

Ekspresja wybranych integrzyn i selektyn w zmianach skórnych w opryszczkowatym zapaleniu skóry

Expression of selected integrins and selectins in skin lesions in dermatitis herpetiformis

Agnieszka Żebrowska¹, Anna Sysa-Jędrzejowska¹, Anna Erkiert-Polguj², Elżbieta Waszczykowska², Małgorzata Wągrowa-Danilewicz³

¹Katedra i Klinika Dermatologii i Wenerologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, kierownik Katedry i Kliniki: prof. dr hab. med. Anna Sysa-Jędrzejowska

²Zakład Immunodermatologii Katedry Dermatologii i Wenerologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, kierownik Zakładu: prof. dr hab. med. Elżbieta Waszczykowska

³Pracownia Nefropatologii Zakładu Patomorfologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, kierownik Zakładu: prof. dr hab. med. Wielisław Papier

Post Dermatol Alergol 2006; XXIII, 5: 215–223

Streszczenie

Rozwój zmian pęcherzowych w opryszczkowatym zapaleniu skóry (*dermatitis herpetiformis* – DH) jest m.in. wynikiem destrukcji elementów błony podstawnej. Jej złożona struktura odpowiada za utrzymanie integralności połączenia skóro-naskórkowego, a reakcja wiązania się autoprzeciwciał skierowanych przeciwko antygenom w niej zlokalizowanym aktywuje wiele procesów immunologicznych i enzymatycznych. Rozwój pęcherza w DH jest zapoczątkowany gromadzeniem się neutrofilów tworzących mikroropnie w brodawkach skórnych, które w wyniku dalszych procesów przekształcają się w pęcherze podnaskórkowe. Tworzenie się nacieków z komórek wielojądrowych jest poprzedzone napływem limfocytów, zależnym od aktywności różnych cząsteczek adhezyjnych. Adhezyny pośredniczą w oddziaływaniach pomiędzy komórkami, oraz między komórkami a macierzą międzykomórkową. Integryny i selektyny mają udział w tworzeniu ognisk kontaktowych, pasów adhezyjnych, desmosomów czy hemidesmosomów, jak również w odpowiedzi immunologicznej podczas procesu zapalenia. Celem pracy było określenie lokalizacji i ekspresji wybranych integrzyn i selektyn w zmianach skórnych u chorych na DH. Grupę badaną stanowiło 13 chorych na DH w aktywnym okresie choroby, grupę porównawczą – 10 osób zdrowych. Lokalizację i ekspresję integrzyn B₁, B₃ i B₄ oraz selektyn E i L w skórze oznaczano metodą immunohistochemiczną (Novocastra). Ekspresję wybranych integrzyn i selektyn u wszystkich badanych chorych stwierdzono głównie w warstwie podstawnej naskórka, a w większości biopsji występowała ona także ogniskowo w pozostałych warstwach naskórka. Ekspresję tych enzymów wykazano także w naciekach neutrofilowych, zwłaszcza tworzących mikroropnie. U chorych na DH stwierdzono nieregularną ekspresję integrzyn β4 wzdłuż błony podstawnej. Silną ekspresję selektyn wykazano również w ścianach naczyń.

W grupie porównawczej ekspresja badanych cząsteczek adhezyjnych była stwierdzana jedynie w pojedynczych keratynocytach i komórkach śródbłonna.

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na udział cząsteczek adhezyjnych w tworzeniu się zmian skórnych w *dermatitis herpetiformis*.

Słowa kluczowe: opryszczkowate zapalenie skóry, integryny, selektyny.

Abstract

Pathogenesis of skin lesions in DH is associated with destruction of basement membrane components. Autoantibodies binding to autoantigens localized in the basement membrane of the epidermis activate a series of immunological and enzymatic phenomena.

Blister formation is initiated by accumulation of neutrophils, attracted by CD4+ T cells secreting mainly IFN-γ, TNF-α and IL-2, in dermal papillae, forming Pierrard's microabscesses. They are quickly transformed by oedema and inflammation into microvesicles and later into bigger subepidermal blisters. Adhesive molecules have an important role in processes of adhesion and interaction between individual cells as well as between cells and components of extracellular matrix. Selected integrins and selectins are cell surface transmembrane glycoproteins that function as

Adres do korespondencji: dr med. Agnieszka Żebrowska, Klinika Dermatologii i Wenerologii, Uniwersytet Medyczny, ul. Krzemieniecka 5, 94-017 Łódź, e-mail: zebrowskaaga@wp.pl

adhesion receptors transmitting biochemical and mechanical signals in a bidirectional manner across the plasma membrane and thus influence most cellular functions such as proliferation, differentiation, apoptosis and cell migration during inflammation.

The aim of the study was to investigate whether selected integrins and selectins are involved in pathogenesis of DH. Skin biopsies were taken from 13 patients with DH in an active stage of the disease and from 10 healthy subjects (controls). The localization and expression of integrins B₁, B₃ and B₄ as well as selectins E and L were examined by immunohistochemistry (Novocastra).

Signals for selected integrins were detected in basal keratinocytes in all the DH samples and in most of the samples focally in the other layers of epidermis. Neutrophils in microabscesses and perivascular infiltrations showed positive staining for integrins. Expression of beta 4 integrin in samples with blister was irregular and focal.

Expression of selectins was detected mainly in basal keratinocytes in all DH samples and sometimes also in other keratinocytes. The strong expression of selectins was assessed in the vascular wall and in infiltrations.

