

Analiza ekspresji receptora aktywowanego proteazami 2 w zmianach łuszczycowych*

Expression of protease-activated receptor 2 in psoriatic lesions

Anna Kobuszewska¹, Kalina Welz-Kubiak¹, Adam Reich²

¹Katedra i Klinika Dermatologii, Wenerologii i Alergologii, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

²Zakład i Klinika Dermatologii, Uniwersytet Rzeszowski

STRESZCZENIE

Wstęp: Uwzględniając sugerowany udział receptora aktywowanego proteazami 2 (PAR-2) w generowaniu neurogennego zapalenia skóry oraz sugestie dotyczące jego roli w powstawaniu świądu towarzyszącego zmianom łuszczycowym, w niniejszej pracy poddano analizie ekspresję receptora PAR-2 w zmienionej i niezmienionej chorobowo skórze pacjentów z łuszczycą w odniesieniu do nasilenia procesu chorobowego oraz odczuwanego przez pacjentów świądu.

Materiał i metody: Do badania włączono 31 pacjentów z łuszczycą plackowatą. Nasilenie łuszczycy oceniono za pomocą skali PASI (Psoriasis Area and Severity Index), intensywność świądu zaś — za pomocą 10-centymetrowej wizualnej skali analogowej (VAS, Visual Analogue Scale). Od wszystkich uczestników badania pobrano ze skóry zmienionej i niezmienionej chorobowo dwie biopsje szcancowe o średnicy 4 mm, które następnie wykorzystano do oceny ekspresji PAR-2 w skórze chorych na łuszczycę.

Wyniki: W skórze zmienionej chorobowo obserwowano silną ekspresję receptorów PAR-2, natomiast w skórze niezmienionej chorobowo ekspresja była znacznie słabsza (oceniona na 1 pkt w skali 0–3). Ekspresja PAR-2 w skórze zmienionej chorobowo była ponad trzykrotnie wyższa niż w otaczającej skórze niezmienionej chorobowo (średnia: $2,32 \pm 0,59$ vs $0,72 \pm 0,3$; $p < 0,001$). Stopień ekspresji PAR-2 w skórze zmienionej istotnie korelował z nasileniem świądu ($r = 0,58$; $p = 0,01$).

Wnioski: Uzyskane wyniki sugerują, że świąd w łuszczycy powstaje przynajmniej częściowo w wyniku nadmiernej aktywności proteaz i pobudzenia receptorów PAR-2. Wydaje się, że układ proteaza/PAR-2 jest dobrym kandydatem do uznania go za potencjalnego mediatora świądu przewlekłego w łuszczycy.

Forum Derm. 2018; 4, 4: 133–137

Słowa kluczowe: łuszczycy, receptory aktywowane proteazami, świąd

ABSTRACT

Introduction: Taking into account the suggested role of the protease-activated receptor 2 (PAR-2) in the generation of neurogenic dermatitis and its potential action in chronic pruritus associated with psoriatic lesions, the present study analyzed the expression of the PAR-2 receptor in lesional and non-lesional skin of patients with psoriasis in relation to the severity of the disease process and the pruritus experienced by patients.

Material and methods: A total of 31 patients with plaque psoriasis were included in the study. The severity of psoriasis was assessed using the PASI scale (Psoriasis Area and Severity Index), and the intensity of pruritus was measured using the 10-cm Visual Analogue Scale (VAS). Two biopsies of 4 mm diameter were taken from lesional and non-lesional skin to evaluate the expression of PAR-2 in the skin of patients with psoriasis.

Results: PAR-2 receptors were strongly expressed in the diseased skin, whereas in the non-lesional skin, the PAR-2 expression was significantly weaker. Expression of PAR-2 in lesional skin was more than 3-fold higher than in the surrounding unchanged skin (mean: 2.32 ± 0.59 vs. 0.72 ± 0.3 , $p < 0.001$). The PAR-2 expression in the skin was significantly correlated with the severity of pruritus ($r = 0.58$, $p = 0.01$).

Conclusions: The results obtained by our group suggest that pruritus in psoriasis, at least in part, is dependent on increased protease activity and activation of PAR-2 receptors. It seems that the protease/PAR-2 system is a good candidate for considering it as a potential mediator of pruritus in psoriasis

Forum Derm. 2018; 4, 4: 133–137

Key words: psoriasis, protease-activated receptors, pruritus

Adres do korespondencji:

prof. dr hab. med. Adam Reich, Zakład i Klinika Dermatologii, Uniwersytet Rzeszowski, ul. Szopena 2, 35–055 Rzeszów, tel.: 605 076 722, e-mail: adi_medicalis@go2.pl

*Praca powstała w ramach grantu Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu: Pbm-173.

