

# Badanie aktywności wybranych proteaz lizosomalnych płytek krwi u chorych na atopowe zapalenie skóry

## Examination of the activity of chosen blood platelets lysosomal proteases in atopic dermatitis patients

ALEKSANDRA KASZUBA, JACEK PERLIŃSKI, MAGDALENA KOZŁOWSKA,  
JULITA ZACZYŃSKA-JANECZKO, AGATA KUSIBA-CHARAZIAK, ANDRZEJ KASZUBA

Klinika Dermatologii i Dermatologii Dziecięcej II Katedry Dermatologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi,  
kierownik prof. dr hab. med. Andrzej Kaszuba

### Abstract

*In this study the activity of lysosomal hydrolases of blood platelets was analyzed. Cathepsin G, B, D and thiolic cathepsins were designated. The results of the investigations were statistically estimated. 67 patients with atopic dermatitis and healthy controls were examined. They were divided into two groups depending on the severity degree of the symptoms of atopic dermatitis (SCORAD). The study of the enzymatic activity in both groups differed significantly. In patients with significant degree of intensification of the disease process (SCORAD above 40) the decrease in cathepsin G was observed, together with the increase in activity of cathepsins D and B. The activity of those enzymes may determine the degree of the severity of atopic dermatitis. It is suggested that the defect in the process of synthesis and activation of lysosomal enzymes may be one of the reasons of the onset and development of atopic dermatitis.*

*Despite of multidirectional research of atopic dermatitis, the etiopathogenesis has not been revealed so far. Until recently we have emphasized the role of hydrolytic lysosome enzymes and platelets in the course of chronic inflammatory processes to which atopic dermatitis also belongs. In the contemporary methods of atopic dermatitis treatment mechanisms associated with stabilization of lysosomal membranes of the platelets should be taken into consideration.*

**Key words:** atopic dermatitis, blood platelets, proteases.

### Streszczenie

*W pracy prześledzono aktywność hydrolaz lizosomalnych płytek krwi. Oznaczano katepsynę G, B, D oraz katepsyny tiolowe.*

*Wyniki badań poddano ocenie statystycznej. Przebada-  
no 67 chorych na AZS i 30 osób klinicznie zdrowych. Pacjen-  
tów podzielono na 2 grupy, w zależności od nasilenia obja-  
wów klinicznych (SCORAD). Badane aktywności enzyma-  
tyczne w obu grupach różniły się znamienne statystycznie.  
U chorych ze znacznym stopniem nasilenia procesu choro-  
bowego (SCORAD powyżej 40) charakterystyczny był spa-  
dek katepsyny G z jednocześnie obserwowanym wzrostem ak-  
tywności katepsyny D i B. Aktywność tych enzymów może  
stanowić wskaźnik stopnia ciężkości AZS. Sugeruje się, że  
defekt procesu syntezy i aktywacji enzymów lizosomalnych  
może być jedną z przyczyn powstawania i rozwoju AZS.*

*Etiopatogeneza atopowego zapalenia skóry, pomimo wie-  
lokierunkowych badań, nie została dotychczas wyjaśniona.  
W wielu badaniach podkreśla się rolę lizosomalnych enzy-  
mów hydrolitycznych płytek krwi w przebiegu przewlekłych  
procesów zapalnych, do których należy także AZS. Współ-  
czesne metody leczenia AZS powinny uwzględniać mechani-  
zmy związane ze stabilizacją błon lizosomalnych płytek krwi.*

**Słowa kluczowe:** atopowe zapalenie skóry, płytki krwi,  
proteazy.

(PDiA 2004; XXI, 4: 190–199)

Adres do korespondencji: prof. dr hab. med. Andrzej Kaszuba, Klinika Dermatologii i Dermatologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, ul. Kniaziewiczza 1/5, 91-347 Łódź, tel./faks: +48 42 651 10 72, e-mail: dermatol@achilles.wam.lodz.pl

Mimo długotrwałych i wielokierunkowych badań patogeneza atopowego zapalenia skóry (AZS) nie została dotychczas do końca poznana i jest przedmiotem licznych kontrowersji [1]. Od wielu lat sugeruje się genetyczne tło choroby – jednak w chwili obecnej przyjmuje się, że w AZS – oprócz uwarunkowania genetycznego – największą rolę odgrywają zaburzenia układu immunologicznego, zarówno w zakresie odpowiedzi humoralnej (I typ reakcji alergicznej), jak i komórkowej (IV typ reakcji alergicznej) często współwystępujące z mechanizmami niealergicznymi [2]. Rola specyficznych alergenów w patogenezie AZS pozostaje kontrowersyjna, aczkolwiek wielu autorów zwraca uwagę na znaczenie antygenów powietrzno pochodnych i pokarmowych w rozwoju i zaostrzaniu zmian skórnych w przebiegu tej choroby [3].

Płytki jako element morfotyczny krwi biorą czynny udział w licznych procesach homeostazy organizmu. Wiele czynników egzo- i endogennych może mieć wpływ na ich aktywność metaboliczną [4–9].

Od kilkudziesięciu lat prowadzone są badania, mające udowodnić związek niektórych chorób, zwłaszcza przewlekłych procesów zapalnych, ze szczególnym uwzględnieniem schorzeń z kręgu atopii, z aktywnością niektórych enzymów lizosomalnych. Ważną rolę w procesach zapalnych w przebiegu atopowego zapalenia skóry odgrywają enzymy hydrolityczne, uwalniane z lizosomów płytek krwi [10–15].

W AZS skupiano się głównie na obserwacjach dotyczących granulocytów obojętnochłonnych, stwierdzając w wielu badaniach zmniejszenie aktywności fosfatazy kwaśnej oraz  $\beta$ -glukuronidazy, produkowanych w lizosomach tych komórek (także u rodziców pacjentów, u których nie stwierdzono objawów klinicznych). Faktem tym tłumaczy się osłabienie odporności na infekcje u chorych na AZS. Ponadto w pojedynczych badaniach stwierdzano wzrost  $\beta$ -glukuronidazy w monocytach oraz obniżenie aktywności fosfatazy kwaśnej w limfocytach [14, 16, 17].