In all samples obtained from healthy volunteers weak expression of the examined molecules was detected in basal keratinocytes and endothelium cells.

Our results allow us to conclude that integrins and selectins play an important role in the pathogenesis of skin lesions of DH.

Key words: dermatitis herpetiformis, integrins, selectins.

Wstęp

Rozwój pęcherza w opryszczkowatym zapaleniu skóry (*dermatitis herpetiformis* – DH) jest zapoczątkowany gromadzeniem się neutrofilów tworzących tzw. mikropopnie Pierrarda w brodawkach skórnych. Na skutek obrzęku i stanu zapalnego są one szybko przekształcane w mikropęcherzyki, które łącząc się, tworzą większe pęcherze podnaskórkowe [1]. Rozwój nacieku złożonego z komórek wielojądrowych poprzedza wczesna akumulacja w skórze limfocytów o profilu CD4⁺, wydzielających głównie INF- γ , TNF- α i IL-2 [2–4].

Z badań eksperymentalnych wynika, że w okresie tworzenia się pęcherza dochodzi do wzmożonej produkcji IL-4 i IL-5 [2, 5]. Powoduje to zwiększoną ekspresję cząsteczek adhezyjnych na komórkach śródbłonna i napływ neutrofilów i eozynofiliów do naskórka. W warstwie podstawnej naskórka wykazano także podwyższenie stężenia IL-8, będącej bardzo silnym chemoatraktantem dla neutrofilów. Zwiększone stężenie GM-CSF, stwierdzone w komórkach dendrytycznych obecnych w połączeniach skóro-naskórkowych, oprócz aktywacji neutrofilów jest odpowiedzialne za indukcję receptorów dla immunoglobulin klasy A [4, 6]. Dodatkowo aktywacja kaskady dopełniacza przez przeciwciała IgA oraz MAC (*membrane attack complex*) może być jednym z mechanizmów wpływających na migrację neutrofilów do brodawek skórnych i niszczenie błon komórkowych [7]. Neutrofile, tworzące nacieki w skórze, uwalniają enzymy degradujące macierz i trawiące złogi IgA [8].

Badania dotyczące roli transglutaminazy naskórkowej w patogenezie opryszczkowatego zapalenia skóry dowiodły, że enzym ten katalizuje, zależną od jonów wapnia, reakcję tworzenia kowalencyjnych wiązań γ -glutamylolizynowych [9, 10]. Przy udziale transglutaminazy naskórkowej zachodzą procesy różnicowania keratynocytów oraz stabilizacji połączeń skóro-naskórkowych w brodawkach

skórnych. Wiadomo także, że transglutaminaza bierze udział w molekularnych reakcjach krzyżowych wiązań z kolagenem typu VII, który obecny w połączeniach skóro-naskórkowych tworzy włókna zakotwiczone [8, 11–13]. Wykazano również dominującą rolę transglutaminaz w stabilizowaniu błony podstawnej, macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM – *extracellular matrix*), sieci włókien kolagenowych [9, 12, 13] oraz połączeń z fibronektyną [17]. W procesie tym dochodzi także do aktywacji mastocytów i neutrofilów, które po przejściu przez ściany naczyń, przy udziale cząsteczek adhezyjnych, wydzielają specyficzne proteazy, mające zdolność trawienia wielu białek błony podstawnej. Uwalniane przez komórki nacieku zapalnego oraz keratynocyty metaloproteiny macierzy doprowadzają w konsekwencji do powstawania pęcherzy [1]. Migracja komórek immunokompetentnych poza światło naczynia do miejsc objętych procesem zapalnym jest procesem wieloetapowym. W poszczególne jego etapy są zaangażowane kolejne rodziny cząsteczek adhezyjnych odpowiedzialnych za toczenie się leukocytów, adhezję, aktywację, ściste przyleganie oraz diapedezę.

W początkowym etapie toczenia się leukocytów dochodzi do zbliżania się komórek (tzw. marginalizacji). Łączenie się selektyn z ligandami oligosacharydowymi umożliwia bezpośredni kontakt leukocytów ze śródbłonkiem naczyń. Wiązanie to nie jest jednak na tyle silne, aby mogło przeciwdziałać napierającemu prądowi krwi, dlatego nie dochodzi do całkowitego zatrzymania komórek, ale do ich toczenia, umożliwiającego aktywację limfocytów.

Następny etap to aktywacja leukocytów, w czasie której cytokiny wydzielane w miejscu zapalenia stymulują toczenie się leukocyty. Konsekwencją tego procesu jest zmiana konformacji ich receptorów integrynowych, zwiększająca powinowactwo do swoich ligandów. Dochodzi wówczas do zatrzymania przepływu komórek, a następnie do przeciskania się komórek przez ścianę śródbłonna.

W kolejnym etapie – silnej adhezji – biorą udział integryny zarówno podrodziny $\beta 1$, jak i $\beta 2$.

Ostatni etap – diapedezy i migracji w tkankach, polega na przechodzeniu leukocytów przez nieuszkodzone naczynie do tkanek. Dzięki zdolności do ruchu własnego pętlakowatego aktywowany leukocyt dociera do miejsca występowaniu antygeny i wydziela szereg enzymów trawiących tkankę. Zatrzymanie przepływu komórek jest związane ze zwiększeniem płynności błony komórkowej, a także ze zmianami w cytoszkieletcie, prowadzącymi do odkształcenia błony. W procesie tym dochodzi do syntezy enzymów zlokalizowanych na zewnątrz komórki, co ma służyć przygotowaniu komórki do opuszczenia naczynia. Niemal wszystkie komórki opuszczające naczynie mają na swojej powierzchni CD26, czyli ektoenzym – peptydazę dipeptydylową, biorący udział w stymulacji limfocytów.