WSTĘP

Łuszczyca jest przewlekłą zapalną chorobą skóry o podłożu genetycznym, która występuje u około 1–3% światowej populacji. W rozwoju zmian łuszczykowych istotną rolę odgrywiają zjawiska immunologiczne, a w szczególności nadmierna aktywacja limfocytów typu T. W obrazie klinicznym obserwujemy okrągłe, czerwono-brunatne lub zaróżowione, płaskie grudki o wyraźnych brzegach i zróżnicowanej wielkości, stopniowo zlewające się w większe blaszki, pokryte srebrzystą lub srebrzystoszarą nawarstwiającą się łuską. Zmiany chorobowe występują najczęściej na wyprostnych powierzchniach łokci i kolan, w okolicy kości krzyżowej, na pośladkach, na owłosionej skórze głowy oraz skórze stóp i dłoni. Ocenia się, że około 70–90% pacjentów z łuszczyką odczuwa świąd skóry. Wielu chorych na łuszczykę wskazuje świąd jako najbardziej kłopotliwy spośród wszystkich objawów podmiotowych choroby [1].

Mimo licznych badań etiopatogeneza łuszczycy oraz towarzyszącego jej świądu nie została w pełni wyjaśniona [2]. Histamina, przez lata uznawana za główny mediator świądu, w świądzie towarzyszącym łuszczycy raczej nie odgrywa istotnej roli. Z kolei doniesienia z ostatnich lat wskazują na znaczenie innych mediatorów w przekazywaniu sygnału świądowego, między innymi endogennych peptydów opioidowych, neuropeptydów, prostaglandyn, kwasu lizofosfatydowego oraz proteaz [2]. Wydaje się, że szczególnie proteazy mogą odgrywać znaczącą rolę w pojawieniu się świądu w przypadku neurogennego zapalenia skóry, do jakiego dochodzi w łuszczyce. Udział proteaz w rozwoju procesu zapalnego oraz odpowiedzi immunologicznej po raz pierwszy zasugerowano w latach 50. ubiegłego wieku. Mogą one aktywować sprzężone z białkiem G receptory aktywowane przez proteazy (PAR, *protease-activated receptors*). W przeciwieństwie do szerokiej rodziny pozostałych receptorów sprzężonych z białkiem G podlegają one aktywacji nie przez wiązanie rozpuszczalnego ligandu, ale przy udziale unikalnego mechanizmu proteolitycznego cięcia. W wyniku rozszczepienia zewnątrzkomórkowego N-końca powstaje nowy peptyd, który działając jak ligand, wiąże się do receptora i powoduje jego nieodwracalną samoaktywację [3, 4].

Receptory PAR są prawie wyłącznie aktywowane przez grupę proteaz serynowych: trypsynę, trombinę, katepsynę G. Dotychczas wyodrębniono cztery typy: PAR-1, PAR-2, PAR-3, PAR-4; PAR-1, PAR-3 i PAR-4 ulegają aktywacji pod wpływem trombiny, a PAR-2 — pod wpływem trypsyny. Spośród wszystkich receptorów PAR największą uwagę w przypadku skóry poświęca się PAR-2 [4].

Receptor PAR-2 ulega ekspresji w wielu narządach wewnętrznych; jego obecność potwierdzono również w różnych typach komórek zapalnych. Przyjmuje się, że aktywacja

receptora PAR-2 w komórkach układu immunologicznego prowadzi do uwolnienia wielu mediatorów uczestniczących w generowaniu procesów zapalnych w skórze [3, 4]. Wysoką ekspresję tego receptora wykazano również w keratynocytach, gdzie nie tylko pełni on funkcję prozapalną, lecz także odgrywa rolę regulatora wzrostu [4].

CEL PRACY

Biorąc pod uwagę sugerowany udział receptora PAR-2 w generowaniu neurogennego zapalenia skóry oraz znaczenie w powstawaniu świądu towarzyszącego zmianom łuszczykowym, analizie poddano ekspresję receptora PAR-2 w zmienionej i niezmienionej chorobowo skórze pacjentów z łuszczyką w odniesieniu do nasilenia procesu chorobowego oraz odczuwanego przez pacjentów świądu.