W płytkach krwi istotną aktywność enzymatyczną obserwuje się w lizosomach. Są to ciała elektronowo gęste, znajdujące się wewnątrz komórek, gdzie spełniają głównie funkcję trawienną. Badania ostatnich lat wykazały szerszy udział tych organelli w innych ważnych procesach życiowych. Czynność lizosomów jest bardzo złożona, stanowią one wewnątrzkomórkowy układ trawieny prawie wszystkich komórek, umożliwiając wykorzystanie własnych składników do procesów metabolicznych. W lizosomach stwierdzono ok. 60 enzymów hydrolitycznych, aktywnie działających, głównie w środowisku kwaśnym. Są to hydrolazy estrów karboksylowych i tiolowych, enzymy działające na wiązania zawierające fosfor, esterazy siarczanowe, glikozydazy, peptydazy i amidazy. Niektóre z nich (fosfataza kwaśna,

$\beta$ -glukuronidaza, esteraza tiooctanowa i N-acetyloglikozaminidaza stały się wyznacznikami tych struktur [18, 19].

W dostępnym piśmiennictwie nie udało się znaleźć jakichkolwiek doniesień o badaniach enzymów lizosomalnych w płytkach krwi u pacjentów z AZS.

Wiele z leków stosowanych w terapii AZS wpływa na proces uwalniania enzymów z lizosomów komórek, których udział w patogenezie AZS został udowodniony. Poszukiwanie nowych metod leczniczych jest nadal wielkim wyzwaniem w dermatologii, a być może wykrycie innych aspektów patogenetycznych AZS stworzy możliwość skuteczniejszego leczenia.

Celem niniejszej pracy jest prześledzenie aktywności hydrolaz lizosomalnych płytek krwi u chorych na atopowe zapalenie skóry o różnym stopniu nasilenia choroby.

## Cele pracy

1. Oznaczenie aktywności wybranych enzymów lizosomalnych płytek krwi chorych na AZS oraz w grupie osób zdrowych: katepsyny G, katepsyny D, katepsyny B, katepsyn tiolowych.
2. Ocena zależności uzyskanych wyników badań laboratoryjnych od stopnia nasilenia procesu chorobowego wg skali SCORAD.

## Materiał i metodyka

### Dobór chorych

Badaniem objęto 97 osób, w tym:

- 1) grupę odniesienia (O) stanowiło 30 osób klinicznie zdrowych w tym: 16 kobiet w wieku 17–44 lat  $\bar{X}=28,88$  (6,47 lat) oraz 14 mężczyzn w wieku 18–42 lat  $\bar{X}=30,27$  (7,21) (tab. 1., 1a.).
- 2) grupę badaną (B) stanowiło 67 osób z atopowym zapaleniem skóry, w tym 37 kobiet w wieku 16–43 lat  $\bar{X}=27,99$  (5,99) i 30 mężczyzn w wieku 18–40 lat  $\bar{X}=28,87$  (7,11) (tab. 1., 1a.). Grupa badana i grupa odniesienia miały podobną strukturę co do wieku i płci.

Do badań kwalifikowano osoby z aktywnym procesem chorobowym. Warunkiem rozpoznania AZS u każdego chorego było spełnienie przynajmniej 3 głównych cech wg kryteriów Hanifina i Rajki. Przy wątpliwościach klinicznych nie były rozpatrywane cechy mniejsze i tacy chorzy nie zostali zakwalifikowani do badania.

Osoby, od których został pobrany materiał do badań laboratoryjnych nie stosowały w ciągu ostatnich 3 mies. leczenia ogólnego. Dopuszczono jedynie stosowanie diet eliminacyjnych i leczenie pielęgnacyjne oraz dodatkowo miejscowe stosowanie preparatów glikokortykosteroidowych na powierzchnię skóry, nie przekraczające 10% ogólnej powierzchni u chorych z ciężkim stanem klinicznym.

Stopień nasilenia AZS oceniano wg skali SCORAD.

Tab. 1. Materiał badany

Grupa osobowa	Rozpoznanie	Płeć	Liczebność		Wiek – lata			
			N	%	minimum- -maksimum	Me	$\bar{X}$	SD
odniesienia (O)	osoby klinicznie zdrowe	K	16	53,33	17–44	37	28,88	6,47
		M	14	46,67	18–42	21	30,27	7,21
		razem	30	100	17–44	40	29,44	6,19
badana (B)	atopowe zapalenie skóry	K	37	55,22	16–43	32	27,99	5,99
		M	30	44,78	18–40	29	28,87	7,11
		razem	67	100	16–43	33	28,14	6,91
RAZEM		K+M	97		16–44	31	28,90	7,06

Tab. 1a. Materiał badany – analiza statystyczna wyników

Wiek – lata		test t-Studenta dla prób niezależnych	
porównywane grupy osobowe		wartość testu	poziom znamienności różnic
O:K vs M		t=-1,07	p>0,05
B:K vs M		t=-0,71	p>0,05
O vs B	K	t=1,02	p>0,05
	M	t=1,47	p>0,05
	razem	t=1,27	p>0,05

Przyjmując za kryterium stopień nasilenia procesu chorobowego pacjentów podzielono na 2 grupy:

- grupę I stanowiło 35 osób, w tym 20 kobiet i 15 mężczyzn z lekkim lub średnim stanem klinicznym, czyli do 40 punktów w skali SCORAD,
- grupę II stanowiły 32 osoby, w tym 17 kobiet i 15 mężczyzn z ciężkim stanem klinicznym, czyli powyżej 40 punktów w skali SCORAD (tab. 2.).

Wszyscy ochotnicy zostali poinformowani o celu i zakresie badania i wyrazili na nie dobrowolną zgodę.

## Metody laboratoryjne

### Uzyskiwanie materiału do badań

Krew do badań pobierano w godzinach rannych (7.00–8.00) z żyły łokciowej w ilości ok. 20 ml do probówek polietylenowych z dodatkiem 1% EDTA w 0,14 M NaCl o pH 7,4 w stosunku 1 objętości antykoagulanu na 9 objętości krwi.

### Otrzymywanie krwinek płytkowych

Krwinki płytkowe otrzymywano metodą frakcjonowanego wirowania w temperaturze pokojowej przy

1 000 obr./min przez 10 min. W wyniku wirowania z pełnej krwi otrzymywano osocze bogatopłytkowe (PRP), które ściągano plastikową pipetką ostrożnie z warstwy osadzonych krwinek czerwonych i przenoszono do probówek polietylenowych.

Następnie ponownie je wirowano przy 2 500 obr./min przez 20 min.

Osad krwinek płytkowych zawieszano w buforze o składzie 0,14 M NaCl, 0,01 M Tris – HCl pH 7,4, 0,005 M glukoza i 0,001 M EDTA. Liczbę uzyskanych krwinek płytkowych liczono w komorze Bürkera i oznaczano ich hematokryt. Mikroskopowo oceniano również stopień zanieczyszczenia uzyskanego osadu krwinek innymi elementami morfotycznymi pełnej krwi. Nie przekraczał on 0,01% [20].