W pozanaczyniowych etapach migracji leukocytów ważną rolę odgrywają cząsteczki adhezyjne. Są one przezbłonowymi glikoproteinami złożonymi z domen zewnątrzkomórkowych i śródbłonowych oraz cytoplazmatycznych domen funkcyjnych. Molekuła, która łączy się z cząstką adhezyjną, jest nazywana jej receptorem lub ligandem [15]. Wśród cząsteczek adhezyjnych odpowiedzialnych za przyleganie wyróżniono 6 rodzin: integryny, selektyny, cząsteczki immunoglobulinopodobne, kadheryny, cartilage link proteins i sialomucyny. Przezbłonowe kadheryny, a wśród nich desmogleiny i desmokoliny, biorą udział w tworzeniu połączeń między komórkami naskórka.

W ostatnich latach prowadzone są badania nad modulacją aktywności cząsteczek adhezyjnych biorących udział w zjawiskach zachodzących w skórze, które będą mogły być wykorzystane jako nowa metoda terapeutyczna w dermatologii.

Cel pracy

Celem pracy było określenie lokalizacji i ekspresji wybranych integryn i selektyn w zmianach skórnych u chorych na opryszczkowane zapalenie skóry.

Materiał i metody

Grupę badaną stanowiło 13 chorych na DH (5 kobiet i 8 mężczyzn, w wieku 18–64 lata, średnio – 44,78) w aktywnym okresie choroby. Grupę porównawczą stanowiło 10 osób zdrowych (5 kobiet i 5 mężczyzn, w wieku 19–49 lat, średnio – 42 lata). Na wykonanie badań uzyskano zgodę Komisji Etyki Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

U 7 chorych na DH obecne były zmiany skórne o charakterze pęcherzyków i grudek, u pozostałych 6 osób – rumienie i grudki. Wszyscy badani zgłaszali uporczywy świąd. Rozpoznanie DH ustalono na podstawie wywiadu, obrazu klinicznego oraz badań histopatologicznych i immunologicznych (IIF i DIF). U wszystkich chorych na DH oznaczono miano przeciwciał IgAEmA na przetyku małpy (*Oesophagus monkey* IgAEmA, *Medizinische Labordiagno-*

stica, Denmark) metodą immunofluorescencji pośredniej (IIF) oraz przeciwko transglutaminazie tkankowej (*anty-tTG*) (*Celikey, Pharmacia & Upjohn*) metodą ELISA.

Wycinki skóry pobierano ze zmian chorobowych, a u osób zdrowych z okolicy karku. Do określenia ekspresji badanych enzymów w tkance zastosowano metodę immunohistochemiczną. Skrawki parafinowe o grubości 3–4 μm posłużyły do sporządzenia rutynowych preparatów barwionych hematoksyliną i eozyną oraz do badań immunohistochemicznych w systemie detekcyjnym DAKO EnVision wg metody immunoperoksydazowej, z użyciem następujących pierwotnych przeciwciał monoklonalnych: CD 62E (E-selectin), CD62L (L-selectin), CD29 ($\beta 1$ rodzina), CD61 (GPIII) ($\beta 3$ rodzina), CD104 ($\beta 4$ rodzina) firmy Novocastra.

Do badań immunohistochemicznych skrawki parafinowe, po nałożeniu na szkiełka adhezyjne i wysuszeniu w cieplarni o temperaturze 56°C przez 24 godz., były poddawane odparafinowaniu w szeregu składającym się z ksylenów i alkoholi o zmniejszających się stężeniach (96%, 80%, 70%, 60%). Następnie hamowano aktywność endogennej peroksydazy przy użyciu 3% roztworu perhydrolu w metanolu przez 5 min.

W celu odzyskania antygenowości tkanki i otworzenia drogi dla przeciwciał stosowano następujące procedury: dla CD62E skrawki podgrzewano w 0,001 M buforze wersenianowym (EDTA) o pH 8,0, w łaźni wodnej o temperaturze 95°C przez 30 min, dla CD62L skrawki gotowano w 0,001 M buforze wersenianowym (EDTA) o pH 8,0 w kuchence mikrofalowej przy poziomie mocy 700 W przez 15 min, dla CD29 skrawki sześciokrotnie podgrzewano w 0,01 M buforze cytrynianowym o pH 6,0, w kuchence mikrofalowej przy następujących poziomach mocy 150 W (5 min), 350 W (5 min), 450 W (5 min), 650 W (6 min), dla CD61 i CD104 skrawki podgrzewano w DAKO Target Retrieval Solution, w łaźni wodnej o temperaturze 95°C przez 30 min. Po ostudzeniu skrawki płukano w 0,05 M buforze TRIS (TBS) o pH 7,6 przez 5 min. Następnie poddawano je 60-minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej, w komorze wilgotnej, z odpowiednio rozcieńczonymi przeciwciałami: CD62E (*E-selectin*) 1:50, CD62L (L-selectin) 1:50, CD29 1:40, CD61 (GPIII) 1:25, CD104 1:50. Po inkubacji dwukrotnie płukano skrawki w buforze TBS i stosowano dwuetapowy system wizualizacji DAKO EnVision, aby uwidocznić reakcję antygen – przeciwciało. Pierwszy etap reakcji polegał na 30-minutowej inkubacji w ww. warunkach z polimerem znakowanym peroksydazą i związanym z wtórnymi, kozimi przeciwciałami skierowanymi przeciwko użytym przeciwciałom monoklonalnym (mysim). Ostatni etap detekcji jest przykładem reakcji enzymatycznej, w której przy zastosowaniu substratu dla peroksydazy – tetrachlorku 3,3' diaminobenzydyny (DAB) powstaje barwny produkt (czas inkubacji z roztworem DAB – 5 min). Po uzyskaniu pozytywnej reakcji immunohistochemicznej podbarwiano jądro komórkowe hematoksyliną Meyera (2 min), a następnie odwadniano skrawki w alkoholach o rosną-

