

lek. Alicja Adaszewska

**Diagnostyka autoimmunizacyjnych chorób  
pęcherzowych skóry w oparciu o obraz kliniczny  
i nowoczesne metody immunologiczne**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu  
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: prof. dr hab. n. med. Cezary Kowalewski

Promotor pomocniczy: dr n. med. Agnieszka Kalińska-Bienias

Klinika Dermatologii i Immunodermatologii

Warszawski Uniwersytet Medyczny



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych

Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2020

## **Streszczenie**

### **Wprowadzenie**

Autoimmunizacyjne choroby pęcherzowe skóry (AICHP) stanowią istotny problem zdrowotny – zwłaszcza nieleczona pęcherzyca prowadzi do śmierci. Wdrożenie leków immunosupresyjnych i biologicznych do leczenia AICHP zmieniło ich rokowanie, a wczesna diagnostyka tych schorzeń pozwala na skuteczne leczenie. Podstawą diagnostyki AICHP są badania immunopatologiczne wycinków skórnych pobranych od chorych, uzupełnione o badania ich surowic różnymi technikami immunologicznymi, celem scharakteryzowania antygenów rozpoznawanych przez autoprzeciwciała. Surowice badane są klasycznie metodą immunofluorescencji pośredniej przy użyciu rozmaitych substratów tkankowych, metodą immunoblotu przy użyciu rozmaitych ekstraktów białkowych, naskórkowych skórnych czy komórkowych, a także metodą ELISA wobec rekombinowanych białek lub ich fragmentów zawierających epitopy, charakterystycznie rozpoznawane przez autoprzeciwciała. Diagnostyka laboratoryjna AICHP jest trudna, a obraz kliniczny chorób na etapie początkowym może być podobny, mimo odmiennego przebiegu i odpowiedzi na leczenie. Dlatego też zaczęto szukać nowych testów diagnostycznych ułatwiających i przyspieszających proces stawiania diagnozy. W ostatnim czasie opracowano metodę polegającą na wykonaniu pośredniej reakcji immunofluorescencyjnej na szkiełku zawierającym baterię substratów tkankowych oraz hodowli komórkowych HEK293, które na swojej powierzchni prezentują rekombinowane antygeny – tzw. BIOCHIP. Postępowanie to sprowadza się do zastosowania jednej metody badawczej – immunofluorescencji pośredniej, pozwalającej na jednoczesne wykrycie autoprzeciwciał i precyzyjne zbadanie na poziomie molekularnym rozpoznawanych przez nie antygenów.

### **Cel pracy**

Celem projektu jest ocena nowoczesnych testów diagnostycznych AICHP, w tym walidacja mozaiki BIOCHIP i porównanie jej do metod stosowanych w rutynowej diagnostyce pemfigoidu i pęcherzyca.

### **Material i metody badań**

Do badania zakwalifikowano 35 pacjentów z pęcherzycą oraz 51 pacjentów z pemfigoidem, którzy spełnili kryteria kliniczne i immunologiczne. W grupie pacjentów z pęcherzycą były to: obecność nadżerek na błonie śluzowej/skórce, obecność złogów IgG

i (lub) C3 o układzie międzykomórkowym w DIF, obecność przeciwciał krążących w badaniu IIF na przelyku małpy/przelyku świnki morskiej oraz dodatnie badanie metodą ELISA w kierunku anty-Dsg1 dla pęcherzycy liściastej i anty-Dsg3 dla pęcherzycy zwykłej. W grupie pacjentów z pemfigoidem były to: obecność pęcherzy z dobrze napiętą pokrywą, zmiany pokrzywkowate i świąd, obecność złogów IgG i (lub) C3 wzdłuż błony podstawnej w badaniu DIF oraz krążących przeciwciał, wykrytych za pomocą klasycznie wykonywanej IIF na splicie skórnym lub ELISA-BP180NC16a, lub ELISA-BP230. Wszyscy pacjenci znajdowali się w aktywnej fazie choroby: przed leczeniem, w trakcie pierwszego epizodu choroby lub nawrotu. Grupę kontrolną dla pacjentów z pęcherzycą stanowili pacjenci z pemfigoidem i na odwrót, dodatkowo wykorzystano surowicę czworga zdrowych ochotników. Badania wykonano w latach 2013-2018.