## Oznaczanie aktywności proteaz lizosomalnych

### Katepsyna G E.C.3.4.21.20 [21]

Substratem jest ester aminokwasowy -2-naftolu, benzoilo-fenylalanylo-2-naftolo ester (Sigma) (5 mg na 1 ml DMSO). Działaniem enzymu zostaje uwolniony 2-naftol, który z solą dwuazoniową daje barwny produkt o maksimum pochłaniania przy  $E_{520}$  nm.

### Katepsyna D E.C.3.4.23.5 [21]

Proteazy rozkładają azokazeinę przy różnych wartościach pH.

Uwalniane azopeptydy są rozpuszczalne w TCA w przeciwieństwie do nierozłożonej azokazeiny. Badanie wykonywano przy użyciu substratu, jakim była 2% azokazeina (Sigma) w buforze octanowym.

### Proteazy tiolowe E.C.3.4.22.15 [21]

Metodyka oznaczeń jak w przypadku katepsyny D.

### Katepsyna B E.C.3.4.22.1 [22]

Katepsyna B oraz H rozkłada benzoilo-DL-arginilo-p-nitroanilinę, która w środowisku zasadowym posiada

intensywne zabarwienie żółte przy 405 nm. Substratem był: 20 mM BAPNA (N-alfa-Benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide) (Sigma) w DMSO.

Wyniki aktywności enzymów podawano w U/mg białka. Białko w badanym materiale oznaczano metodą Lowry'ego [23].

### Opracowanie statystyczne wyników

Analizę statystyczną uzyskanego materiału faktograficznego prowadzono w następujących grupach – wg schematów:

- Porównanie wieku osób z grupy odniesienia i grupy badanej; test t-Studenta dla prób niezależnych (wyniki spełniały cechy rozkładu normalnego) [24]. Porównywano wg schematu:
  - O:K vs M
  - B:K vs M
  - O vs B:K
  - O vs B:M
  - O vs B: razem.
- Ocena stopnia nasilenia procesu chorobowego wg skali SCORAD: opisowa analiza logiczna.
- Ocena porównawcza aktywności badanych enzymów u osób z grupy odniesienia i badanej; test U Manna-Whitney'a (wyniki nie spełniały cech rozkładu normalnego). Porównywano wg schematu:
  - O:K vs M
  - B:K vs M
  - O vs B:K
  - O vs B:M
  - O vs B: razem.
- Grupa badana – porównanie aktywności badanych enzymów w odniesieniu do wartości wskaźnika SCORAD  $40 \leq vs \leq 40$ : test U Manna-Whitney'a [24] (wyniki nie spełniały cech rozkładu normalnego). Porównywano wg schematu:
  - B:40 SCORAD  $\leq vs \leq 40$  SCORAD:M
  - B:40 SCORAD  $\leq vs \leq 40$  SCORAD:K
  - B:40 SCORAD  $\leq vs \leq 40$  SCORAD: razem.
- W ocenie znamienności statystycznej różnic przyjęto:
  - $p < 0,05$  – różnica znamienna
  - $p < 0,01$  – różnica znamienna
  - $p < 0,005$  – różnica wysoce znamienna
  - $p < 0,001$  – różnica wysoce znamienna

### Wyniki badań

#### Badania kliniczne

W grupie badanej, wartość wskaźnika SCORAD do 40 punktów dotyczyła 52,24% chorych, a wartość powyżej 40 punktów – 47,76% chorych; w obydwu przy-

**Tab. 2. Badanie kliniczne: stopień nasilenia procesu chorobowego AZS wg skali SCORAD**

Grupa osobowa	Stopień ciężkości choroby	Płeć	Liczebność	
			N	%
atopowe zapalenie skóry	SCORAD do 40 punktów	K	20	29,85
		M	15	22,39
		razem	35	52,24
	SCORAD powyżej 40 punktów	K	17	25,37
		M	15	22,39
		razem	32	47,76
RAZEM			67	100

padkach bez znaczących różnic pomiędzy kobietami i mężczyznami (tab. 2.).

#### Badania laboratoryjne

W grupie odniesienia, u kobiet w porównaniu do mężczyzn, aktywność katepsyny G była znamiennie ( $p < 0,05$ ) niższa, w grupie badanej – znamiennie ( $p < 0,05$ ) wyższa.

W grupie badanej – w porównaniu do grupy odniesienia – aktywność katepsyny G u kobiet była znamiennie ( $p < 0,05$ ) wyższa, natomiast u mężczyzn i w całych grupach osobowych bez różnic istotnych (ryc. 1.).

W grupie badanej – w porównaniu do grupy odniesienia – zarówno u kobiet, mężczyzn, jak i w całych grupach osobowych, aktywność katepsyny D nie wykazywała różnic istotnych (ryc. 2.).

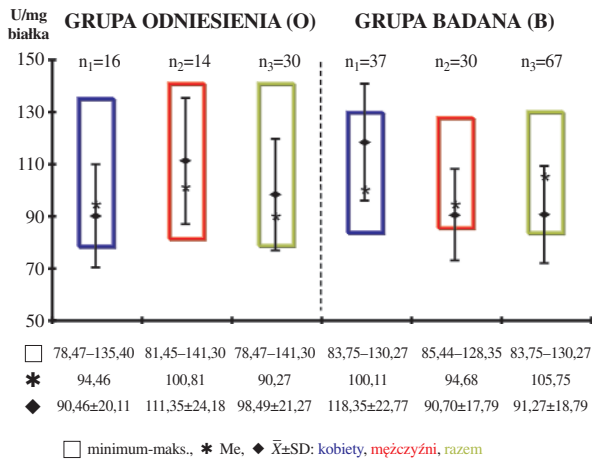
U kobiet, w porównaniu do mężczyzn, aktywność katepsyny B w grupie badanej była znamiennie ( $p < 0,05$ ) niższa, w grupie odniesienia – bez różnic znamiennych.

W grupie badanej, w porównaniu do grupy odniesienia, aktywność katepsyny B u kobiet była znamiennie ( $p < 0,05$ ) niższa, u mężczyzn – znamiennie ( $p < 0,05$ ) wyższa, w całych grupach osobowych – bez różnicy istotnej (ryc. 3.).

W grupie badanej, w porównaniu do grupy odniesienia, aktywność katepsyn tiolowych u kobiet, mężczyzn, jak i w całej grupie osobowej nie wykazywała różnic znamiennych (ryc. 4.).

