bowszyc-Dmochowska M.: Neutrophil elastase, eosinophil major basic protein and autoantibodies to BP230 in human bullous pemphigoid lesions. *JC Bystryn Pemphigus & Pemphigoid Meeting: from the bench to the bedside*. 5-6 listopada, 2010, Bethesda, Maryland, USA.
- Dmochowski M., Gornowicz J., Seraszek A., Kaczmarek E., Bowszyc-Dmochowska M.: Cutaneous expression of neutrophil elastase in relation to IgA autoantibodies to nonapeptides of gliadin and tissue transglutaminase in dermatitis herpetiformis. *J Invest Dermatol* 2011;131 (1 Suppl):S2.
- Dmochowski M., Gornowicz-Porowska J., Seraszek-Jaros A., Kaczmarek E., Pietkiewicz P., Bowszyc-Dmochowska M.: Cutaneous expression of neutrophil elastase in relation to IgG autoantibodies to desmoglein 1 and 3 in pemphigus foliaceus and pemphigus vulgaris. *Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology*, Raleigh, USA, 9-12 maja 2012.
- Donaldson M.R., Zone J.J., Schmidt L.A., Taylor T.B., Neuhausen S.L., Hull C.M., Meyer L.J.: Epidermal transglutaminase deposits in perilesional and uninvolved skin in patients with dermatitis herpetiformis. *J Invest Dermatol* 2007;127:1268-1271.
- Dresow S.K., Sitaru C., Recke A., Oostingh G.J., Zillikens D., Gibbs B.F.: IgE autoantibodies against the intracellular domain of BP180. *Br J Dermatol* 2009;160:429-32.
- Duhring L.: Dermatitis herpetiformis. *J Am Med Assoc* 1884;III(9):225-229.
- Duś M., Dańczak-Pazdrowska A., Gornowicz J., Bowszyc-Dmochowska M., Dmochowski M.: Przejściowe ujawnienie się opryszczkowego zapalenia skóry u kobiety z predyspozycją rodzinną wywołane przyjmowaniem propafenonu. *Post Dermatol Alergol* 2009;XXVI:239-242.
- Fairley J.A., Burnett C.T., Fu C.L., Larson D.L., Fleming M.G., Giudice G.J.: A pathogenic role for IgE in autoimmunity: bullous pemphigoid IgE reproduces the early phase of lesion development in human skin grafted to nu/nu mice. *J Invest Dermatol* 2007;127:2605-11.
- Farb R.M., Dykes R., Lazarus G.S.: Anti-epidermal-cell-surface pemphigus antibody detaches viable epidermal cells from culture plates by activation of proteinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978;75:459-63.
- Favre B., Fontao L., Koster J., Shafaatian R., Jaunin F., Saurat J.H., Sonnenberg A., Borradori L.: The hemidesmosomal protein bullous pemphigoid antigen 1 and the integrin beta 4 subunit bind to ERBIN. Molecular cloning of multiple alternative splice variants of ERBIN and analysis of their tissue expression. *J Biol Chem* 2001;276:32427-32436.
- Feinstein A., Yorav S., Movshovitz M., Schewach-Millet M.: Pemphigus in families. *Int J Dermatol* 1991;30:347-51.
- Fernández E., Riestra S., Rodrigo L., Blanco C., López-Vázquez A., Fuentes D., Moreno M., López-Larrea C.: Comparison of six human anti-transglutaminase ELISA-tests in the diagnosis of celiac disease in the Saharawi population. *World J. Gastroenterol.* 2005;11:3762-6.
- Field J.M., Shewry P.R., Mifflin B.J.: The purification and characterization of homologous high molecular weight storage proteins from grains of wheat, rye and barley. *Theor Appl Genet* 1982;62:329-36.
- Firooz A., Mazhar A., Ahmed A.R.: Prevalence of autoimmune diseases in family members of patients with pemphigus vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 1994;33:319-320.
- Fisher K.R., Higginbotham R., Frey J., Granese J., Pillow J., Skinner R.B.: Pesticide-associated pemphigus vulgaris. *Cutis* 2008;82:51-54.
- Frezzolini A., Teofoli P., Cianchini G., Barduagni S., Ruffelli M., Ferranti G., Puddu P., De Pita O.: Increased expression of eotaxin and its specific receptor CCR3 in bullous pemphigoid. *Eur J Dermatol* 2002;12:27-31.
- Fry L., Seah P.P., Harper P.G., Hoffbrand A.V., McMinn R.M.H.: The small intestine in dermatitis herpetiformis. *J Clin Path* 1974;27:817-824.
- Fry L.: Dermatitis herpetiformis. *Baillières Clin Gastroenterol* 1995;9:371-93.
- Fryer E.J., Leibold M.: Pemphigus vulgaris after initiation of psoralen and UVA therapy for psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 1994;30:651-653.
- Gammon W.R., Iman III A.O., Wheeler Jr C.E.: Differences in complement-dependent chemotactic activity generated by bullous pemphigoid and epidermolysis bullosa acquisita immune complexes: demonstration by leukocytic attachment and organ culture methods. *J Invest Dermatol* 1984;83:57-61.

- Gavanescu I., Kessler B., Ploegh H., Benoist C., Mathis D.: Loss of Aire-dependent thymic expression of a peripheral tissue antigen renders it a target of autoimmunity. *PNAS* 2007;104:4583-4587.
- Gawkroder D.J., Blackwell J.N., Gilmour H.M., Rifkind E.A., Heading R.C., Barneston R.: Dermatitis herpetiformis: diagnosis, diet and demography. *Gut* 1984;25:151-157.
- Gawkroder D.J., Vestey J.P., O'Mahony S., Marks J.M.: Dermatitis herpetiformis and established celiac disease. *Br J Dermatol* 1993;129:694-695.
- Gebbers J.O.: The environment and autoimmunity--from external causes to inner conflicts. *Praxis (Bern 1994)* 2001;90:1913-22.
- Giudice G.J., Emery D.J., Diaz L.A.: Cloning and primary structural analysis of the bullous pemphigoid autoantigen, BP180. *J Invest Dermatol* 1992;99:243-250.
- Goon A.T.J., Tay Y.K., Tan S.H.: Pemphigus vulgaris following varicella infection. *Clin Exp Dermatol* 2001;26:661-663.
- Gornowicz J., Bowszyc-Dmochowska M., Dmochowski M.: Neurotoksyna eozynofilowa (eosinophil-derived neurotoxin, EDN) a autoprzeciwiała IgA wobec transglutaminazy naskórkowej w opryszczkowa tym zapaleniu skóry. *Dermatol Klin* 2009;11:13-5.
- Gornowicz J., Bowszyc-Dmochowska M., Dmochowski M.: Przewodzenie sygnałów w pęcherzycy zwykłej i liściastej. *Derm Klin* 2010b;12:117-23.
- Gornowicz J., Bowszyc-Dmochowska M., Seraszek A., Kaczmarek E., Dmochowski M.: Expressions of neutrophil elastase and eosinophil major basic protein, evaluated with quantitative digital morphometry, in relation to blister fluid and serum IgG antibodies to BP230 in human bullous pemphigoid.. 22nd World Congress of Dermatology, 24-29 maja, 2011, Seul, Korea Południowa.