Tab. 1. Średnie wartości nasilenia immunоекспresji CD29, CD61, CD104, CD62E i CD62L w tkankach

Cząsteczki adhezyjne	CD29 (integryna β1)	CD61 (integryna β3)	CD104 (integryna β4)	CD62E (E-selektyna)	CD62L (L-selektyna)
choroba Duhringa	1,36±0,64	0,86±0,64	1,54±0,9	1,73±0,79	1,64±1,0

cych stężeniach (70%, 80%, 96%) i przeprowadzono przez wiele acetonów i ksylenów. Tak przygotowane zatapiano w balsamie kanadyjskim.

Nasilenie immunоекспresji CD29, CD61, CD104, CD62E i CD62L w wycinkach ze skóry pobranych od chorych oceniano półilościowo, stosując następującą skalę: 0 – brak odczynu, 0,5 – odczyn bardzo słaby, w pojedynczych komórkach, 1 – odczyn słaby w większości komórek, 2 – odczyn mierny, 3 – odczyn silny. Następnie obliczano średnie wartości nasilenia immunоекспresji badanych integrzyn i selektyn. Wszystkie dane przedstawiono jako średnie ± odchylenie standardowe.

Ekspresja integrzyn i selektyn była oceniana przy użyciu mikroskopu Olympus BX 41 (Japonia).

Wyniki

W badaniach histopatologicznych we wszystkich wycinkach ze zmian chorobowych od pacjentów z DH stwierdzono nacieki neutrofilowe, tworzące mikroropnie w szczytach brodawek skórnych oraz w części przypadków obecność pęcherzy podnaskórkowych. W 7 wycinkach wykazano jednokomorowy pęcherz podnaskórkowy, a w 4 biopsjach obecne były ponadto niewielkie pęcherzyki.

W badaniu DIF we wszystkich wycinkach stwierdzono obecność ziarnistych złogów IgA w szczytach brodawek skórnych. Badanie IIF wykazało obecność przeciwciał IgAEmA u wszystkich chorych na DH, a obecność prze-

ciwciał anti-tTG metodą ELISA stwierdzono u 4 na 13 pacjentów.

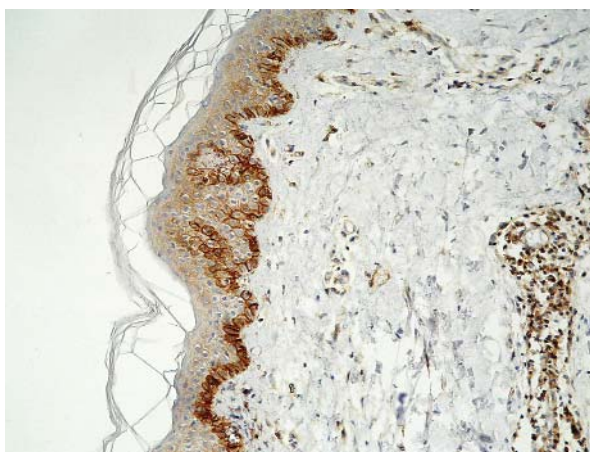
Badania immunohistochemiczne wycinków skóry chorych na DH

Wyniki badań półilościowych nasilenia immunоекспresji badanych integrzyn i selektyn przedstawiono w tab. 1.

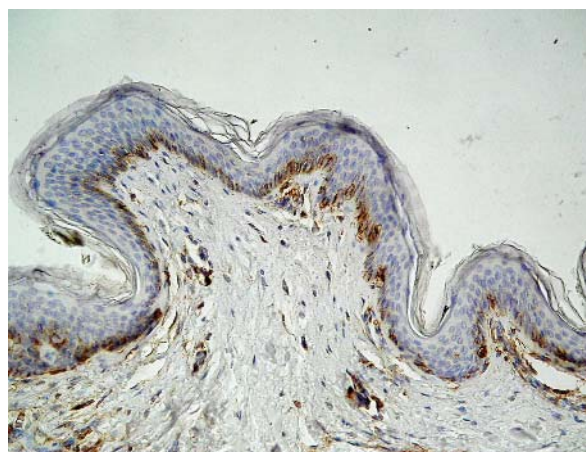
Integryna β1 (CD29). Immunоекспresję integryny β1 u chorych na DH wykryto w komórkach warstwy podstawnej naskórka. Odczyn słabo lub miernie wyrażony był obecny we wszystkich komórkach. Nasilenie immunоекспresji CD29 oceniono średnio jako 1,36±0,64. (ryc. 1.) W skrawkach pochodzących z grupy kontrolnej odczyn był bardzo słaby i obejmował jedynie pojedyncze komórki.