#### Analiza zależności wyników badań laboratoryjnych od wyników badań klinicznych

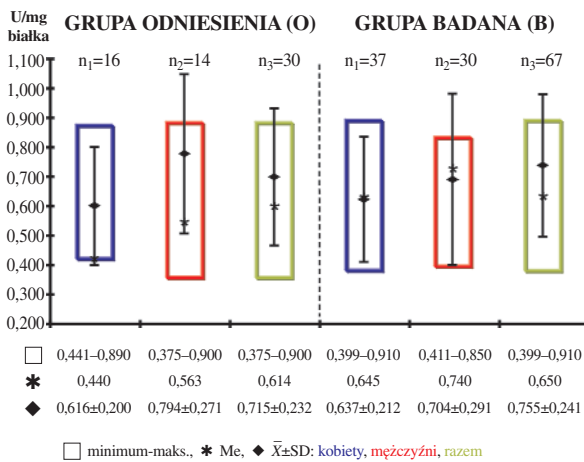
Aktywność katepsyny G u kobiet z wartością wskaźnika SCORAD powyżej 40, w porównaniu do kobiet z wartością wskaźnika SCORAD poniżej 40, była znamiennie ( $p < 0,05$ ) niższa; u mężczyzn nie wykazywała różnicy istotnej. Aktywność katepsyny G w całej grupie chorych ze wskaźnikiem SCORAD powyżej 40, w porówna-



Ryc. 1. Badania laboratoryjne: aktywność katepsyny G

Analiza statystyczna wyników

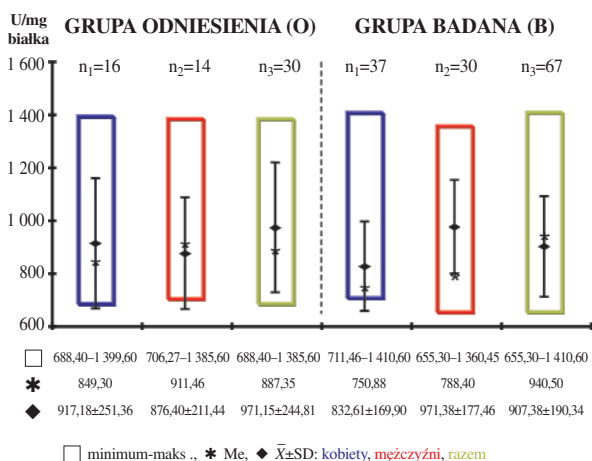
Aktywność katepsyny G – wartości liczbowe			
porównywane grupy	test U Manna-Whitney'a		
	wartość testu	poziom znaczeniowości różnic	
O:K vs M	U=-3,16	p<0,05	
B:K vs M	U=3,01	p<0,05	
O vs B	K	U=3,41	p<0,05
	M	U=2,61	p>0,05
	razem	Z=2,11	p>0,05



Ryc. 2. Badania laboratoryjne: aktywność katepsyny D

Analiza statystyczna wyników

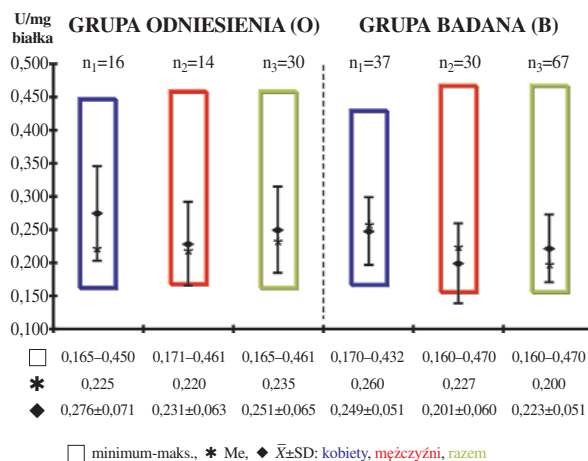
Aktywność katepsyny D – wartości liczbowe			
porównywane grupy	test U Manna-Whitney'a		
	wartość testu	poziom znaczeniowości różnic	
O:K vs M	U=-2,44	p>0,05	
B:K vs M	U=-2,01	p>0,05	
O vs B	K	U=-0,66	p>0,05
	M	U=-0,78	p>0,05
	razem	Z=-0,81	p>0,05



Ryc. 3. Badania laboratoryjne: aktywność katepsyny B

Analiza statystyczna wyników

Aktywność katepsyny B – wartości liczbowe			
porównywane grupy	test U Manna-Whitney'a		
	wartość testu	poziom znaczeniowości różnic	
O:K vs M	U=1,08	p>0,05	
B:K vs M	U=-3,11	p<0,05	
O vs B	K	U=3,21	p<0,05
	M	U=-3,44	p<0,05
	razem	Z=2,11	p>0,05

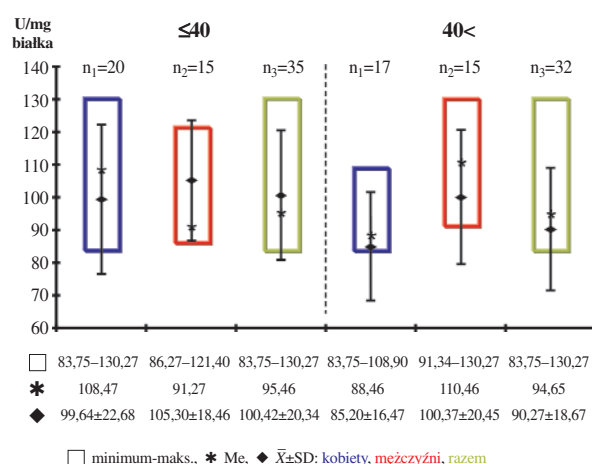


Ryc. 4. Badania laboratoryjne: aktywność katepsyn tiolowych

niu do całej grupy chorych ze wskaźnikiem SCORAD poniżej 40, była znacząco (p<0,05) niższa (ryc. 5.).

Aktywność katepsyny D u kobiet z wartością wskaźnika SCORAD powyżej 40, w porównaniu do kobiet z wartością wskaźnika SCORAD poniżej 40, była znacząco (p<0,05) wyższa; u mężczyzn – bez różnic istotnych. Aktywność katepsyny D w całej grupie osobowej z wartością wskaźnika SCORAD powyżej 40 w porównaniu do całej grupy chorych z wartością wskaźnika SCORAD poniżej 40, była znacząco (p<0,01) wyższa (ryc. 6.).

Aktywność katepsyny B u chorych z wartością wskaźnika SCORAD powyżej 40, w porównaniu do chorych z wartością wskaźnika SCORAD poniżej 40, u kobiet i w całej grupie była znacząco (p<0,05) wyższa, natomiast u mężczyzn znacząco (p<0,05) niższa (ryc. 7.).