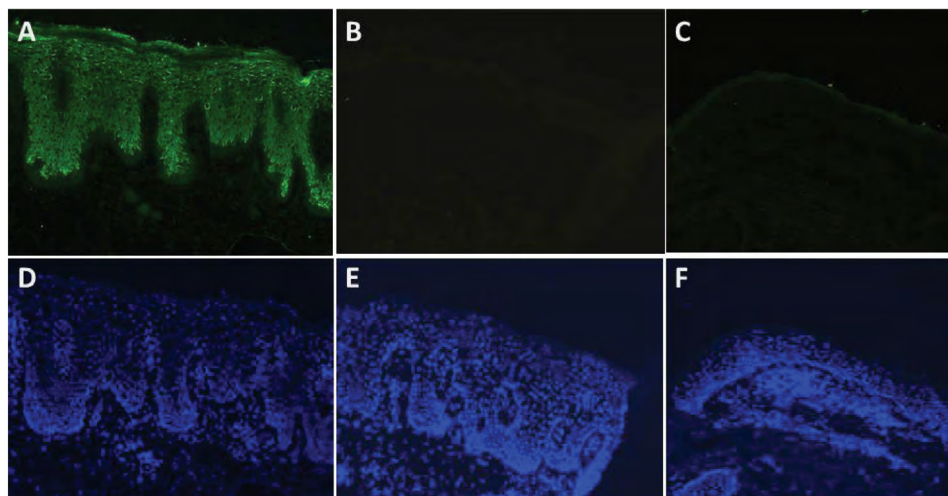
MATERIAŁ I METODY

Pacjenci

Do badania włączono 31 pacjentów z łuszczyką plackowatą (5 kobiet i 26 mężczyzn) w wieku od 26 do 72 lat (średnia: $45,6 \pm 12,4$ lat). U 7 (22,6%) chorych rozpoznawano dodatkowo łuszczykowe zapalenie stawów. Czas trwania łuszczycy w analizowanej grupie chorych wahał się od 1 miesiąca do 47 lat (średnio $15,4 \pm 12,6$ lat), przy czym aktualne zaostrzenie choroby trwało od 2 tygodni do 36 miesięcy (średnio $4,7 \pm 7,7$ mies.). Rodzinne występowanie łuszczycy stwierdzono u 13 (41,9%) pacjentów, przy czym u 8 (25,8%) osób łuszczyca występowała u krewnego pierwszego stopnia, natomiast u pozostałych 5 (16,1%) — u dalszych krewnych.

Ocena kliniczna i pobranie biopsji

Badanie uzyskało zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Wszyscy pacjenci wyrazili zgodę na udział w badaniu. Globalne nasilenie łuszczycy oceniono za pomocą skali PASI (*Psoriasis Area and Severity Index*) [5]. Do określenia nasilenia zmiany chorobowej, z której wykonywano biopsję, użyto zmodyfikowanej skali PASI — oceniono nasilenie rumienia, nacieku i łuszczenia w skali od 0 do 4, a następnie zsumowano otrzymane wyniki, uzyskując całościowy wynik wykorzystany do dalszych analiz. Nasilenie świądu oceniono za pomocą 10-centymetrowej wizualnej skali analogowej (VAS, *visual analogue scale*), w której początek skali (0 pkt) oznaczał brak świądu, a jej koniec — najsilniejszy świąd, jaki pacjent mógł sobie wyobrazić (10 pkt) [6]. U wszystkich uczestników badania wykonano ze skóry zmienionej i niezmienionej chorobowo dwie biopsje sztanckowe o średnicy 4 mm, które następnie natychmiast zamrożono, pokrojono na skrawki grubości 6 μ m i przechowano w temperaturze -70°C do dalszej analizy.