Integryna β3 (CD61). W wycinkach skóry pochodzących od osób z grupy kontrolnej nie wykryto immunоекспresji integryny β3 (ryc. 2.). Odczyn z przeciwciałem CD61 był natomiast dodatni w wycinkach skóry pobranych od chorych na chorobę Duhringa i obejmował komórki warstwy podstawnej naskórka lub też ogniskowo komórki pozostałych warstw naskórka (ryc. 3.). Średnia wartość nasilenia immunоекспresji CD61 wyniosła 0,86±0,64.

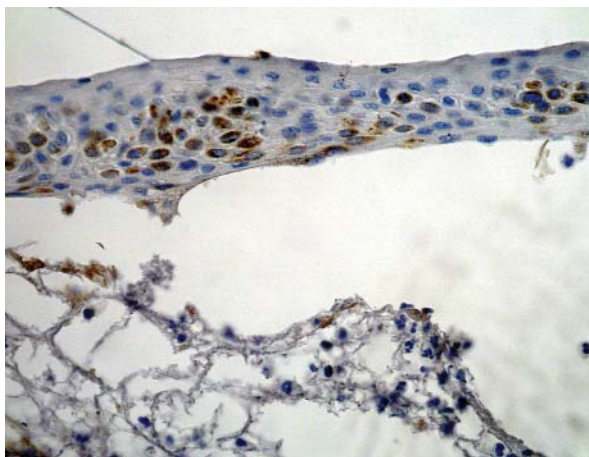
Integryna β4 (CD104). Immunоекспresję integryny β4 wykryto w hemidesmosomach zarówno w wycinkach pochodzących od osób chorych na DH, jak i z grupy kontrolnej. Odczyn ten jednak u chorych na DH miał charakter nieregularnych ognisk barwnika rozrzuconych wzdłuż błony podstawnej w przeciwieństwie do regularnej liniowej



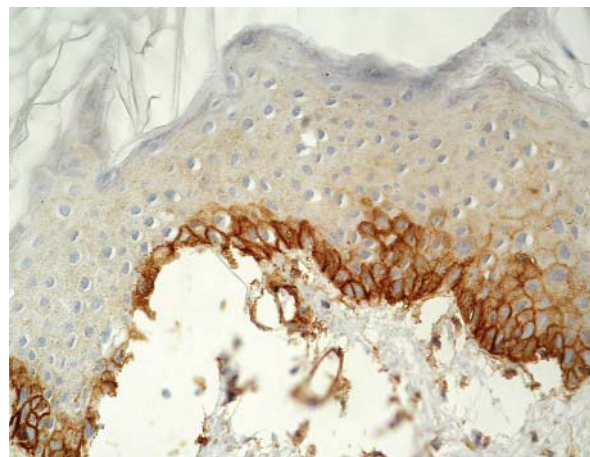
Ryc. 1. Opryszczkowate zapalenie skóry. Immunohistochemia. Ekspresja β1 integryny. Powiększenie 200x



Ryc. 2. Grupa kontrolna. Immunohistochemia. Ekspresja β3 integryny. Powiększenie 200x



Ryc. 3. Opryszczkowate zapalenie skóry. Immunohistochemia. Ekspresja $\beta 3$ integryny. Powiększenie 400x



Ryc. 4. Opryszczkowate zapalenie skóry. Immunohistochemia. Ekspresja $\beta 4$ integryny. Powiększenie 400x

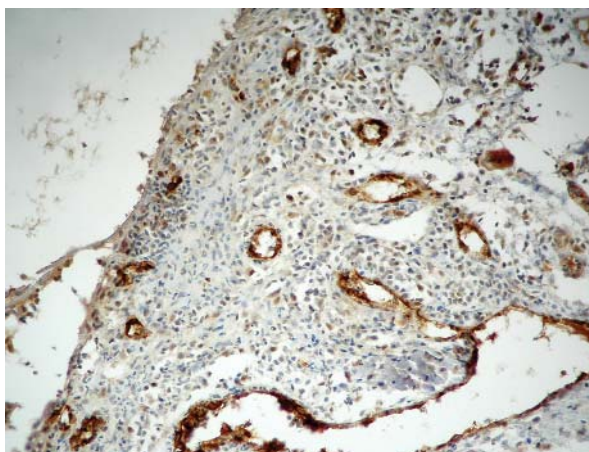
ekspresji w grupie porównawczej (ryc. 4.). Średnia wartość nasilenia immunoekspresji CD104 wyniosła u chorych na chorobę Duhringa $1,54 \pm 0,9$.

E-selektyna (CD62E). Immunoekspresję E-selektyny stwierdzono na komórkach śródbłotka i neutrofilach. Ocena półilościowa wykazała, że odczyn z przeciwciałem CD62E był bardzo silny w wycinkach skóry pochodzących od chorych na chorobę Duhringa (ryc. 5.). Średnia wartość nasilenia immunoekspresji tej selektyny wyniosła u chorych na chorobę Duhringa $1,73 \pm 0,79$. W grupie porównawczej słaby odczyn dotyczył jedynie pojedynczych komórek śródbłotka (ryc. 6.).