Ryc. 5. Grupa badana – analiza zależności wyników badań laboratoryjnych od wyników badań klinicznych: aktywność katepsyny G a stopień nasilenia procesu chorobowego wg skali SCORAD

#### Analiza statystyczna wyników

Aktywność katepsyn tiolowych – wartości liczbowe			
porównywane grupy	test U Manna-Whitney'a		
	wartość testu	poziom znaczącości różnic	
O:K vs M	U=1,88	p>0,05	
B:K vs M	U=-2,11	p>0,05	
O vs B	K	U=1,46	p>0,05
	M	U=2,03	p>0,05
razem	Z=1,94	p>0,05	

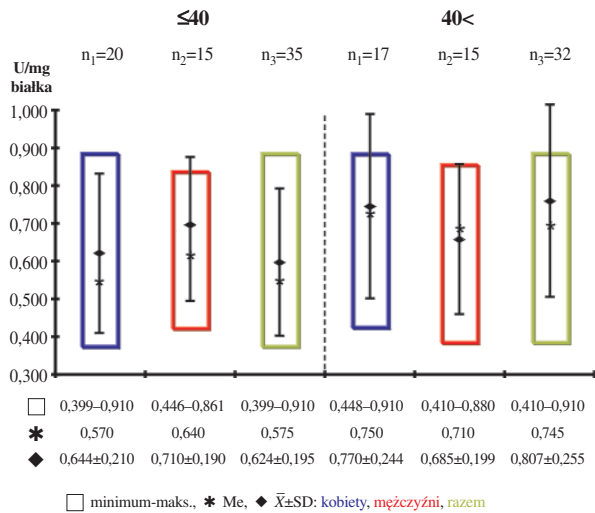
Aktywność katepsyn tiolowych w grupie osób z wartością wskaźnika SCORAD powyżej 40, w porównaniu do chorych z wartością wskaźnika SCORAD poniżej 40 (oddzielnie kobiet, mężczyzn i w całych grupach osobowych) nie wykazywała różnic znaczących (ryc. 8.).

#### Omówienie wyników

W ostatnim czasie coraz częściej przedmiotem licznych badań jest udział płytek krwi w wielu procesach immunologicznych ustroju, zwłaszcza o charakterze przewlekłym. Z dotychczasowych badań wynika, że aktywność trombocytów w przebiegu AZS jest bezsporna. W procesie alergicznego zapalenia płytki krwi są aktywowane przez szereg mediatorów: PAF, serotoninę,

#### Analiza statystyczna wyników

Aktywność katepsyny G – wartości liczbowe			
porównywane grupy	test U Manna-Whitney'a		
	wartość testu	poziom znaczącości różnic	
SCORAD: ≤40 vs <40	K	U=3,41	p<0,05
	M	U=1,34	p>0,05
razem	Z=3,22	p<0,05	



**Analiza statystyczna wyników**

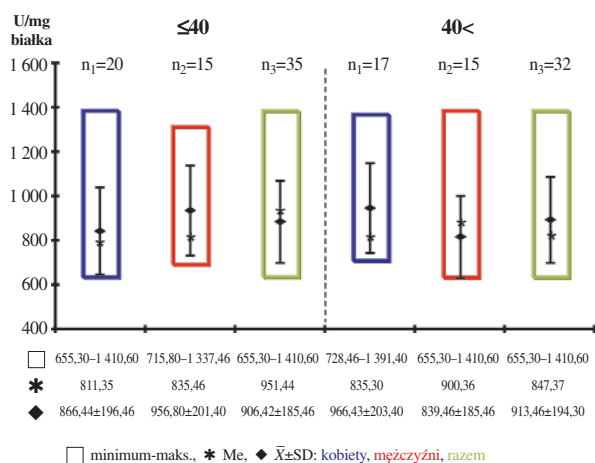
Aktywność katepsyny D – wartości liczbowe			
porównywane grupy		test U Manna-Whitney'a	
		wartość testu	poziom znaczeniowości różnic
SCORAD: ≤40 VS <40	K	U=-3,49	p<0,05
	M	U=1,05	p>0,05
	razem	Z=4,06	p<0,01

**Ryc. 6. Grupa badana – analiza zależności wyników badań laboratoryjnych od wyników badań klinicznych: aktywność katepsyny D a stopień nasilenia procesu chorobowego wg skali SCORAD**

MBP, MPO, trombinę [25, 26]. Ponadto zauważono, że są one dodatkowo pobudzane przez cząstki IgE, reagujące ze znajdującym się na ich powierzchni receptorem Fcε(RII [27]. W wyniku tych procesów trombocyty ulegają wzmoczonej agregacji, uwalniają wolne rodniki, a także wydzielają szereg enzymów. I tak stwierdzono wzmoczoną czynność wydzielniczą w pobudzonych płytkach, m.in. z ziarnistości zbitych (histamina, serotonina), czy też ziaren α (PF4, selektyna P) [5, 28]. W dotychczas opublikowanych pracach nie udało się odszukać jakichkolwiek doniesień dotyczących sekrecji enzymów z lizosomów płytek krwi, mimo że uwalniane

enzymy lizosomalne są ważnym wskaźnikiem aktywności biologicznej komórki w przewlekłym zapalnym procesie chorobowym [29].

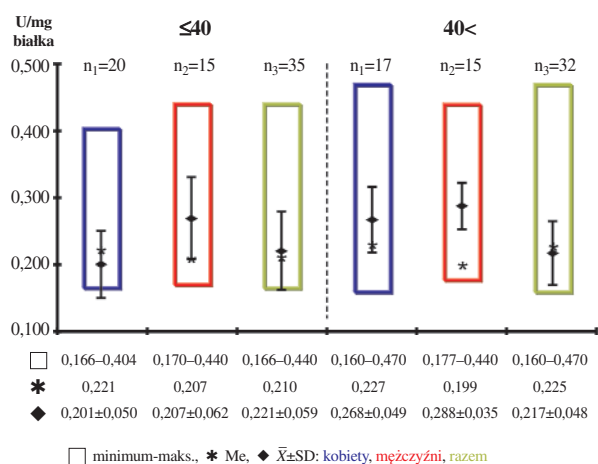
W warunkach fizjologicznych hydrolazy i proteazy utrzymywane są w stanie spoczynku, zamknięte strukturami błonowymi lizosomów, stanowią tym samym potężny ładunek enzymatyczny. Wszelkie procesy powodujące rozpad komórki lub jej uaktywnienie destabilizują błony lizosomalne, powodując uwolnienie i uaktywnienie nagromadzonych enzymów do wnętrza komórki i poza struktury komórkowe; w ten sposób rozpoczynają kaskadę procesów biochemicznych.