- Gornowicz-Porowska J., Bowszyc-Dmochowska M., Seraszek-Jaros A., Kaczmarek E., Dmochowski M.: Human dermatitis herpetiformis: IgA autoantibodies to gliadin nonapeptides, tissue and epidermal transglutaminases are linked, but unrelated to cutaneous neutrophil elastase. 8th International Congress on Autoimmunity, 9-13 maja, 2012a, Granada, Hiszpania.
- Gornowicz-Porowska J., Bowszyc-Dmochowska M., Dmochowski M.: Autoimmunity-driven enzymatic remodeling of the dermal-epidermal junction in bullous pemphigoid and dermatitis herpetiformis. *Autoimmunity* 2012b;45:71-80. Epub 14 września 2011.
- Gornowicz-Porowska J., Seraszek-Jaros A., Kaczmarek E., Dmochowski M., Bowszyc-Dmochowska M.: IgA autoantibodies to gliadin nonapeptides, tissue transglutaminase and epidermal transglutaminase are associated, but unrelated to neutrophil elastase expression in lesional skin in human dermatitis herpetiformis. *Post Dermatol Alergol – manuskrypt w recenzji*, 2012c.
- Grando S.A., Dahl M.V.: Nicotine and pemphigus. *Arch Dermatol* 2000;136:1269.
- Grando S.A.: Pemphigus in the XXI century: new life to an old story. *Autoimmunity* 2006;39:521-30.
- Green.H.R., Jabri B.: Coeliac disease. *Lancet* 2003;363:383-391.
- Greenberg D.A., Hodge S.E., Rotter J.I.: Evidence for recessive and against dominant inheritance at the HLA-"linked" locus in coeliac disease. *Am J Hum Genet* 1982;34:263-77.
- Grenard P., Bates M.K., Aeschlimann D.: Evolution of transglutaminase genes: identification of a transglutaminase gene cluster on human chromosome 15q15. *J Biol Chem* 2001;276:33066-78.
- Guilabert A., Lozano F., Iranzo P., Julià M., Suárez-Casasús B., Moreno N., Herrero-Gonzalez J., Mascaró J.M. Jr.: The role of Fc gamma receptors polymorphisms in bullous pemphigoid. *J Am Acad Dermatol* 2010;63:161-3.
- Hadjivassiliou M., Aeschlimann P., Strigun A., Sanders D.S., Woodroffe N., Aeschlimann D.: Autoantibodies in gluten ataxia recognize a novel neuronal transglutaminase. *Ann Neurol* 2008;64:332-43.
- Hall R.P., Lawlez T.J.: Characterization of circulating and cutaneous IgA immune complexes in patients with dermatitis herpetiformis. *J Immunol* 1985;135:1760-5.
- Hall R.P., Takeuchi F., Benbenisty K.M., Streilein R.D.: Cutaneous endothelial cell activation in normal skin of patients with dermatitis herpetiformis associated with increased serum levels of IL-8, sE-selectin, and TNF- α . *J Invest Dermatol* 2006;126:1331-7.
- Hashimi S., Marinkovich M.P.: Molecular organization of the basement membrane zone. *Clin Dermatol* 2011;29:398-411.
- Hashimoto T., Tsuruta D., Dainichi T., Hamada T., Furumura M., Ishii N.: Demonstration of epitope spreading in bullous pemphigoid: results of a prospective multicenter study. *J Invest Dermatol* 2011;131:2175-7.
- Herrero-González J.E.: Clinical Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Dermatitis Herpetiformis. *Actas Dermosifiliogr.* 2010;101:820–826.

- Hertz K.C., Katz S.I., Aaronson C.: Juvenile dermatitis herpetiformis: an immunologically proven case. *Pediatrics* 1977;59:945-948.
- Hertl M., Karr R.W., Amagai M., Katz S.I.: Heterogeneous MHC II restriction pattern of autoreactive desmoglein 3 specific T cell responses in pemphigus vulgaris patients and normals. *J Invest Dermatol* 1998;110:388-392.
- Hertl M., Veldman C.: Pemphigus--paradigm of autoantibody-mediated autoimmunity. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2001;14:408-18.
- Hertl M., Veldman C.: T-cellular autoimmunity against desmogleins in pemphigus, an autoantibody-mediated bullous disorder of the skin. *Autoimm Rev* 2003;2:278-283.
- Hervonen K., Karell K., Holopainen P., Collin P., Partanen J., Reunala T.: Concordance of dermatitis herpetiformis and celiac disease in monozygous twins. *J Invest Dermatol* 2000;115:990-993.
- Hervonen K., Hakanen M., Kaukinen K., Collin P., Reunala T.: First-degree relatives are frequently affected in coeliac disease and dermatitis herpetiformis. *Scand J Gastroenterol* 2002;37:51-55.
- Heupel W.M., Engerer P., Schmidt E., Waschke J.: Pemphigus vulgaris IgG cause loss of desmoglein-mediated adhesion and keratinocyte dissociation independent of epidermal growth factor receptor. *Am J Pathol* 2009;174:475-85.
- Heyman M., Menard S.: Pathways of gliadin transport in celiac disease. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1165:274-78.
- Hieda Y., Nishizawa Y., Uematsu J., Owaribe K.: Identification of a new hemidesmosomal protein, HD1: a major, high molecular mass component of isolated hemidesmosomes. *J Cell Biol* 1992;116:1497-1506.
- Holopainen P., Mustalahti K., Uimari P., Collin P., Mäki M., Partanen J.: Candidate gene regions and genetic heterogeneity in gluten sensitivity. *Gut* 2001;48:696-701.
- Holubar K., Wolff K., Konrad K., Beutner E.H.: Ultrastructural localization of immunoglobulins in bullous pemphigoid skin. *J Invest Dermatol* 1975;64:220-227.
- Hull C.M., Liddle M., Hansen N., Meyer L.J., Schmidt L., Taylor T., Jaskowski T.D., Hill H.R., Zone J.J.: Elevation of IgA anti-epidermal transglutaminase antibodies in dermatitis herpetiformis. *Br. J. Dermatol.* 2008;159:120-4.
- Humbert P., Pelletier F., Dreno B., Puzenat E., Aubin F.: Gluten intolerance and skin diseases. *Eur J Dermatol* 2006;16:4-11.
- Igawa K., Matsunaga T., Nishioka K.: Involvement of UV-irradiation in pemphigus foliaceus. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2004;18:216-217.
- Ishii K., Amagai M., Hall R.P., Hashimoto T., Takayanagi A., Gamou S., Shimizu N., Nishikawa T.: Characterization of autoantibodies in pemphigus using antigen-specific enzyme-linked immunosorbent assays with baculovirus-expressed recombinant desmogleins. *J Immunol* 1997;159:2010-2017.
- Ishii N., Nakane H., Ishida-Yamamoto A.: Application and limitations of three-dimensional reconstruction of the epiderma-dermal junction using elektron microscopy. *J Dermatol Sci* 2003;32:231-235.
- Jang H.S., Oh C.K., Lim J.Y., Jun E.S., Kim Y.S., Kwon K.S.: Detection of human herpesvirus 8 DNA in pemphigus and chronic blistering skin diseases. *J Korean Med Sci* 2000;15:442-448.
- Jaskowski T.D., Donaldson M.R., Hull C.M., Wilson A.R., Hill H.R., Zone J.J., Book L.S. : Novel screening assay performance in pediatric celiac disease and adult dermatitis herpetiformis. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2010;51:19-23.
- Jordon R.E., Beutner E.H., Witebsky E., Blumenthal G., Hale W.F., Lever W.F.: Basement membrane antibodies in bullous pemphigoid. *JAMA* 1967;200:751-756.