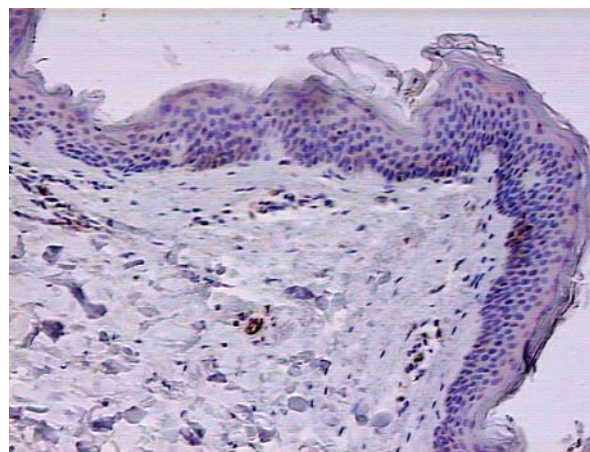
L-selektyna (CD62L). Immunoekspresję L-selektyny stwierdzono na limfocytach, makrofagach i neutrofilach (ryc. 7.). Średnia wartość nasilenia immunoekspresji L-selektyny u chorych wyniosła $1,64 \pm 1,0$. W grupie kontrolnej odczyn oceniono jako bardzo słaby i dotyczący pojedynczych komórek krążących.

Omówienie

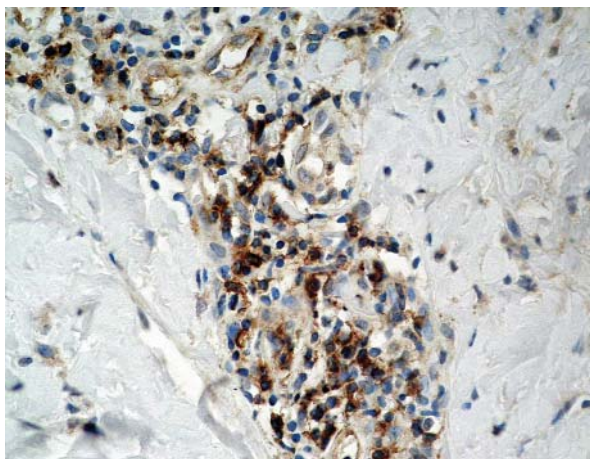
Pierwszą rodziną cząsteczek adhezyjnych rozpoczynających diapedezę, czyli toczenie się leukocytów, są selektyny. Rodzina ta obejmuje 3 glikoproteiny transportowe: selektynę leukocytarną (L), płytkową (P) i endotelialną (E). Cząsteczki te mają wspólny schemat budowy. Na N-końcu znajduje się zależna od wapnia domena lektynopodobna, tuż za nią obecny jest region o budowie zbliżonej do czynnika wzrostu naskórka (EGF – *epidermal growth factor*). Najbliżej błony znajduje się zmienna liczna sekwencji homologicznych do białek regulujących układ dopełniacza. Kolejna jest domena transbłonowa i fragment cytoplazmatyczny cząsteczki. Naturalnymi ligandami dla selektyn są mucyny. Selektyny przyczyniają się do rekrutacji leukocytów do ogniska procesu zapalnego, a w początkowych jego fazach także biorą udział w toczeniu się leukocytów po śródbłonku naczyń krwionośnych [16].



Ryc. 5. Opryszczkowate zapalenie skóry. Immunohistochemia. Ekspresja E-selektyny. Powiększenie 200x



Ryc. 6. Grupa kontrolna. Immunohistochemia. Ekspresja E-selektyny. Powiększenie 200x



Ryc. 7. Opryszczkowe zapalenie skóry. Immunohistochemia. Ekspresja L-selektyny. Powiększenie 400x

Selektyna E znajduje się w stymulowanych komórkach śródbłonna, a produkcję tej cząsteczki indukuje bakteryjna endotoksyna (*liposacharyd* – LPS), trombina, cytokiny: IL-1 oraz TNF- α . Ekspresję tej cząsteczki można stwierdzić tylko w miejscu procesu zapalnego [16]. E-selektyna jest produkowana tylko przez komórki endotelium, dlatego być może została uznana za marker aktywności tych komórek. W badaniach własnych wykazano silną ekspresję ww. selektyny w ścianach naczyń oraz nieco słabszą w neutrofilach. Potwierdza to jej udział w napływie komórek immunokompetentnych do miejsc objętych procesem zapalnym.

Auria i wsp. [17] badali stężenie rozpuszczalnej E-selektyny we krwi osób chorujących na choroby pęcherzowe. Było ono istotnie podwyższone u osób chorych w porównaniu z grupą kontrolną, a także istotnie korelowało z liczbą obecnych zmian skórnych w badaniu wstępnym. Podczas prowadzonej terapii nasilenie zmian i stężenie badanej selektyny zmniejszały się równolegle, co może sugerować, iż E-selektyna może być przydatnym markerem skuteczności prowadzonego leczenia. Podobnych zależności nie wykazano natomiast dla badanego we krwi poziomu rozpuszczalnego ICAM-1.

Selektyna L znajduje się stale na powierzchni leukocytów, zanika natomiast z ich powierzchni po stymulacji. Bierze ona udział m.in. w rekrutacji neutrofilów do miejsca toczącego się procesu zapalnego, a także adhezji limfocytów do komórek śródbłonna naczyń obwodowych węzłów chłonnych [15]. Prawdopodobnie jej forma rozpuszczalna bierze udział w regulacji procesów adhezji, a także może tworzyć rodzaj układu buforowego, który zapobiega adhezji na śródbłonku pod wpływem słabszej aktywacji. Ligandami dla selektyn są glikoproteiny sialowane i fukozylowane laktozaminoglikany umieszczone na rdzeniu białkowym. Na powierzchni komórek śródbłonna znajdują się ligandy dla selektyny L-CD34 i MAdCAM-1 (*mucosal adhesion cell adhesion molecule*) [15, 16]. W badaniach wła-

snych z uwagi na duży odczyn zapalny i prawdopodobne złuszczenie L-selektyny z powierzchni leukocytów spodziewano się braku ekspresji tej selektyny w badanych skrawkach. Wbrew naszym oczekiwaniom w wycinkach skórnych stwierdzono jednak jej obecność. Tłumaczyć to można obecnością komórek o różnym etapie pobudzenia. W badanych tkankach wykazano także obecność ekspresji w pojedynczych keratynocytach, co może być związane ze zjawiskiem immunologicznego pobudzenia komórki naskórka i pojawieniem się na nich tej adhezyny.