**Analiza statystyczna wyników**

Aktywność katepsyny B – wartości liczbowe			
porównywane grupy		test U Manna-Whitney'a	
		wartość testu	poziom znaczeniowości różnic
SCORAD: ≤40 VS <40	K	U=-3,14	p<0,05
	M	U=3,28	p<0,05
	razem	Z=-3,99	p<0,05

**Ryc. 7. Grupa badana – analiza zależności wyników badań laboratoryjnych od wyników badań klinicznych: aktywność katepsyny B a stopień nasilenia procesu chorobowego wg skali SCORAD**



### Analiza statystyczna wyników

Aktywność katepsyn tiolowych – wartości liczbowe			
porównywane grupy		test U Manna-Whitney'a	
		wartość testu	poziom znaczeniowości różnic
SCORAD: ≤40 VS 40<	K	U=-0,99	p>0,05
	M	U=0,77	p>0,05
	razem	Z=0,11	p>0,05

Ryc. 8. Grupa badana – analiza zależności wyników badań laboratoryjnych od wyników badań klinicznych: aktywność katepsyn tiolowych a stopień nasilenia procesu chorobowego wg skali SCORAD

Wśród zbadanych enzymów obserwuje się znamieny statystycznie spadek poziomów katepsyny D (u kobiet) w stosunku do odpowiedniej grupy odniesienia.

Wyniki potwierdzają, że płytki krwi odgrywają rolę w patogenezie AZS, co jest zgodne z wieloma wcześniejszymi badaniami, udowadniającymi udział trombocytów w nasileniu procesu zapalnego, odpowiedzialnego za występowanie objawów atopowego zapalenia skóry [27, 30–37]. Gdyby aktywność wszystkich zbadanych enzymów utrzymywała się na niezmiennym statystycznie poziomie, można by zastanawiać się, czy procesy ustrojowe inicjowane lub kontynuowane przez płytki krwi stanowią znaczący czynnik patogenetyczny AZS.

Zmiany aktywności enzymatycznej lizosomów, która ulega nasileniu u chorych z bardziej zaawansowanym procesem chorobowym, wskazują jednocześnie na udział enzymów produkowanych przez te organelle w przebiegu AZS.

Z rezultatów badań własnych trudno jednakże wyciągnąć oczywiste wnioski, tym bardziej, że nie można posiłkować się wynikami doświadczeń innych autorów dotyczących tego lub zbliżonych zagadnień. Należy więc rozważyć dwie różniące się hipotezy:

• jedną z przyczyn powstawania i rozwoju AZS może być pierwotny defekt procesu syntezy i aktywacji enzymów lizosomalnych w płytkach krwi;

**lub:**

• obniżenie aktywności N-acetyloglikozaminidazy, β-glukuronidazy lizozymu i kwaśnej fosfatazy w lizosomach płytek krwi u chorych na AZS jest związane z labilizacją błon lizosomalnych i nadmiernym uwalnianiem tych enzymów do wnętrza trombocyty, a następnie poza komórkę (wprost proporcjonalnie do stopnia nasilenia procesu chorobowego) oraz z angażowaniem

tych enzymów w wiele procesów biologicznych i *zużyciu* lizosomalnych zapasów badanych enzymów.

Interesującym zagadnieniem są statystycznie znamienne: wzrost aktywności katepsyny G w płytkach pobranych od chorych kobiet oraz wzrost aktywności katepsyny B u chorych mężczyzn w stosunku do grup odniesienia. Interpretacja tego zjawiska nie jest jednoznaczna. Porównując aktywność tych enzymów u chorych z wartością wskaźnika SCORAD powyżej 40 w stosunku do osób z wartością wskaźnika poniżej 40 okazuje się, że zarówno katepsyna G u kobiet, jak i katepsyna B u mężczyzn z bardziej zaawansowanym procesem chorobowym osiągają wartości znamienne niższe. Można zatem przypuszczać, że katepsyny G i B z lizosomów płytek krwi rozpoczynają swój udział w procesie chorobowym nieco później w stosunku do enzymów znacznikowych. Dlatego u chorych z mniejszym nasileniem choroby wykazują znamieny wzrost aktywności. Gdy już proces jest utrwalony i nasilony, może wtórnie dochodzić do *wyczerpania* enzymatycznego lizosomów płytkowych.

U chorych z dużym nasileniem procesu chorobowego, opisywanym wartościami wskaźnika SCORAD przekraczającymi 40, bardzo charakterystyczny jest spadek aktywności katepsyny G, z jednocześnie obserwowanym wzrostem aktywności katepsyny D i B. Wynika z tego, że poziomy wymienionych enzymów lizosomalnych w płytkach krwi mogą być wskaźnikami stopnia ciężkości atopowego zapalenia skóry.

Obserwowany wzrost aktywności niektórych enzymów lizosomalnych w płytkach (katepsyna G, D i B) wynikać może także z obecności u części chorych nie stwierdzonych w badaniu lekarskim utajonych infekcji, które mogą odgrywać znaczącą rolę w etiopatogenezie



AZS. Drobnoustroje mogą dodatkowo pobudzać proces syntezy i uwalniania enzymów lizosomalnych [38–41].

W przeprowadzonych badaniach zwracają uwagę, wspomniane już, charakterystyczne zmiany aktywności niektórych enzymów lizosomalnych, obserwowane u chorych w zależności od płci. I tak poziomy lizozymu, katepsyny G czy D zmiennie ulegają obniżeniu lub podwyższeniu jedynie w grupie badanych kobiet. W badaniach aktywności katepsyny B, zarówno u osób ze wskaźnikiem SCORAD poniżej, jak i powyżej 40, obserwowane wyniki w porównywalnych grupach kobiet i mężczyzn są odmiennie. Może to świadczyć o tym, że duży wpływ na wydzielanie i udział w procesach biologicznych niektórych enzymów mają hormony płciowe. Najnowsze badania Kiriyama i współpracowników udowadniają wyraźne zaostrożenie procesu chorobowego u 47% kobiet z AZS w tygodniu poprzedzającym menstruację [42–44].

Z przeprowadzonych badań własnych wynika, że stabilizacja błon lizosomalnych, powodowana czynnikami farmakologicznymi, może mieć duże znaczenie w kontrolowaniu choroby. Z jednej strony należy poszukiwać leków zmniejszających procesy i czynniki aktywujące płytki krwi, a więc związków blokujących wydzielanie lub wiązanie PAF, serotoniny czy innych agonistów trombocytarnych (np. stosowany wiele lat nedokromil sodu). Z drugiej strony należałoby doświadczać testować metody lecznicze, prowadzące bezpośrednio do stabilizacji błon lizosomalnych. Działanie takie mogłoby sprzyjać zmniejszeniu nasilenia stanu zapalnego, hamowaniu procesu uszkodzania naczyń, obniżaniu stopnia wykrzepiania, regulacji tworzenia związków typu kinin, czy unikaniu degradacji struktur błonowych. Środki farmakologiczne lub metody lecznicze, stabilizujące błony lizosomalne, mogłyby też wpływać na zwiększenie stanu odporności organizmu, zmniejszając zwłaszcza zapadalność na przewlekłe infekcje, bardzo często wikłające proces chorobowy, utrudniające leczenie i pogarszające rokowanie.