- Kaczmarek E., Strzelczyk R.: From two to Tyree-dimensionalvisualisation of structures In light and confocal microscopy – applications for biomedical studiem. W: *Current Issues on Multidisciplinary Microscopy Research and Education*. Ed.: A. Mendez Vilas, L. Labajos-Broncano. Badajoz: FORMATEX, 2005, s. 289-95.
- Kagami S., Kai H., Kakinuma T., Miyagaki T., Kamata M., Sugaya M., Tamaki K., Sato S.: High levels of CCL26 in blister fluid and sera of patients with bullouspemphigoid. *J Invest Dermatol.* 2012;132:249-51.
- Kaminska R., Naukarinen A., Glinski W., Horsmanheimo M., Harvima I.T.: Mast cells in developing subepidermal bullous diseases: emphasis on tryptase, chymase and protease inhibitors. *Acta Derm Venereol* 1999;79:351-5.
- Kano Y., Shimosegawa M., Mizukawa Y., Shiohara T.: Pemphigus foliaceus induced by exposure to sunlight. Report of a case and analysis of photochallenge-induced lesions. *Dermatology* 2000;201:132-8.

- Kantele J.M., Savilahti E., Westerholm-Ormio M., Pakkanen S., Arvilommi H.S., Reunala T., Kantele A.M.: Decreased numbers of circulating plasmablasts and differences in IgA1-plasmablast homing to skin in celiac disease and dermatitis herpetiformis. *Clin Exp Immunol* 2009;156:535-41.
- Kaplan R.P., Detwiler S.P., Saperstein H.W.: Physically induced pemphigus after cosmetic procedures. *Int J Dermatol* 1993;32:100-103.
- Kárpáti S. Dermatitis herpetiformis: close to unravelling a disease. *J Dermatol Sci* 2004;34: 83–90.
- Kasahara-Imamura M., Hosokawa H., Maekawa N., Horio T.: Activation of Fc epsilon RI-positive eosinophils in bullous pemphigoid. *Int J Mol Med* 2001 ;7:249-53.
- Kasperkiewicz M., Dährich C., Probst C., Komorowski L., Stöcker W., Schlumberger W., Zillikens D., Rose C.: Novel assay for detecting celiac-associated autoantibodies in dermatitis herpetiformis using deamidated gliadin-analogous fusion peptides. *J. Am. Acad. Dermatol.* Epub 11 sierpnia 2011 [Ahead of print]
- Katayama I., Doi T., Nishioka K.: High histamine level in the blister fluid of bullous pemphigoid. *Arch Dermatol Res* 1984;27:126-7.
- Kavala M., Kocatürk Ö.K., Dewmirkesen C., Can B., Zindanci I., Türkoğlu Z.: Detection of pemphigus autoantibodies in healthy relatives of Turkish patients with pemphigus. *Indian J Dermatol Venereal Leprol* 2007;73:240-2.
- Keene D.R., Sakai L.Y., Lunstrum G.P., Morris N.P., Buergeson R.E.: Type VII collagen forms an extended network of anchoring fibrils. *J Cell Biol* 1987;104:611-621.
- Kirtschig G., Mittag H., Wolf M., Gorski A., Happle R.: Three different autoimmune bullous diseases in one family: is there a common genetic base? *Br J Dermatol* 1999;140:322-327.
- Kochańska-Dziubowicz A., Klimek K., Mielniczuk M.: Przydatność krzywych ROC w ocenie stosowanych testów laboratoryjnych. *Diagn Lab* 1999;35:83-104.
- Kondo K., Monden Y.: Thymoma and myasthenia gravis: A clinical study of 1,089 patients from Japan. *Ann Thorac Surg* 2005;79:219-224.
- Korkmaz B., Moreau T., Gauthier F.: Neutrophil elastase, proteinase 3 and cathepsin G: physicochemical properties, activity and physiopathological functions. *Biochimie* 2008;90:227-42.
- Kowalczyk M.J., Gornowicz J., Szramka-Pawlak B., Dmochowski M., Żaba R.: Transcription of three HERV sequences in pemphigus vulgaris. 8th Congress of the Balic Association of Dermatovenereologists, 17-19 września 2009, Wilno, Litwa.
- Krain L.S.: The association of pemphigus with thymoma or malignancy: a critical review. *Br J Dermatol* 1974a;90:397-405.
- Krain L.S.: Pemphigus: epidemiologic and survival characteristics of 59 patients, 1955-1973. *Arch Dermatol* 1974b;110:862-865.
- Krajewski M., Torzecka J.D., Narbutt J., Woźniak K., Mackiewicz W., Sysa-Jędrzejowska A., Kowalewski C.: Badania patogenności przeciwciał pęcherzycowych u chorych na pęcherzycę zwykłą w różnych okresach aktywności choroby oraz u bezobjawowych członków ich rodzin. Pathogenicity of pemphigus antibodies in patients with pemphigus vulgaris of different activity and their healthy relatives. XXVIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Dermatologicznego, 1-5 września 2004, Bydgoszcz.
- Krichelli D., David M., Frusic-Zlotkin M., Goldsmith D., Rabinov M., Sulkes J., Milner Y.: The distribution of pemphigus vulgaris-IgG subclasses and their reactivity with desmoglein 3 and 1 in pemphigus patients and their first degree relatives. *Br J Dermatol* 2000;143:337-42.
- Kyewski B., Derbinski J.: Self-representation in the thymus: an extended view. *Nat Rev Immunol* 2004;4:688-698.
- Labib R.S., Anhalt G.J., Patel H.P., Mutasim D.F., Diaz L.A.: Molecular heterogeneity of the bullous pemphigoid antigens as detected by immunoblotting. *J Immunol* 1986;136:1231-1235.
- Lagier R.: Nosology versus pathology, two approaches to rheumatic diseases illustrated by Alfred Baring Garrod and Jean-Martin Charcot. *Rheumatology* 2001;40:476-471.
- Lavö B., Nilsson B., Löf L., Nilsson U.R., Ekdahl K.N.: Fc receptor function and circulating immune complexes in gluten sensitive enteropathy – possible significance of serum IgA. *Gut* 1991;32:876-80.
- Lee E., Lendas K.A., Chow S., Pirani Y., Gordon D., Dionisio R., Nguyen D., Spizuoco A., Fotino M., Zhang Y., Sinha A.A.: Disease relevant HLA class II alleles isolated by genotypic, haplotypic, and sequence analysis in North American Caucasians with pemphigus vulgaris. *Human Immunol* 2006;67:125-139.
- Leighty L., Li N., Diaz L.A., Liu Z.: Experimental models for the autoimmune and inflammatory blistering disease. Bullous pemphigoid. *Arch Dermatol Res* 2007;299:417-22.
- Leung C.L., Zheng M., Prater S.M., Liem R.K.: The BPAG1 locus: alternative splicing produces multiple isoforms with distinct cytoskeletal linek domains, including predominant isoforms in neurons and muscles. *J Cell Biol* 2001;154:691-697.

-
- Li K., Sawamura D., Giudice G.J., Diaz A., Mattei M.G., Chu M.L., Uitto J.: Geonomic organization of collagenous domains and chromosomal assignment of human 180-kD bullois pemphigoid antigen-2, a novel collagen of stratified squamous epithelium. *J Biol Chem* 1991;266:24064-24069.