Rycina 1. Analiza ekspresji receptora aktywowanego przez proteazy 2 w łuszczy: (A) skóra zmieniona chorobowo, (B) skóra zmieniona chorobowo — kontrola negatywna, (C) skóra niezmieniona chorobowo, (D–F) odpowiadające preparaty wybarwione DAPI (4',6-diamidyno-2-fenylindol) celem wizualizacji jąder komórkowych

Badanie immunofluorescencyjne

Po rozmrożeniu skrawki były inkubowane przez 15 minut w 4-procentowym roztworze formaldehydu w soli fizjologicznej buforowanej fosforanem (PBS, *phosphate buffered saline*) o pH = 7,4 w temperaturze 4°C. Następnie, po dwukrotnym przemyciu w PBS próbki zostały permeabilizowane w 1-procentowym roztworze Triton X-100 w PBS, zablokowane 2-procentowym roztworem albumin bydlęcych (BSA, *bovine serum albumin*), po czym inkubowano je przez noc w temperaturze 4°C z króliczym przeciwciałem monoklonalnym skierowanym przeciw PAR-2 w rozcieńczeniu 1 : 50 (Santa Cruz Biotechnology, USA; nr katalogowy sc-13504). Po ponownym przepłukaniu PBS skrawki inkubowano przez 1 godzinę w ciemnej komorze ze skoniugowanym z izotiocyanianem fluoresceiny (FITC) mysim przeciwciałem skierowanym przeciwko króliczej immunoglobulinie (Santa Cruz Biotechnology, USA; nr katalogowy sc-2359) w rozcieńczeniu 1 : 200, utrwalano medium utrwalającym (Ultra Cruz Mounting Medium, Santa Cruz Biotechnology, USA; nr katalogowy sc-24941), a następnie wizualizowano za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego Zeiss Axio Imager.A2 (Zeiss, Niemcy). Jako negatywną kontrolę wykorzystywano skrawki, w których pominięto inkubację ze swoistym przeciwciałem anty-PAR-2. Natężenie fluorescencji oceniano za pomocą 4-punktowej skali (0 pkt — brak reakcji, 1 pkt — reakcja słabo dodatnia, 2 pkt — reakcja średnio nasiloną, 3 pkt — reakcja silnie dodatnia).

Analiza statystyczna

Wszystkie uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem pakietu Statistica 12.0 (Statsoft, Kraków). Ewentualne różnice między porównywanymi grupami weryfikowano testem U Manna-Whitneya lub testem

χ^2 . Ewentualne zależności pomiędzy danymi ciągłymi sprawdzano testem korelacji Pearsona. Wartości współczynnika $p < 0,05$ uznawano za istotne statystycznie.

WYNIKI

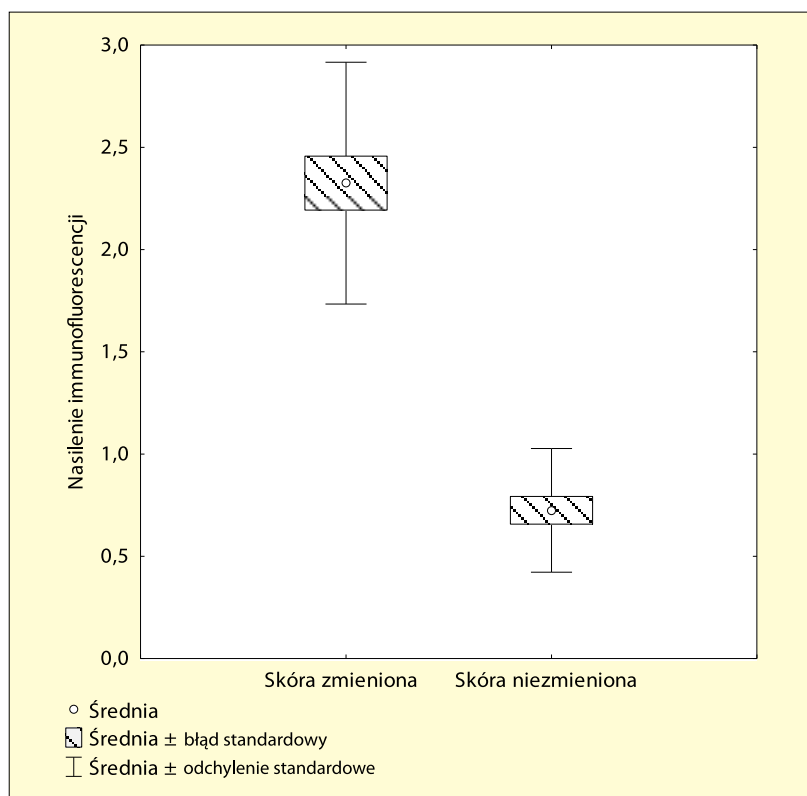
Nasilenie łuszczy i towarzyszącego jej świądu

Nasilenie łuszczy według skali PASI wynosiło średnio $16,0 \pm 9,6$ punktów (zakres: 3,9–50 pkt). Z kolei nasilenie łuszczy w miejscu pobrania biopsji oceniono na średnio $6,9 \pm 1,8$ punktów (zakres: 2–10 pkt). Nasilenie łuszczy było niezależne od wieku i płci, długości choroby, czasu trwania aktualnego zaostrzenia łuszczy, współlistnienia łuszczykowego zapalenia stawów czy dodatniego wywiadu rodzinnego w kierunku łuszczy (dane niepokazane).