Smith i wsp. [18] badali nasilenie ekspresji L-selektyny na neutrofilach u osób z chorobą Duhringa. Autorzy ci stwierdzili, że zarówno w aktywnym, jak i nieaktywnym stadium choroby ekspresja ta była niższa niż u osób zdrowych. Dominującą komórką zapalną nacieków w mikropoprawkach brodawek skórnych jest neutrofil, a L-selektyna bierze udział w rekrutacji leukocytów do miejsca toczącego się procesu zapalnego. Aktywacja neutrofilów i przemieszczenie się tych komórek do miejsca zapalenia wiąże się ze złuszczeniem tej selektyny z powierzchni leukocytów, prowadząc do narastania stężenia formy rozpuszczalnej w przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Aby uzupełnić nasze badania tkankowe w przyszłości, należałoby je skorelować ze stężeniem rozpuszczalnej L-selektyny w surowicy chorych na DH.

Po związaniu leukocytu przez selektyny swoje działanie rozpoczynają integryny, które silnie mocują leukocyt na śródbłonku. Integryny są cząsteczkami adhezyjnymi odpowiedzialnymi za interakcje pomiędzy komórkami i macierzą zewnątrzkomórkową oraz między samymi komórkami, poprzez przekazywanie sygnału przez te struktury. Wzajemnie oddziaływanie keratynocytów i komórek tworzących struktury błony podstawnej jest niezmiernie istotne w rozwoju chorób pęcherzowych, w tym opryszczkowego zapalenia skóry.

Integryny to heterodimery złożone z łańcuchów α i β połączonych niekowalencyjnie. Przechodząc przez błonę cytoplazmatyczną, cząsteczki te łączą środowisko zewnątrz- i wewnątrzkomórkowe. U ludzi opisano do tej pory przynajmniej 15 łańcuchów α i 8 β , które łączą się ze sobą w wiele kombinacji [15, 16]. Keratynocyty podczas procesu różnicowania tracą zdolność ekspresji integryn [19]. Integryny łączą się ze swoistymi białkami zwanymi ligandami, jednak różne integryny mogą łączyć się z tym samym ligandem. Niektóre z nich do tego połączenia wymagają obecności jonów Mg^{2+} lub Ca^{2+} [15, 19, 20]. Związanie integryny z ligandem powoduje inicjację kaskady sygnałowej, która moduluje zachowanie komórek i transkrypcję genów [19].

Integryny są głównymi receptorami komórek w procesie łączenia się ich z macierzą zewnątrzkomórkową (np. fibronektyna, witronektyna, kolagen), a także biorą one udział w adhezji międzykomórkowej [15, 16]. Dzieli się je na podrodziny ze względu na ich podjednostkę β . Integryny z podjednostką $\beta 1$ nazywane są też VLA (*very late activation antigen*) [16]. Podrodzina $\beta 1$ bierze udział głów-

nie w interakcji komórek z makromolekułami tkanki łącznej (np. *fibronektyna*, *laminina*, *kolagen*), $\beta 2$ – w interakcji międzykomórkowej, a $\beta 3$ – w łączeniu z ligandami typu fibrynogen, witronektyna, trombospondyna lub czynnik von Willebranda [15, 19]. Podjednostkę $\beta 1$ integryny wykrywano w szczytowej i bocznych częściach błon komórkowych komórek warstwy podstawnej, a w niewielkim stopniu w ich dolnej części, co sugeruje, że odgrywa ona głównie rolę w połączeniach międzykomórkowych. Podjednostka $\alpha 6$ łączy się $\beta 1$, np. w komórkach mięśniowych, fibroblastach czy płytkach, a w nabłonku może wiązać się zarówno z $\beta 1$ jak, i $\beta 6$ [20].

Cząsteczki należące do podrodziny integryn $\beta 1$ VLA pojawiają się często dopiero od 2 do 7 tyg. po stymulacji limfocytów. Większość molekuł należących do tej podrodziny ma zdolność wiązania lamininy, fibronektyny, witronektyny, kolagenu i innych białek macierzy pozakomórkowej, dlatego odgrywają one istotną rolę w przyleganiu komórek do podłoża [21]. Uzasadniło to badanie ekspresji integryny $\beta 1$ w skrawkach chorych na DH w naszych badaniach. W trakcie tworzenia się mikroporni, a następnie pęcherzyków w przebiegu DH ekspresja $\beta 1$ integryny była silna i dotyczyła całej warstwy podstawnej naskórka. Świadczy to o wystąpieniu opisanego powyżej procesu stymulacji integryn przez limfocyty na złączy skórno-naskórkowym. W warunkach fizjologicznych w skórze osób zdrowych ekspresja tej cząsteczki była niewielka i ogniskowa.

Integryny na komórkach niepoddawanych stymulacji są nieaktywne [22]. Większość integryn jest konstytutywnie w stanie latentnym – nie przyłączają ligandów, jak też nie przekazują sygnałów [23, 24].