Od wszystkich pacjentów pobrano wycinki ze skóry pozornie zdrowej z okolicy zmian chorobowych do badania DIF za pomocą sztancy 4 mm w znieczuleniu chlorkiem etylu i niezwłocznie przetransportowano je w roztworze soli fizjologicznej do laboratorium. Do badań immunologicznych pobrano również po 5 cm<sup>3</sup> krwi obwodowej.

Badanie immunofluorescencji pośredniej na klasycznych substratach tkankowych wykonano dla grupy pacjentów z pęcherzycą na przelyku małpy oraz przelyku świnki morskiej, dla pacjentów z pemfigoidem – na przelyku małpy i splicie skórnym. Surowice chorych zostały rozcieńczone z PBS w proporcjach 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, a następnie inkubowane z substratem przez 30 minut. Po tym czasie szkiełka zostały poddane płukaniu PBS w celu usunięcia niezwiązanych przeciwciał i ponownie inkubowane z konjugatem (kozimi przeciwciałami skierowanymi przeciwko ludzkim immunoglobulinom klasy G znakowanym FITC) przez 30 minut. Po kolejnym płukaniu szkiełka zamknięto gliceryną i gotowe preparaty oglądano pod mikroskopem fluorescencyjnym. Za wynik dodatni uznawano w przypadku pęcherzycy immunofluorescencję o wzorze sieci rybackiej na przelyku małpy i (lub) przelyku świnki morskiej, w przypadku pemfigoidu – linijne świecenie wzdłuż błony podstawnej na przelyku małpy i (lub) linijne świecenie wzdłuż pokrywy pęcherza w splicie skórnym.

Przeciwciała przeciwko Dsg1, Dsg3, BP180NC16a oraz BP230 były wykrywane za pomocą komercyjnie dostępnych zestawów ELISA (Euroimmun), które wykorzystują rekombinowane antygeny. Badania przeprowadzono zgodnie z instrukcją producenta. Wyniki

zostały odczytane czytnikiem płytek ELISA KHB-ST 360. Za punkt odcięcia przyjęto 20RU/mL dla wszystkich antygenów.

Kolejnym etapem pracy było zbadanie surowic przy użyciu mozaiki BIOCHIP. Do tego celu wykorzystano dostępne komercyjnie zestawy *Dermatology Mosaic 7* (Euroimmun), składające się z: (a) przelyku małpy, (b) splitu skórnoego, (c) rekombinowanego antygeny BP180NC16a, (d) komórek HEK293 transfekowanych BP230, (e) komórek HEK293 transfekowanych Dsg1 i (f) komórek HEK293 transfekowanych Dsg3. Szkiełka inkubowano z surowicą pacjentów rozcieńczoną 1:10 przez 30 minut, a następnie płukano roztworem PBS. W drugim etapie następowała inkubacja z kozimi przeciwciałami skierowanymi przeciwko ludzkim immunoglobulinom klasy G znakowanym FITC przez 30 minut. Po ponownym płukaniu szkiełka analizę prowadzono pod mikroskopem fluorescencyjnym.

Wyniki poddano analizie statystycznej z użyciem programów STATISTICA 13.1 oraz IBM SPSS Statistics 25. Obliczono czułość i swoistość każdej składowej testu. Wartości Kappa Cohena obliczono do oceny siły zgodności pomiędzy elementami BIOCHIP a odpowiadającymi im metodami. Przyjęto następującą interpretację: wartości poniżej 0,20 wskazywały na bardzo słabą zgodność pomiędzy metodami, pomiędzy 0,21 a 0,4 – słabą zgodność, pomiędzy 0,41 a 0,6 – umiarkowaną zgodność, 0,61-0,8 – dobrą zgodność, 0,81-1 – bardzo dobrą zgodność. Wartości  $p < 0,05$  uznano za znaczące statystycznie.