Spośród analizowanych pacjentów świąd skóry dotyczył 28 osób (90,3%), a jego nasilenie wahało się od 1 do 10 punktów (średnio $6,3 \pm 2,5$ pkt). Nasilenie świądu w istotny sposób korelowało z wiekiem pacjentów ($r = 0,54$, $p = 0,002$) oraz czasem trwania łuszczy ($r = 0,55$, $p = 0,001$). Na nasilenie świądu nie miały natomiast wpływu płeć, czas trwania aktualnego zaostrzenia choroby, dodatni wywiad rodzinny oraz nasilenie łuszczy (dane niepokazane).

Ekspresja PAR-2 w łuszczy

W skórze zmienionej chorobowo obserwowano umiarkowaną lub silną ekspresję receptorów PAR-2 (ocenioną na 2 lub 3 pkt w skali 0–3), natomiast ekspresja w skórze niezmienionej chorobowo w porównaniu ze skórą zmienioną była znacznie słabsza (oceniona na 1 pkt w skali 0–3) (ryc. 1). Ekspresja PAR-2 w skórze zmienionej chorobowo była ponad trzykrotnie wyższa niż w otaczającej skórze niezienionej chorobowo (średnia: $2,32 \pm 0,59$ vs $0,72 \pm 0,3$; $p < 0,001$).



Rycina 2. Porównanie ekspresji receptora aktywowanego przez proteazy 2 w bioptatach skóry zmienionej i skóry niezmienionej pobranych od osób chorujących na łuszczycę ($p < 0,001$)

Stopień ekspresji PAR-2 w skórze zmienionej istotnie korelował jedynie z nasileniem świądu ($r = 0,58$; $p = 0,01$), nie miał natomiast związku z wiekiem ($p = 0,31$) i płcią chorego ($p = 0,7$), czasem trwania łuszczycy ($p = 0,46$), czasem trwania aktualnego zaostrzenia łuszczycy ($p = 0,35$) ani z nasileniem łuszczycy ($p = 0,99$). Również stopień ekspresji PAR-2 w skórze niezmienionej, choć istotnie słabszy, również istotnie korelował z nasileniem świądu ($r = 0,54$; $p = 0,03$), nie stwierdzono natomiast żadnych innych istotnych zależności między analizowanymi parametrami klinicznymi i demograficznymi a ekspresją PAR-2 w skórze niezmienionej chorobowo (dane niepokazane).

Porównanie ekspresji PAR-2 w bioptatach skóry zmienionej i skóry niezmienionej pobranych od osób chorujących na łuszczycę przedstawiono na rycinie 2.

DYSKUSJA

W literaturze pojawiło się dotychczas wiele wzmianek dotyczących udziału receptorów PAR2 w tworzeniu procesu zapalnego oraz indukowaniu świądu, ale nadal brak wystarczających badań nad ich znaczeniem w poszczególnych chorobach skóry [7]. Mamy nadzieję, że obecne wyniki naszych badań poszerzą wiedzę na temat znaczenia PAR-2 w patogenie zapalnych chorób skóry, a w szczególności łuszczycy. Być może przedstawione tu obserwacje, wspólnie

z wynikami innych autorów, przyczynią się w przyszłości do powstania nowych metod terapeutycznych, a tym samym do poprawy jakości życia chorych na łuszczycę.