- Lipsker D., Borradori L.: 'Bullous' pemphigoid: what are you? Urgent need of definitions and diagnostic criteria. *Dermatol* 2010;221:131-134.
- Liu Z., Giudice G.J., Zhou X., Swartz S.J., Troy J.L., Fairley J.A., Till G.O., Diaz L.A.: A major role for neutrophils in experimental bullous pemphigoid. *J Clin Invest* 1997;100:1256-63.
- Liu Z., Shipley J.M., Vu T.H., Zhou X., Diaz L.A., Werb Z., Senior R.M.: Gelatinase B-deficient mice are resistant to experimental bullous pemphigoid. *J Exp Med* 1998;188:475-82.
- Liu Z., Zhou X., Ding X., Chen R., Shapiro S., Senior R., Giudice G., Fairley J., Diaz L.: The role of neutrophil elastase, gelatinase B, and plasmin/plasminogen activators in pemphigus foliaceus and pemphigus vulgaris in mice. *J Invest Dermatol* 1999;112:616A.
- Liu Z., Shapiro S.D., Zhou X., Twining S.S., Senior R.M., Giudice G.J., Fairley J.A., Diaz L.A.: A critical role for neutrophil elastase in experimental bullous pemphigoid. *J Clin Invest* 2000a;105:113-23.
- Liu Z., Zhou X., Shapiro S.D., Shipley J.M., Twining S.S., Diaz L.A., Senior R.M., Werb Z.: The serpin alpha1-proteinase inhibitor is a critical substrate for gelatinase B/MMP-9 in vivo. *Cell* 2000b;102:647-55.
- Liu Z. Immunopathology of bullous pemphigoid, an autoimmune and inflammatory skin blistering disease. *Keio J Med.* 2003;52:128-33.
- Liu Z., Li N., Diaz L.A.: Immunopathological mechanisms of acantholysis in pemphigus vulgaris: an explanation by ultrastructural observations. *J Invest Dermatol* 2004;122:XIII-XIV.
- Loiseau P., Lecleach L., Prost C., Lepage V., Busson M., Bastuji-Garin S., Roujeau J.C., Charron D.: HLA class II polymorphism contributes to specify desmoglein derived peptides in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. *J Autoimmunol* 2000;15:67-73.
- Lombardi M.L., de Angelis E., Rossano F., Ruocco V.: Imbalance between plasminogen activator and its inhibitors in thiol-induced acantholysis. *Dermatology* 1993;186:118-122.
- Lombardi M.L., Mrecuro O., Ruocco V., Lo Schiavo A., Lombardi V., Guerrera V., Pirozzi G., Manzo C.: Common human leukocyte antigen alleles in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus Italian patients. *J Invest Dermatol* 1999;113:107-10.
- Lorand L., Conrad S.: Transglutaminases. *Mol Cell Biochem*, 1984, 58, 9-35.
- Lovett W.: Dermatitis herpetiformis and a gluten-free diet. *Am Fam Physican* 2003;67:470-471.
- Ludvigsson J.F., Lindelöf B., Zingone F., Ciampi C.: Psoriasis in nationwide cohort study of patients with celiac disease. *J. Invest. Dermatol.* 2011;131:2010-6.
- Lundin K.E., Sollid L.M., Anthonsen D., Norén O., Molberg Ø., Thorsby E., Sjöström H.: Heterogeneous reactivity patterns of HLA-DQ-restricted, small intestinal T-cell clones from patients with celiac disease. *Gastroenterology* 1997;112:752-9.
- Lynch H.E., Goldberg G.L., Chidgey A., Van den Brink M.R.M., Boyd R., Sempowski G.D.: Thymic involution and immune reconstitution. *Trend Immunol* 2009;30:366-373.
- Mahoney M.G., Wang Z.H., Stanley J.R.: Pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus antibodies are pathogenic in plasminogen activator knockout mice. *J Invest Dermatol* 1999;113:22-5.
- Marfatia Y.S., Patel S., Makrandi S., Sharma P.: Human immunodeficiency virus and pemphigus vulgaris: An interesting association. *Indian J Dermatol, Venereol, Leprol* 2007;73:354-355.
- Marietta E., Black K., Camilleri M., Krause P., Rogers III R.S., David C., Pittelkow M.R., Murray J.A.: A new model for dermatitis herpetiformis that uses HLA-DQ8 transgenic NOD mice. *J Clin Invest* 2004;114:1090-1097.
- Marietta E.V., Camilleri M.J., Castro L.A., Krause P.K., Pittelkow M.R., Murray J.A.: Transglutaminase autoantibodies in dermatitis herpetiformis and celiac sprue. *J Invest. Dermatol*, 2008, 128, 332-335.
- Marionnet C., Pierrard C., Vioux-Chagnoleau C., Sok J., Asselineau D., Bernerd F.: Interactions between fibroblasts and keratinocytes in morphogenesis of dermal-epidermal junction in a model of reconstructed skin. *J Invest Dermatol* 2006;126:971-979.
- Mariotti A., Kedeshian P.A., Dans M., Curatola A.M., Gagnoux-Palacios L., Giancotti F.G.: EGF-R signaling through Fyn kinase disrupts the function of integrin alpha6beta4 at hemidesmosomes: role in epithelial cell migration and carcinoma invasion. *J Cell Biol* 2001;155:447-58.
- Marks J., Shuster S., Watson A.J.: Small-bowel changes in dermatitis herpetiformis. *Lancet*, 1966, 2, 1280-1284.
- Martini S., Mengozzi G., Aimo G., Pagni R., Sategna-Guidetti C.: Diagnostic accuracies for celiac disease of four tissue transglutaminase autoantibody tests using human antigen. *Clin. Chem.* 2001;47:1722-5.
- Mascaró J.M. Jr, España A., Liu Z., Ding X., Swartz S.J., Fairley J.A., Diaz L.A.: Mechanisms of acantholysis in pemphigus vulgaris: role of IgG valence. *Clin Immunol Immunopathol* 1997;85:90-6.

- Masuanga T., Shimizu H., Yee C., Borradori L., Lazarova Z., Nishikawa T., Yancey K.B.: The extracellular domain of the lamina densa of BPAG2 localizes to anchoring filaments and its carboxy terminus extends to the lamina densa of normal human epidermal basement membrane. *J Invest Dermatol* 1997;109:200-206.
- Matysiak-Budnik T., Moura I.C., Arcos-Fajardo M., Lebreton C., Ménard S., Candalh C., Ben-Khalifa K., Dugave C., Tamouza H., van Niel G., Bouhnik Y., Lamarque D., Chaussade S., Malamut G., Cellier C., Cerf-Bensussan N., Monteiro R.C., Heyman M.: Secretory IgA mediates retrotranscytosis of intact gliadin peptides via the transferrin receptor in celiac disease. *J Exp Med* 2008;205:143-54.
- McDonald W.C., Dobbins W.O., Rubin C.E.: Studies of the familial nature of celiac sprue using biopsy of the small intestine. *N Engl J Med* 1965;272:448-56.
- McMillan J.R., Akiyama M., Shimizu H.: Epidermal basement membrane zone components: ultrastructural distribution and molecular interactions. *J Dermatol Sci* 2003;31:169-177.
- Meibodi N.T., Nahidi Y., Mahmoudi M., Javidi Z., Rastin M., Sheikh A., Esmaeeli H.A.: Evaluation of coexistence of the Human Herpesvirus type 8 (HHV-8) infection and pemphigus. *J Invest Dermatol* 2010;49:780-783.