## **Wyniki**

W grupie pacjentów z pęcherzycą w badaniu BIOCHIP świecenie immunofluorescencji o układzie „sieci rybackiej”, typowej dla pęcherzycy na przelyku małpy, stwierdzono u 65,7% pacjentów – w tym 81,0% z PV, 76,9% z m-PV, 87,5% z mc-PV i 42,9% z PF – oraz u żadnego pacjenta z grupy kontrolnej. Pozytywna reakcja z Dsg3 została stwierdzona u 100% pacjentów z PV, 100% z m-PV, 100% z mc-PV oraz u żadnego pacjenta z PF. Reaktywność surowicy z Dsg1 wykazano u 42,8% pacjentów z PV, 15,4% z m-PV, 87,5% z mc-PV oraz 92,9% z PF. Wszyscy pacjenci z grupy kontrolnej byli negatywni na Dsg3 i Dsg1. Wartość Kappa Cohena dla BIOCHIP- Dsg1 i ELISA- Dsg1 wyniosła 1,0 dla m-PV oraz 0,91 dla grupy mc-PV.

W grupie pacjentów z pemfigoidem czułość BIOCHIP-ME wyniosła 51,0%, natomiast IIF-ME – 76,5%. Dodatnią reakcję w pokrywie pęcherza na BIOCHIP-SSS stwierdzono u 94,1% pacjentów z BP i u wszystkich pacjentów z IIF-SSS (czułość 100%). Czuość BIOCHIP-BP180-NC16a była niższa niż w teście ELISA-BP180-NC16a (76,5% vs 82,4%),

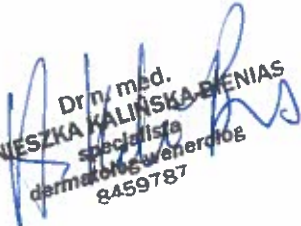
a czułość BP230 obu metod – podobna (45,1% vs 43,1%). Swoistość dla wszystkich antygenów wynosiła 100%. Analiza wykazała bardzo dobrą zgodność między BIOCHIP-SSS a klasycznym IIF-SSS (0,933,  $P < 0,001$ ) oraz między BIOCHIP-BP180-NC16a a ELISA-BP180-NC16a (0,933,  $P < 0,001$ ). Zaobserwowano dobrą zgodność między BIOCHIP-ME a klasycznym IIF-ME (0,694,  $P < 0,001$ ), a także między BIOCHIP-BP230 a ELISA-BP230 (0,793,  $P < 0,001$ ).


### Wnioski

1. Mozaikę BIOCHIP cechuje wysoka czułość i swoistość w wykrywaniu w diagnostyce pęcherzycy, porównywalna z IIF i ELISA. Stwierdzono bardzo dużą zgodność pomiędzy ELISA-Dsg1 i BIOCHIP-Dsg1. Mozaika może być stosowana do diagnozowania pęcherzycy oraz różnicowania pomiędzy pęcherzycą liściastą a odmianą śluzówkową i skórno-śluzówkową pęcherzycy zwykłej.

2. Mozaika BIOCHIP w diagnostyce pemfigoidu jest metodą o wysokiej czułości i swoistości. Stwierdzono bardzo dużą zgodność pomiędzy wynikami na ELISA-BP180NC16a i BIOCHIP-BP180NC16a oraz pomiędzy IIF na splicie skórnym i BIOCHIP-SSS, a także dużą zgodność pomiędzy ELISA-BP230 i BIOCHIP-BP230 oraz pomiędzy IIF na przetyku małpy i BIOCHIP-BP230, co świadczy o tym, że metody te mogą być stosowane zamiennie.

3. Mozaika BIOCHIP ma dużą wartość w diagnozowaniu AICHP. Z powodzeniem może być używana zamiennie z IIF i systemami ELISA. Jest narzędziem prostym, szybkim, tanim i niewymagającym skomplikowanego wyposażenia laboratorium, dzięki czemu znacznie ułatwia proces diagnostyczny.

  
Dr inż. med.  
AGNIESZKA KALINSKA-BIENIAS  
specjalista  
dermatologii i wenerologii  
8459787

  
15 196940  
Prof. dr hab. n. med.  
CEZARY KOWALEWSKI  
specjalista dermatolog

Alicja Adaszevska  
  
dermatologii i wenerologii  
2884958