Autorzy niniejszej pracy uważają, że interesujące i niezmiernie istotne jest spostrzeżenie, iż ekspresja receptora PAR-2 w skórze zarówno zmienionej, jak i niezmienionej chorobowo istotnie korelowała z nasileniem świądu. Dane epidemiologiczne wskazują, że świąd dotyczy około 70–90% chorych na łuszczycę, a dla wielu pacjentów jest najbardziej nieprzyjemnym objawem choroby [1, 2]. Zasadność prowadzenia badań nad patogenезą świądu w łuszczycy wynika przede wszystkim z wysokiego stopnia uciążliwości tego objawu. Świąd może powodować problemy z zasypianiem oraz przyczyniać się do częstych wybudzeń w trakcie snu, co obniża istotnie jego jakość. Odnotowano ponadto, że z powodu świądu 35% pacjentów wykazywało większe pobudzenie emocjonalne, 24% — objawy depresyjne, a 30% — problemy z koncentracją; 23% chorych było zmuszonych do zmiany nawyków żywieniowych, a 35% sugerowało zmniejszenie bądź całkowite zaniechanie kontaktów seksualnych.

Mimo tak częstego występowania tego objawu patogenеза świądu w łuszczycy nadal pozostaje niewyjaśniona, co przekłada się też na brak w pełni skutecznych metod leczenia świądu łuszczycowego. Pełniejsze poznanie jego

patomechanizmu może pomóc w opracowaniu skuteczniejszych form leczenia. Niedawno zasugerowano, że za świąd w łuszczycy mogą być odpowiedzialne receptory opioidowe w skórze, zwłaszcza zaburzenia ekspresji i funkcji receptorów *kappa*-opiodowych [8]. Obecne wyniki sugerują jednak, że układ opiodowy w skórze jest tylko jednym z wielu układów przekaźników biorących udział w powstawaniu świądu. Wyniki niniejszego badania wskazują, że świąd w łuszczycy może powstawać także w wyniku nadmiernej aktywności proteaz i pobudzenia receptorów PAR-2. Uwzględniając, że pobudzenie receptora PAR-2 wiąże się z trwałą i nieodwracalną zmianą jego konformacji, wydaje się, że układ proteaza/PAR można by uznać za potencjalny układ przekaźnikowy odpowiedzialny za powstanie świądu przewlekłego. Na znaczenie PAR-2 w patogenezie świądu zwracali uwagę także inni autorzy, zwłaszcza w odniesieniu do atopowego zapalenia skóry [7, 9]. Konieczne są zatem dalsze badania potwierdzające rolę PAR-2 w powstawaniu świądu, w szczególności z lekami blokującymi PAR-2 i uniemożliwiającymi jego pobudzenie. Ustąpienie lub znaczące złagodzenie świądu po zablokowaniu PAR-2 byłoby koronnym dowodem na

istotną rolę tego receptora i proteaz w generowaniu świądu towarzyszącego łuszczycy.

PIŚMIENNICTWO

1. Reich A, Welz-Kubiak K, Rams L. Apprehension of the disease by patients suffering from psoriasis. *Postepy Dermatol Alergol.* 2014; 31: 289–293.
2. Szepietowski JC, Reich A. Pruritus in psoriasis: An update. *Eur J Pain.* 2016; 20: 41–46.
3. Kempkes C, Buddenkotte J, Cevikbas F, Buhl T, Steinhoff M. Role of PAR-2 in neuroimmune communication and itch. [in:] Carstens E, Akiyama T (ed.). *Itch: Mechanisms and Treatment*, CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton (FL), 2014.
4. Reich A, Kobuszewska A, Szepietowski J. Role of protease activated receptors (PAR) in the pathogenesis of pruritus. *Dermatol Prakt.* 2014; 6: 25–29.
5. Fredriksson T, Pettersson U. Severe psoriasis — oral therapy with a new retinoid. *Dermatologica.* 1978; 157: 238–244.
6. Reich A, Heisig M, Phan NQ, et al. Visual analogue scale: evaluation of the instrument for the assessment of pruritus. *Acta Derm Venereol.* 2012; 92: 497–501.
7. Steinhoff M, Neisius U, Ikoma A, et al. Proteinase-activated receptor-2 mediates itch: a novel pathway for pruritus in human skin. *J Neurosci.* 2003; 23: 6176–6180.
8. Kupczyk P, Reich A, Hołysz M, et al. Opioid receptors in psoriatic skin: relationship with itch. *Acta Derm Venereol.* 2017; 97: 564–570.
9. Zhu Y, Pan WH, Wang XR, et al. Tryptase and protease-activated receptor-2 stimulate scratching behavior in a murine model of ovalbumin-induced atopic-like dermatitis. *Int Immunopharmacol.* 2015; 28: 507–512.