- Meresse B., Ripoche J., Heyman M., Cerf-Bensussan N.: Celiac disease: from oral tolerance to intestinal inflammation, autoimmunity and lymphomagenesis. *Mucosal Immunology* 2009;2:8-23.
- Meyer-Hoffert U., Wiedow O.: Neutrophil serine proteases: mediators of innate immune responses. *Curr Opin Hematol* Epub 29 października 2010. Ahead of print.
- Micali G., Nasca M.R., Musumeci M.L., Innocenzi D.: Postsurgical pemphigus. *Dermatology* 1998;197:192-193.
- Miyagawa S., Higashimine I., Iida T., Yamashina Y., Fukumoto T., Shirai T.: HLA-DRB1*04 and DRB1*14 alleles are associated with susceptibility to pemphigus among Japanese. *J Invest Dermatol* 1997;109:333-40.
- Miyagawa S., Amagai S., Niizeki H., Yamashina Y., Kaneshige T., Nishikawa T., Shirai T., Inoko H.: HLA-DRB1 polymorphism and autoimmune responses to desmogleins in Japanese patients with pemphigus. *Tissue Antigens* 1999;54:333-40.
- Mobacken H., Kastrup W., Nilsson L.A.: Incidence and prevalence of dermatitis herpetiformis in western Sweden. *Acta Derm Venereol (Stockh)* 1984; 64:400-4.
- Moczko J.A., Bręborowicz G.H.: Nie samą biostatystyką... Ośrodek Wydawnictw Naukowych, Poznań 2010.
- Mohimen A., Narula M., Ruocco V., Pisani M., Ahmed A.R.: Presence of the autoantibody in healthy relatives of Italian patients with pemphigus vulgaris. *Arch Dermatol Res* 1993;285:176-77.
- Morton H.C., Brandtzaeg P.: CD89: the human myeloid IgA Fc receptor. *Arch Immunol Ther Exp* 2001;49:217-29.
- Mouquet H., Berrih-Aknin S., Bismuth J., Joly P., Gilbert D., Tron F.: Expression of pemphigus-autoantigen desmoglein 1 in human thymus. *Tissue Antigens* 2008;71:464-470.
- Moura I.C., Centelles M.N., Arcos-Fajardo M., Malheiros D.M., Collawn J.F., Cooper M.D., Monteiro R.C.: Identification of the transferrin receptor as a novel immunoglobulin (Ig)A1 receptor and its enhanced expression on mesangial cells in IgA nephropathy. *J Exp Med* 2001;194:417-25.
- Muller E., Caldelari R., de Bruin A., Baumann D., Bierkamp C., Balmer V.V., Suter M.M.: Pathogenesis in pemphigus vulgaris: A central role for the armadillo protein plakoglobin. *J Invest Dermatol* 2000;115:332.
- Nagel A., Lang A., Engel D., Podstawa E., Hunzelmann N., de Pita O., Borradori L., Uter W., Hertl M.: Clinical activity of pemphigus vulgaris relates to IgE autoantibodies against desmoglein 3. *Clin Immunol* 2010;134:320-30.
- Narbutt J., Sysa-Jędrzejowska A., Torzecka J.D.: Familial pemphigus vulgaris. *J EADV Abstracts* 2001;15:126.
- Neuhausen S.L., Steele L., Ryan S., Mousavi M., Pinto M., Osann K.E., Flodman P., Zone J.J.: Co-occurrence of celiac disease and other autoimmune diseases in celiacs and their first-degree relatives. *J Autoimmun* 2008;31:160-165.
- Neves J.S., Perez S.A., Spencer L.A., Melo R.C., Reynolds L., Ghiran I., Mahmudi-Azer S., Odemuyiwa S.O., Dvorak A.M., Moqbel R., Weller P.F.: Eosinophil granules function extracellularly as receptor-mediated secretory organelles. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008 25;105:18478-83.
- Ng L.G., Qin J.S., Roediger B., Wang Y., Jain R., Cavanagh L.L., Smith A.L., Jones C.A., deVeer M., Grimbaldston M.A., Meeusen E.N., Weninger W.: Visualizing the neutrophil response to sterile tissue injury in mouse dermis reveals a three-phase cascade of events. *J Invest Dermatol* 2011;131:2058-68.
- Niimi Y., Pawankar R., Kawana S.: Increased expression of matrix metalloproteinase-2, matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-13 in lesional skin of bullous pemphigoid. *Int Arch Allergy Immunol* 2006;139:104-13.

- Nishizawa Y., Uematsu J., Owaribe K.: HD4, a 180 kDa bullous pemphigoid antigen, is a major transmembrane glycoprotein of hemidesmosome. *J Biochem* 1993;113:493-501.
- Oikarinen A.I., Zone J.J., Ahmed A.R., Kiistala U., Uitto J.: Demonstration of collagenase and elastase activities in the blister fluids from bullous skin diseases. Comparison between dermatitis herpetiformis and bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol.* 1983;81:261-6.
- Olbricht S.M., Flotte T.J., Collins B., Chapman C.M., Harrist T.J.: Dermatitis herpetiformis. Cutaneous deposition of polyclonal IgA1. *Arch Dermatol* 1986;122:418-21.
- Pate M.B., Smith J.K., Chi D.S., Krishnaswamy G.: Regulation and dysregulation of immunoglobulin E: a molecular and clinical perspective. *Clin Mol Allergy* 2010;8:3.
- Patsatsi A., Vyzantiadis T.A., Devliotou-Panagiotidou D., Chrysomallis F., Sotiriadis D.: Detection of anti-BP180NC16a and anti-BP230 autoantibodies in blister fluid of patients with bullous pemphigoid: the first survey in Greece. *Clin Exp Dermatol* 2008;33:183-5. Epub 18 grudnia 2007.
- Payne A.S., Hanakawa Y., Amagai M., Stanley J.R.: Desmosomes and disease: pemphigus and bullous impetigo. *Curr Opin Cell Biol* 2004;16:536-43.
- Petzl-Erler L., Malheiros D.: Pemphigus foliaceus and desmoglein 1 gene polymorphism: Is there any relationship? *J Autoimmun* 2005;25:121-125.
- Pietkiewicz P., Gornowicz J., Bowszyc-Dmochowska M., Dmochowski M.: A case of bullous pemphigoid with high levels of serum and blister fluid IgG antibodies to BP180 detected with ELISA, but absence of IgG, IgG1 and IgG4 deposits at the dermal-epidermal junction in direct immunofluorescence tests. *Dermatol Klin* 2011;13:77-90.
- Pietkiewicz P., Gornowicz-Porowska J., Bowszyc-Dmochowska M., Dmochowski M.: Pemphigoid gestationis in a female with progressive facial hemiatrophy: microchimerism as a speculative shared background is disputable. *Pol J Pathol*, 1/2012 (zaakceptowany do druku)
- Preisz K., Sárdy M., Horváth A., Kárpáti S.: Immunoglobulin, complement and epidermal transglutaminase deposition in the cutaneous vessels in dermatitis herpetiformis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2005;19:74-9.
- Pribyl T.M., Campagnoni C., Kampf K., Handley V.W., Campagnoni A.T.: The major myelin protein genes are expressed in the human thymus. *J Neurosci Res* 1996;45:812-819.
