

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: łuszczycza, 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.

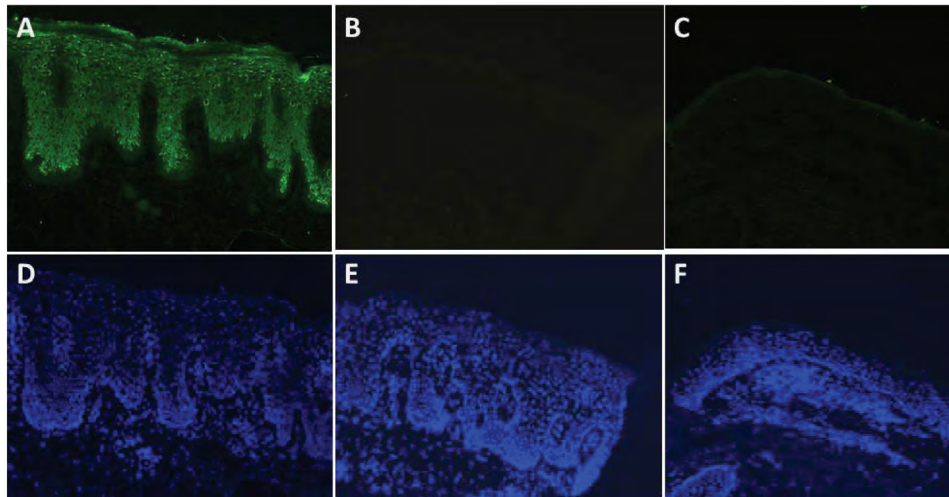
MATERIAŁ I METODY

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

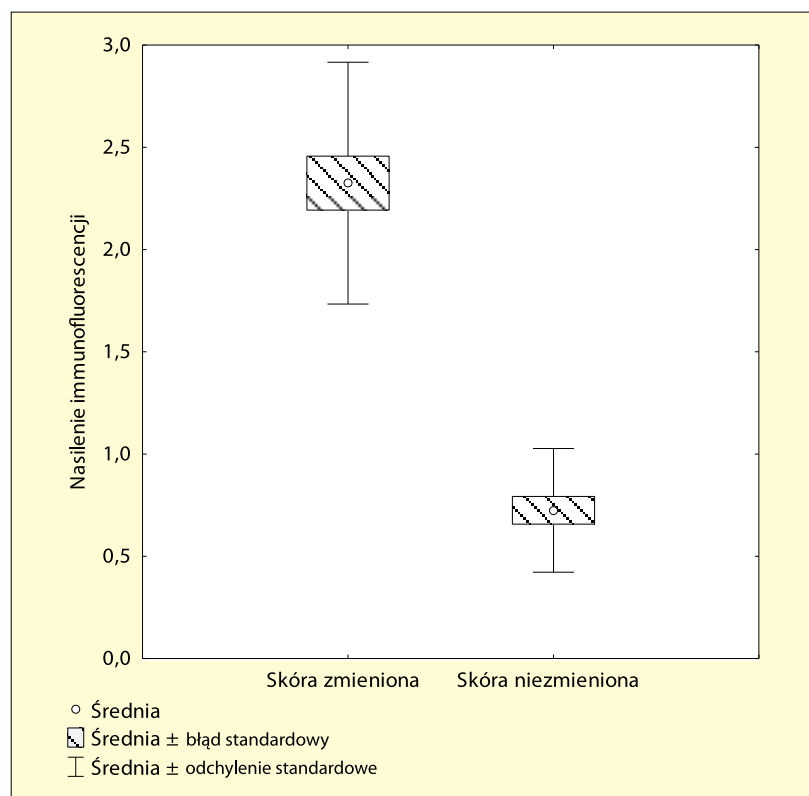
Nasilenie łuszczy i towarzyszącego jej świądu

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*-opioidowych [8]. Obecne wyniki sugerują jednak, że układ opioidowy 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.