Przywracaniem stabilności błonom lizosomalnym można m.in. tłumaczyć skuteczność kliniczną uznanych leków, takich jak nedokromil sodu czy ketotifen, ale w tym procesie tkwi również nadzieja na lepsze efekty lecznicze substancji dopiero testowanych (np. ZK 118.182) [45–48].

W związku z brakiem możliwości porównania tych badań z innymi, bardziej szczegółowe i pewniejsze odpowiedzi na pytanie o rolę płytkowych enzymów lizosomalnych w patogenezie AZS mogą dać kolejne prace badawcze. I tak w kolejnych etapach, najlepiej u tych samych chorych, należałoby zbadać poziomy identycznych enzymów lizosomalnych, znajdujących się w stanie niezwiązany w surowicy krwi. Wskazaniem byłoby oczywiście monitorowanie wielkości badanych wartości, w zależności od stopnia nasilenia objawów chorobowych. Znamiennie podwyższona aktywność tych enzymów stanowiłaby potwierdzenie hipotezy o *wyczerpywaniu się* ich zapasów lizosomalnych w płytkach krwi w przebiegu choroby.

Wspominano już o konieczności wyodrębnienia wśród badanych chorych grupy z niewielkim nasileniem objawów chorobowych. Być może należałoby też zwrócić uwagę na fazę cyklu miesięczkowego badanych kobiet w dniu pobierania materiału.

Jednoczesne badania aktywności enzymów lizosomalnych płytek krwi rodziców chorych (oczywiście z założeniem niewystępowania u nich czynnych objawów klinicznych chorób z kręgu atopii) dałyby być może odpowiedź na pytanie: czy uszkodzenie cyklu przemian enzymatycznych w lizosomach trombocytów nie jest jedną z pierwotnych przyczyn występowania i zaostrzania się choroby (należałoby wtedy myśleć o jakimś defekcie genetycznym).

Reasumując, uzyskane wyniki badań potwierdzają udział płytek krwi w patogenezie AZS. Przewlekły i nasilony proces zapalny prowadzi do destabilizacji błon lizosomalnych i *ucieczki* wielu enzymów na zewnątrz błony komórkowej. To z kolei prawdopodobnie skutkuje wtórnym uszkodzeniem komórek i tkanek oraz zmniejszeniem odporności na infekcje. Jednocześnie okazuje się, że aktywność niektórych enzymów lizosomalnych w płytkach może służyć jako wskaźnik ciężkości choroby.

## Wnioski

1. W patogenezie atopowego zapalenia skóry ważną rolę odgrywają procesy związane z aktywnością enzymów lizosomalnych płytek krwi.
2. Przewlekły i nawrotowy charakter atopowego zapalenia skóry prowadzić może do *wyczerpania enzymatycznego* lizosomów płytkowych, o czym świadczy spadek aktywności niektórych badanych enzymów w płytkach krwi chorych.
3. Dla chorych ze znacznym stopniem nasilenia procesu chorobowego (SCORAD powyżej 40) charakterystyczny jest spadek katepsyny G z jednocześnie obserwowanym wzrostem aktywności katepsyny D i B. Aktywność tych enzymów może stanowić wskaźnik stopnia ciężkości AZS.
4. Współczesne metody leczenia atopowego zapalenia skóry powinny w większym stopniu uwzględniać mechanizmy związane ze stabilizacją błon lizosomalnych płytek krwi – komórek zaangażowanych w patogenezę procesu chorobowego.

## Piśmiennictwo

1. Ellis C, Luger T, Abeck D, et al.: International Consensus Conference on Atopic Dermatitis II (ICCAD II): clinical update and current treatment. *Br J Dermatol* 2003; 148, suppl. 63: 3-10.
2. Misery L: Atopic dermatitis and the nervous system. *J EADV* 2003; suppl. 3: 71.
3. Turjanmaa K.: New aspects of the atopy patch test. *J EADV* 2003; 17, suppl. 3: 36-37.
4. Taieb A, Labreze L, Stalder JF, et al.: Clinical validation of the SCORAD-index. *Eur J Dermatol* 1995; 5: 69.