- Pugliese A., Zeller M., Fernandez A.Jr., Zalcborg L.J., Bartlett R.J., Ricordi C., Pietropaolo M., Eisenbarth G.S., Bennett S.T., Patel D.D.: The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variation at the *INS VNTR-IDD2* susceptibility locus for type 1 diabetes. *Nat Genet* 1997;15:293-297.
- Ravogli A.: A few remarks on dermatitis herpetiformis. *J Am Med Assoc* 1890;XV:845-850.
- Reich A., Wiśnicka B., Szepietowski J.C.: Haemorrhagic nails in pemphigus vulgaris. *Acta Derm Venereol* 2008;88:542.
- Rensing-Ehl A., Gaus B., Bruckner-Tuderman L., Martin S.F.: Frequency, function and CLA expression of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in bullous pemphigoid. *Exp Dermatol* 2007;16:13-21.
- Reunala T., Blomqvist K., Tarpila S., Halme H., Kangas K.: Gluten free diet in dermatitis herpetiformis. 1. Clinical response of skin lesions in 81 patients. *Br J Dermatol* 1977; 97: 473-80.
- Reunala T., Lokki J.: Dermatitis herpetiformis in Finland. *Acta Derm-Venereol* 1978; 58:505-10.
- Reunala T.L.: Dermatitis herpetiformis. *Clin in Dermatol* 2001;19:728-736.
- Revenga-Arranz F., Martinez-Lasso J., Vanaclocha-Sebastian F.: Pemphigus in two MHC-haploidentical brothers. *Dermatology* 1996;193:71-72.
- Rijken F., Bruijnzeel P.L.: The pathogenesis of photoaging: the role of neutrophils and neutrophil-derived enzymes. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2009;14:67-72.
- Rodrigo L.: Celiac disease. *World J Gastroenterol* 2006;12:6585-6593.
- Rose C., Armbruster F.P., Ruppert J., Igl B.W., Zillikens D., Shimanovich I.: Autoantibodies against epidermal transglutaminase are a sensitive diagnostic marker in patients with dermatitis herpetiformis on a normal or gluten-free diet. *J Am Acad Dermatol* 2009;61:39-43.
- Rose Ch., Bröcker E.B., Zillikens D.: Clinical, histological and immunopathological findings in 32 patients with dermatitis herpetiformis. *JDDG* 2010;8:265-70.
- Rostom A., Murray J.A., Kagnoff M.F.: American Gastroenterological Association (AGA) Institute technical review on the diagnosis and management of celiac disease. *Gastroenterology* 2006;131:1981-2002.
- Rousselle P., Keene D.R., Ruggiero F., Champliand M.F., van der Rest M., Burgeson R.E.: Laminin 5 binds the NC-1 domain of type VII collagen. *J Cell Biol* 1997;138:719-728.
- Ruocco V., Peluso G., Pisani M.: Pemphigus vulgaris in only one of two monozygotic twins. *J Am Acad Dermatol* 1985;12:587-589.
- Ruocco V., Pisani M., de Angelis E., Lombardi M.L.: Biochemical acantholysis provoked by thiol drugs. *Arch Dermatol* 1990;126:965-966.

- Ruocco E., Aurilia A., Ruocco V.: Precautions and suggestions for pemphigus patients. *Dermatology* 2001;203:201-207.
- Ruocco V., Ruocco E.: Pemphigus and environmental factors. *Ital Dermatol Venereol* 2003;138:299-309.
- Sagi L., Shere Y., Trau H., Shoenfeld Y.: Pemphigus and infectious agents. *Autoimm Rev* 2008;8:33-35.
- Salmela M.T., Pender S.L., Reunala T., MacDonald T., Saarialho-Kere U.: Parallel expression of macrophage metalloelastase (MMP-12) in duodenal and skin lesions of patients with dermatitis herpetiformis. *Gut* 2001;48:496-502.
- Salvati V.M., MacDonald T.T., Bajaj-Elliott M., Staiano A., Auricchio S., Troncone R., Monteleone G.: Interleukin 18 and associated markers of T helper cell type 1 activity in coeliac disease. *Gut* 2002;50:186-190.
- Sander H.M., Uty M.M.P., Peters M.S.: Bullous pemphigoid and dermatitis herpetiformis: mixed bullous disease or coexistence of two separate entities? *J Cutan Pathol* 1989;16:370-4.
- Sárdy M., Kárpáti S., Merkl B., Paulsson M., Smyth N.: Epidermal transglutaminase (TGase 3) is the autoantigen of dermatitis herpetiformis. *J Exp Med* 2002a; 195:747-57.
- Sárdy M.: Role of tissue (type 2) transglutaminase in the pathogenesis and diagnosis of celiac disease and dermatitis herpetiformis. PhD thesis, SEMMELWEIS UNIVERSITY, PH.D. DOCTORAL SCHOOL, Budapest 2002b.
- Sawamura D., Nomura K., Sugita Y., Mattei M., Chu M., Knowlton R., Uitto J.: Bullous pemphigoid antigen (BPAG1) cDNA cloning and mapping of the gene to the short arm of human chromosome 6. *Genomics* 1990;8:722-726.
- Sawamura D., Li K., Chu M.L., Uitto J.: Kuman bullous pemphigoid antigen (BPAG1). Amino acid sequences deduced from cloned cDNAs predict biologically important peptide segments and protein domains. *J Biol Chem* 1991;266:17784-17790.
- Schafer S., Koch P.J., Franke W.W.: Identification of the ubiquitous human desmoglein, Dsg2, and the expression catalogue of the desmoglein subfamily of desmosomal cadherins. *Exp Cell Res* 1994;211:391-399.
- Schechter N.M.: Structure of the dermal-epidermal junction and potential mechanisms for its degradation: the possible role of inflammatory cells *Immunol Ser* 1989;46:477-507.
- Schmidt E., Ambach A., Bastian B., Bröcker E.B., Zillikens D.: Elevated levels of interleukin-8 in blister fluid of bullous pemphigoid compared with suction blisters of healthy control subjects. *J Am Acad Dermatol* 1996;34:310-2.
- Schuler P., Contassot E., Huard B.: T cell tolerance to the skin: a central role for central tolerance. *Semin Immunopathol* 2007;29:59-64.
- Setterfield J., Bhogal B., Black M.M., McGibbon D.H.: Dermatitis herpetiformis and bullous pemphigoid: a developing association confirmed by immunoelectronmicroscopy. *Br J Dermatol* 1997;136:253-6.
- Shapiro S.D.: Neutrophil elastase: path clearer, pathogen killer, or just pathologic? *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002;26:266-8.
- Shelly S., Agmon-Levin N., Altman A., Shoenfeld Y.: Thymoma and autoimmunity. *Cell Mol Immunol* 2011;8:199-202.
- Shimanovich I., Mihai S., Oostingh G.J., Ilenchuk T.T., Bröcker E.B., Opendakker G., Zillikens D., Sitaru C.: Granulocyte-derived elastase and gelatinase B are required for dermal-epidermal separation induced by autoantibodies from patients with epidermolysis bullosa acquisita and bullous pemphigoid. *J Pathol* 2004;204:519-27.
- Shimizu H., Ishiko A., Masunaga T., Kurihara Y., Sato M., Bruckner-Tuderman L., Nishikawa T.: Most anchoring fibrils in human skin originate and terminate in the lamina densa. *Lab Invest* 1997;76:753-763.
- Shuster S., Watson A.J., Marks J.: Coeliac syndrome in dermatitis herpetiformis. *Lancet* 1968; 1: 1101-6.
- Sitaru C., Schmidt E., Petermann S., Munteanu L.S., Bröcker E.B., Zillikens D.: Autoantibodies to bullous pemphigoid antigen 180 induce dermal-epidermal separation in cryosections of human skin. *J Invest Dermatol* 2002;118:664-671.
- Sitaru C., Zillikens D.: Mechanisms of blister induction by autoantibodies. *Exp Dermatol*, 2005;14:861-75.
- Sjöström H., Lundin K.E., Molberg Ø., Korner R., McAdam S.N., Anthonsen D., Quarsten H., Norén O., Roepstorff P., Thorsby E., Sollid L.M.: Identification of a gliadin T-cell epitope in coeliac disease: general importance of gliadin deamidation for intestinal T-cell recognition. *Scand J Immunol* 1998; 48:111-5.
- Sollid L.M., Molberg O., McAdam S., Lundin K.E.: Autoantibodies in coeliac disease: tissue transglutaminase – guilt by association? *Gut* 1997; 41:851-2.
- Sollid L.M.: Molecular basis of celiac disease. *Annu Rev Immunol* 2000;18:53-81.

- Sospedra M., Ferrer-Francesch X., Domínguez O., Juan M., Foz-Sala M., Pujol-Borrell R.: Transcription of a broad range of self-antigens in human thymus suggests a role for central mechanisms in tolerance toward peripheral antigens. *J Immunol* 1998;161:5918-5929.
- Stammaes J., Dorum S., Fleckenstein B., Aeschlimann D., Sollid L.M.: Gluten T cell epitope targeting by TG3 and TG6; implications for dermatitis herpetiformis and gluten ataxia. *Amino Acids* 2010;39:1183-91.
- Stanley J.R., Hawley-Nelson P., Yuspa S.H., Shevach E.M., Katz S.I.: Characterization of bullous pemphigoid antigen: A unique basement membrane protein of stratified squamous epithelia. *Cell* 1981;24:897-903.
- Stanley J.R., Woodley D.T., Katz S.I.: Identification and partial characterization of pemphigoid antigen extracted from normal human skin. *J Invest Dermatol* 1984;82:108-111.
- Stanley J.R., Tanaka T., Mueller S., Klaus-Kovtun V., Roop D.: Isolation of complementary DNA for bullous pemphigoid antigen by use of patients' autoantibodies. *J Clin Invest* 1988;82:1864-1870.
- Sterk L.M., Geuijen C.A.W., Oomen L.C.J., Calafat J., Janssen H., Sonnenberg A.: The tetraspan molecule Cd151, a novel constituent of hemidesmosomes, associates with the integrin $\alpha\beta4$ and may regulate the spatial organization of hemidesmosomes. *J Cell Biol* 2000;149:969-982.
- Sugai E., Smecuol E., Niveloni S., Vázquez H., Mazure R., Czech A., Kogan Z., Mauriño E., Bai J.C.: Celiac disease serology in dermatitis herpetiformis. Which is the best option for detecting gluten sensitivity? *Acta Gastroenterol. Latinoam.* 2006;36:197-201.
- Sugai E., Hwang H.J., Vázquez H., Smecuol E., Niveloni S., Mazure M., Mauriño E., Aeschlimann P., Binder W., Aeschlimann D., Bai J.C.: New serology assays can detect gluten sensitivity among enteropathy patients seronegative for anti-tissue transglutaminase. *Clin. Chem.* 2010;56:661-5.
- Sullivan T.P., Elgart G.W., Kirsner R.S.: Pemphigus and smoking. *Int J Dermatol* 2002;41:528-530.
- Szepietowski J.C., Różycka B., Baran E.: Subungual haemorrhages in fatal pemphigus vulgaris. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2001;15:87-8.
- Takase H., Yu H.R., Mahdi R.M., Douek D.C., DiRusso G.B., Midgley F.M., Dogra R., Allende G., Rosenkranz E., Pugliese A., Egwuagu C.E., Gery I.: Thymic expression of peripheral tissue antigens in humans: a remarkable variability among individuals. *Int Immunol* 2005;17:1131-1140.
- Tchernev G., Orfanos C.E.: Antigen mimicry, epitope spreading and the pathogenesis of pemphigus. *Tissue Antigens* 2006;68:280-286.
- Torzecka J.D., Narbutt J., Sysa-Jędrzejowska A., Borowiec M., Ptasńska A., Miś J., Woszczek G., Kowalski M.L.: Związek antygenów HLA klasy I i II (DRB1) z pęcherzycą – badania populacji polskiej. *Alergia Astma Immunologia* 2003a;8:142-7.
- Torzecka J.D., Narbutt J., Sysa-Jędrzejowska A., Waszczykowska E., Lakumowicz J., Pas H.H.: Detection of pemphigus autoantibodies by IIF and ELISA tests in patients with pemphigus vulgaris and foliaceus and in healthy relatives. *Med Sci Monit* 2003b;9:CR528-33.
- Torzecka J.D., Woźniak K., Kowalewski C., Waszczykowska E., Sysa-Jędrzejowska A., Pas H.H., Narbutt J.: Circulating pemphigus autoantibodies in healthy relatives of pemphigus patients: coincidental phenomenon with a risk of disease development? *Arch Dermatol Res* 2007;299:239-43.
- Tron F., Gilbert D., Mouquet H., Joly P., Drouot L., Makni S., Masmoudi H., Charron D., Zitouni M., Loiseau P., Ben Ayed M.: Genetic factors in pemphigus. *J Autoimmunol* 2005;24:319-28.
- Tsunoda K., Ota T., Suzuki H., Ohyama M., Nagai T., Nishikawa T., Amagai M., Koyasu S.: Pathogenic autoantibody production requires loss of tolerance against desmoglein 3 in both T and B cells in experimental pemphigus vulgaris. *Eur J Immunol* 2002;32:627-633.
- Tur E., Brenner S.: Diet and pemphigus: In pursuit of exogenous factors in pemphigus and fogo selvagem. *Arch Dermatol* 1998;134:1406-1410.
- Tursi A., Brandimarte G., Giorgetti G.M.: Prevalence of antitissue transglutaminase antibodies in different degrees of intestinal damage in celiac disease. *J Clin Gastroenterol* 2003;36:219-221.
- Ujiié H., Shibaki A., Nishie W., Shimizu H.: What's new in bullous pemphigoid. *J Dermatol* 2010;37:194-204.
- Vafiadis P., Bennett S.T., Todd J.A., Nadeau J., Grabs R., Goodyer C.G., Wickramasinghe S., Colle E., Polychronakos C.: Insulin expression in human thymus is modulated by *INS VNTR* alleles at the *IDDM2* locus. *Nat Genet* 1997;15:289.
- Van der Wal Y., Kooy Y., van Veelen P., Peña S., Mearin L., Papadopoulos G., Koning F.: Selective deamidation by tissue transglutaminase strongly enhances gliadin-specific T cell reactivity. *J Immunol* 1998; 161:1585-8.
- Veldman C., Stauber A., Wassmuth R., Uter W., Schuler G., Hertl M.: Dichotomy of autoreactive Th1 and Th2 cell responses to desmoglein 3 in patients with pemphigus vulgaris (PV) and healthy carriers of PV-associated HLA class II alleles. *J Immunol* 2003;170:635-42.