5. Masini E, Di Bello MG, Raspanti S, et al.: The role of histamine in platelet aggregation by physiological and immunological stimuli. *Inflamm Res* 1998; 47: 211-20.
6. Joseph M, Tscopoulos A, Tonnel AB, et al.: Modulation by nedocromil sodium of immunologic and nonimmunologic activation of monocytes, macrophages, and platelets. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 92 (1 Pt 2): 165-70.
7. Spiegelberg H: Fc receptors for IgE and interleukin-4 induced IgE and IgG4 secretion. *J Invest Dermatol* 1990; 94: 49S-52S.
8. Looney RJ: Structure and function of human and mouse Fc gamma RII. Struktura i funkcja receptora Fc gamma RII u człowieka i myszy. *Blood Cells* 1993; 19 (2): 353-9.
9. Gropp U: Neurodermatitis endogenous eczema-atopic dermatitis-atopic eczema. *Kinderkrankenschwester* 1999; 18 (3): 91-95.
10. Astafieva NG: Platelet role in pathogenesis of atopic and nonimmunologic asthma. *Allergol Immunopathol (Madr)* 1990; 18: 19-26.
11. Seiberler S, Bugajska-Schretter A, Hufnagl P, et al.: Characterization of IgE-reactive autoantigens in atopic dermatitis. 1. Subcellular distribution and tissue-specific expression. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 120 (2): 108-16.
12. Hilger RA, Neuber K, König W: Conversion of leukotriene A4 by neutrophils and platelets from patients with atopic dermatitis. *Immunology* 1991; 74 (4): 689-95.
13. Koro O, Furutani K, Hide M, et al.: Chemical mediators in atopic dermatitis: involvement of leukotriene B4 released by a type I allergic reaction in the pathogenesis of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103 (4): 663-70.
14. Peciak B, Filipowska B, Gawlik R i wsp.: Leukotrieny cysteinylowe i ich prawdopodobny udział w patomechanizmie atopowego zapalenia skóry. *Przegl Dermatol* 1998; 85 (1): 65-71.
15. Kieć-Świerczyńska M, Prażanowski M, Skulimowska H: Zróżnicowanie rozpoznania alergicznego i nie-alergicznego zapalenia skóry mierzaniem poziomu kwasu fosforowego w granulocytach obojętnochłonnych i limfocytach krwi obwodowej. *Przegl Dermatol* 1990; 77: 102-6.
16. Peciak B, Tarnowski R, Gawlik R i wsp.: Uwalnianie leukotrienów cysteinylowych z izolowanych leukocytów krwi obwodowej chorych na atopowe zapalenie skóry. *Przegl Dermatol* 1999; 86 (6): 555-65.
17. Neuber K, Hilger RA, König W: Differential increase in 12-HETE release and CD29/CD49f expression of platelets from normal donors and from patients with atopic dermatitis by *Staphylococcus aureus*. *Int Arch Allergy Immunol* 1992; 98 (4): 339-42.
18. Kawiak J, Mirecka J, Olszewska M i wsp.: Podstawy cytofizjologii, Warszawa, 1985: 230-4.
19. Lombardo A, Caimi L, Marchesini S, et al.: Enzymes of lysosomal origin in human plasma and serum: assay conditions and parameters influencing the assay. *Clin Chim Acta* 1980; 22/108 (3): 337-46.
20. Wachowicz B, Buczyński A, Krajewski T i wsp.: Mikrometoda oznaczania nukleotydów adeninowych w krwinkach płytkowych krwi u człowieka. *Pol Tyg Lek* 1988; 7: 230-2.
21. Barret JNWM: The pathophysiology of psoriasis. *Lancet*, 1991; 338: 227-30.
22. Langner A, Wakil A, Zimmerman M, et al.: Aktivitätsbestimmung proteolytischer Enzyme mit Azokasein als substrat. *Acta Biol Med Germ* 1973; 31: 1-18.
23. Low'ry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-9.
24. Łomnicki A: Wprowadzenie do statystyki dla przyrodników. PWN, Warszawa, 2000.
25. Averill FJ, Hubbard WC, Proud D: Platelet activation in the lung after antigen challenge in a model of allergic asthma. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145: 571-6.
26. Knauer AA, Lichtenstein IM, Adkinson FN: Platelet activation during antigen-induced airway reaction in asthmatic subjects. *N Engl J Med* 1981; 204: 1404-6.
27. Joseph M, Capron A, Ameisen JC: The receptor for IgE on blood platelets. *Eur J Immunol* 1986; 16: 306-2.
28. Mannaioni PF, Palmerani B, Pistelli A, et al.: Histamine release by platelet aggregation. *Agents Actions* 1990; 30: 44-8.
29. Tchórzewski H: Zapalenie – patofizjologia i klinika. Medpress, Warszawa, 1998.
30. Del-Maschio A, Corvazier E, Maillet F, et al.: Platelet-dependent induction and amplification of polymorphonuclear leucocyte lysosomal enzyme release. *Br J Haematol* 1989; 72 (3): 329-35.
31. Kotlinowska T: Zaburzenia agregacji płytek w chorobach atopowych. *Pol Arch Med Wewn* 1982; 68: 141-7.
32. MacLough JA, Murphy RC: Transcellular metabolism of neutrophil-derived leukotriene A4 by human platelets. *J Biol Chem* 1988; 263: 174.
33. Randi ML, Rossi C, Fabris F, et al.: Atopic dermatitis and allergic diseases with thrombocytosis: a possible link. *Ann Allergy Asthma Immun* 1995; 75 (6 Pt 1): 530-2.
34. Ring J, Dorsch W: Altered releasability of vasoactive mediator secreting cells in atopic eczema. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)*, 1985; 114: 9-23.
35. Rossi EC: Platelets, thrombospondin, and atopic dermatitis (editorial, comment). *Allergy Proc* 1993; 14 (5), 357-361: 369-70.
36. Simon HU, Yousefi S, Weber M, et al.: Human peripheral blood eosinophils express and release interleukin-8. *Int Arch Allergy Immun* 1995; 107 (1-3): 124-6.
37. Zurier RB: Lysosomes and dermatology. *Int J Dermatol*, 1977; 16: 727-35.
38. Casolaro V, Georas SN, Song Z, et al.: Biology and genetics of atopic disease. *Curr Opin Immunol* 1996; 8: 796-803.
39. Jakóbsiak M: Immunologia. Warszawa, 1995.
40. Ruzicka T, Ring J: Enhanced releasability of prostaglandin E2 and leukotrienes B4 and C4 from leukocytes of patients with atopic eczema. *Acta Derm. Venereol (Stockh)* 1987; 73: 469.
41. Stingl G, Maurer D: IgE mediated allergen presentation via Fc epsilon R1 on antigen-presenting cells. *Int Arch Allergy Immunol* 1997; 113: 24-9.
42. Joseph M, Capron A, Thorel T, et al.: Nedocromil sodium inhibits IgE-dependent activation of rat macrophages and platelets as measured by schistosome killing, chemiluminescence and enzyme release. *Eur J Respir Dis Suppl* 1986; 147: 220-2.
43. Kiriya K, Sugiura H, Uehara M: Premenstrual Deterioration of Skin Symptoms in Female Patients with Atopic Dermatitis. *Dermatology. Int J Clin Invest Dermatol* 2003; 206 (2): 110-2.
44. Page CP, Sanyal S, Morley J: Platelet and asthma. *Lancet*, 1985; 346-7.
45. Crook M, Crawford N: Electrokinetic, analytical and functional heterogeneity of circulating human platelets: separation of subpopulations by continuous flow electrophoresis after taxol stabilization. *Biochim Biophys Acta* 1989; 30/1014 (1): 26-39.
46. Darius H, Michael-Hepp J, Thierauch KH, et al.: Inhibition of human platelets and polymorphonuclear neutrophils by the potent and metabolically stable prostaglandin D2 analog ZK 118.182. *Eur. J. Pharmacol.* 1994; 13/258 (3): 207-13.
47. Legieć C, Moszczyński P, Moszczyński PJ: Badania histochemiczne neutrofilów krwi obwodowej u chorych na atopowe zapalenie skóry. *Przegl Dermatol* 1986; (73) 4: 280-3.
48. Vashkinel VK: Ultrastrukturalnyje izmieniennija lizosomalnogo aparata trombocytov czeloveka w patologiczeskich sostojanijach. Ultrastructural changes in lysosomal apparatus of human platelets in pathologic states. *Gematol Transfuziol* 1992; 37 (3): 10-5.

*Praca finansowana przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi w ramach działalności statutowej Nr 503-519-1.*