-
- Verraes S., Hornebeck W., Polette M., Borradori L., Bernard P.: Respective contribution of neutrophil elastase and matrix metalloproteinase 9 in the degradation of BP180 (type XVII collagen) in human bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol* 2001;117:1091-6.
- Villone D., Fritsch A., Koch M., Bruckner-Tuderman L., Hansen U., Bruckner P.: Supramolecular interactions in the dermo-epidermal junction zone. Anchoring fibril-collagen VII tightly binds to banded collagen fibrils. *J Biol Chem* 2008;283:24506-24513.
- Vivas S., Ruiz de Morales J.M., Martínez J., González M.C., Martín J., Cechini C., Olcoz J.L.: Human recombinant anti-transglutaminase antibody testing is useful in the diagnosis of silent coeliac disease in a selected group of at-risk patients. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2003;15:479-83.
- Vodegel R.M., Jonkman M.F., Pas H.H., de Jong M.C.: U-serrated immunodeposition pattern differentiates type VII collagen targeting bullous diseases from other subepidermal bullous autoimmune diseases. *Br J Dermatol* 2004;151:112-118.
- Wada N., Nishifuji K., Yamada T., Kudoh J., Shimizu N., Matsumoto M., Peltonen L., Nagafuchi S., Amagai M.: Aire-dependent thymic expression of desmoglein 3, the autoantigen in pemphigus vulgaris, and its role in T-cell tolerance. *J Invest Dermatol* 2011;131:410-417.
- Wakkach A., Guyon T., Bruand C., Tzartos S., Cohen-Kaminsky S., Berrih-Aknin S.: Expression of acetylcholine receptor genes in human thymic epithelial cells: implications for myasthenia gravis. *J Immunol* 1996;57:3752-3760.
- Wang J., Bu D.F., Li T., Zheng R., Zhang B.X., Chen X.X., Zhu X.J.: Autoantibody production from a thymoma and a follicular dendritic cell sarcoma associated with paraneoplastic pemphigus. *Br J Dermatol* 2005;153:558-564.
- Weisenseel P., Martin S., Partscht K., Messer G., Prinz J.C.: Relevance of the low-affinity type of the Fcγ3-receptor IIIa-polymorphism in bullous pemphigoid. *Arch Dermatol Res* 2007;299:163-4.
- Weiss S.J.: Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989 9;320:365-76.
- Whittingham S., Mackay I.R.: The "pemphigus" antibody and immunopathies affecting the thymus. *Br J Dermatol* 1971;84:1-6.
- Wiedow O., Meyer-Hoffert U.: Neutrophil serine proteases: potential key regulators of cell signalling during inflammation. *J Intern Med* 2005;257:319-28.
- Wilson C.L., Dean D., Wojnarowska F.: Pemphigus and the terminal hair follicle. *J Cutan Pathol* 1991;18:428-31.
- Wines B.D., Hogarth P.M.: IgA receptors in health and disease. *Tissue Antigens* 2006;6:103-14.
- Wolf R., Ruocco V.: Gaining more insight into the pathomechanisms of thiol-induced acantholysis. *Med Hypotheses* 1997;48:107-110.
- Wolnik-Trzeciak G.: Autoimmunizacja wobec naskórkowej i tkankowej transglutaminazy w odniesieniu do wybranych czynników skórnej patogenezы opryszczkowego zapalenia skóry. Rozprawa doktorska, UM im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań 2005a.
- Wolnik-Trzeciak G., Bowszyc-Dmochowska M., Górna A., Nieruchalska E., Kaczmarek E., Dmochowski M.: Eosinophil major basic protein (MBP) in relation to IgA antibodies to epidermal transglutaminase in dermatitis herpetiformis. *Dermatol Klin* 2005b;7:67-71.
- Wolnik-Trzeciak G., Hochól A., Bowszyc-Dmochowska M., Dmochowski M.: Kliniczne, drobnowidowe i molekularne cechy zajęcia mieszkca włosowego w autoimmunizacyjnych dermatozach pęcherzowych. *Dermatol Klin* 2006;8:114-120.
- Woof J.M.: The human IgA-Fc alpha receptor interaction and its blockade by streptococcal IgA-binding proteins. *Biochem Soc Trans* 2002;30:491-4.
- Woźniak K., Kowalewski C.: Alterations of basement membrane zone in autoimmune subepidermal bullous diseases. *J Dermatol Sci* 2005;40:169-175.
- Yamamoto K., Inoue N., Masuda R., Fujimori A., Saito T., Imajoh-Ohmi S., Shinkai H., Sakiyama H.: Cloning of hamster type XVII collagen cDNA, and pathogenesis of anti-type XVII collagen antibody and complement in hamster bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol* 2002 Mar;118:485-92.
- Yancey K.B.: The pathophysiology of autoimmune blistering diseases. *J Clin Invest* 2005;115:825-28.
- Yang Y., Dowling J., Yu Q.C., Kouklis P., Cleveland D.W., Fuchs E.: An essential cytoskeletal linker protein connecting actin microfilaments to intermediate filaments. *Cell* 1996;86:655-665.
- Yokouchi M., Saleh M.A., Kuroda K., Hachiya T., Stanley J. R., Amagi M., Ishii K.: Pathogenic epitopes of autoantibodies in pemphigus reside in the amino-terminal adhesive region of desmogleins which are unmasked by proteolytic processing of prosequence. *J Invest Dermatol* 2009;129:2156-66.
- Yokoyama T., Matsuda S., Takae Y., Wada N., Nishikawa T., Amaga M., Koyasu S.: Antigen-independent development of Foxp3+ regulatory T cells suppressing autoantibody production in experimental pemphigus vulgaris. *Int Immunol* 2011;23:365-373.

-
- Yu X., Holdorf K., Kasper B., Zillikens D., Ludwig R.J., Petersen F.: FcγRIIA and FcγRIIIB are required for autoantibody-induced tissue damage in experimental human models of bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol* 2010;130:2841-4.
- Zehn D., Bevan M.J.: T cells with low avidity for a tissue-restricted antigen routinely evade central and peripheral tolerance and cause autoimmunity. *Immunity* 2006;25:261-170.
- Zhao M., Trimbeger M.E., Li N., Diaz L.A., Shapiro S.D., Liu Z.: Role of FcRs in animal model of autoimmune bullous pemphigoid. *J Immunol* 2006 1;177:3398-405.
- Zhou S., Wakelin S.H., Allen J., Wojnarowska F.: Blister fluid for the diagnosis of subepidermal immunobullous diseases: a comparative study of basement membrane zone autoantibodies detected in blister fluid and serum. *Br J Dermatol* 1998;139:27-32.
- Zillikens D., Giudice G.J.: BP180/type XVII collagen: its role in acquired and inherited disorders of the dermal-epidermal junction. *Arch Dermatol Res* 1999;291:197-194.
- Zillikens D.: BP180 as the common autoantigen in blistering diseases with different clinical phenotypes. *Keio J Med* 2002;51:21-28.
- Zone J.J.: Skin manifestations of celiac disease. NIH Consensus Development Conference on Celiac Disease, June 28–30, 2004, Bethesda, Maryland,73-75.
- Zone J.J., Schmidt L.A., Taylor T.B., Hull C.M., Sotiriou M.C., Jaskowski T.D., Hill H.R., Meyer L.J.: Dermatitis herpetiformis sera or goat anti-transglutaminase-3 transferred to human skin-grafted mice mimics dermatitis herpetiformis immunopathology. *J Immunol* 2011;186:4474-80.