Drugą ważną funkcją integryn jest ich rola w transdukcji sygnału. Aktywacja odmiennych dróg przekazywania sygnałów zależy od wielu czynników. Należą do nich różnego rodzaju integryny, białka macierzy zewnątrzkomórkowej oraz czynniki stymulujące, takie jak cytokiny, czynniki wzrostu, chemokiny oraz inne cząsteczki adhezyjne, włączając w to również same integryny [25].

Integryny odgrywają ważną rolę w utrzymywaniu połączenia skórno-naskórkowego. Zdolność komórek do przylegania do siebie nawzajem lub do macierzy międzykomórkowej jest zasadniczą własnością organizmów wielokomórkowych. Jest niezbędna m.in. do rozwoju organizmu, procesów naprawczych, działania układu immunologicznego. Na istotną rolę integryn wskazywać może fakt wywołania zjawiska letalnego u myszy w przypadku braku $\alpha 4$ lub $\beta 1$ w okresie płodowym [26], a myszy pozbawione $\alpha 3$ integryny umierają wkrótce po urodzeniu ze względu na błędną organogenezę w nerkach i płucach [19].

$\beta 3$ integryna jest glikoproteiną błonową, której główna ekspresja dotyczy płytek krwi i megakariocytów. Integryna ta, łącąc się z cząsteczką CD51 i tworząc receptor dla witronektyny, ulega ekspresji w bardzo wielu tkankach. Moreno i wsp. używając przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko tej integrynie, wykazali jej obecność w nerkach, głównie komórkach nabłonkowych i jądrach

[27]. Wiele spośród integryn jest zaangażowanych w procesy angiogenezy oraz rozwoju guzów nowotworowych i promowania przerzutów. Istotny udział integryny $\beta 3$ wykazano w interakcjach międzykomórkowych, głównie w powstawaniu przerzutów nowotworowych w nowotworze piersi. Analiza strukturalna i funkcjonalna fragmentów integryny $\beta 3$ wykazała jej silne właściwości adhezyjne i możliwość wpływania na funkcje fibrynogenu, co wiąże się z jej ekspresją w procesie zapalenia i pojawianiu się na innych komórkach, w tym nabłonkowych [28].

W badaniach własnych stwierdzono ekspresję tej integryny w pojedynczych komórkach naskórka. Wydaje się, że proces zapalny i rozwarstwienie połączenia skórno-naskórkowego może indukować ekspresję CD61 na keratynocytach, ale zjawisko to wymaga potwierdzenia innymi metodami diagnostycznymi.

Udział integryn w zakotwiczeniu włókien w macierzy zewnątrzkomórkowej jest dość dobrze poznany [29]. Domeny zewnątrzkomórkowe przyłączają się do białek macierzy, a wewnątrzkomórkowe łańcuchy łączą się z mikrofilamentami aktynowymi cytoszkieletu cytoplazmatycznego [30]. Genetyczna lub autoimmunologiczna dysfunkcja $\alpha 6\beta 4$ integryny powoduje zmiany pęcherzowe skóry i błon śluzowych w takich chorobach, jak postać łącząca pęcherzowego oddzielania się naskórka za zwężeniem odźwiernika i pemfigoid bliznowaciejący. Ekspresja różnych rodzin integryn na keratynocytach, fibroblastach, komórkach śródłonka i komórkach migrujących jest niezbędna także do prawidłowego gojenia się ran oraz zjawiska apoptozy [31, 32]. Zjawiska te mają miejsce w związku z promowaniem przez integryny migracji komórek, produkcji metaloproteinaz i angiogenezy. Integryny w prawidłowym, niezmiennym naskórku stwierdza się tylko ogniskowo w warstwie podstawnej naskórka i w mieszkach włosowych, a $\alpha 6\beta 4$ jest obecna tylko w hemidesmosomach [33]. W naszych badaniach wykazano również niewielką ekspresję badanej integryny w pojedynczych komórkach naskórka.

W prawidłowych keratynocytach $\alpha 6\beta 4$ integryna wykazuje ekspresję w części podstawnej komórki ograniczonej do hemidesmosomu. Innymi składnikami hemidesmosomu są plektyna, białko BPAG 1 i BPAG2 oraz CD151 tetraspanina [34]. Preferowanymi ligandami dla $\alpha 6\beta 4$ integryny są laminina 5 i laminina 1. Laminina 5 (epiligryna) jest główną lamininą w błonie podstawnej [35].

Ze względu na rolę cząstek adhezyjnych w utrzymaniu integralności międzykomórkowej badano ich udział w powstawaniu wykwitów w chorobach pęcherzowych, w których dochodzi do tworzenia pęcherzy na skutek utraty przylegania międzykomórkowego na przykład w pemfigu czy pemfigoidzie [17].

$\alpha 6\beta 4$ integryna jest heterodimerem, który bierze udział w łączeniu filamentów pośrednich komórki do błony podstawnej. Odgrywa ona kluczową rolę w tworzeniu hemidesmosomów, o czym świadczą wyniki badań *in vitro*.

Przeciwciała skierowane przeciwko niej hamują tworzenie hemidesmosomów i niszczą już istniejące [36].

Hemidesmosomy to wielobiałkowe kompleksy odpowiedzialne za adhezję komórek nabłonka do macierzy zewnątrzkomórkowej. Występują nie tylko w naskórku, ale też np. rogowce, nabłonku układu oddechowego i pokarmowego [37, 38]. Do prawidłowego funkcjonowania tej cząstki konieczna jest fosforylacja podjednostki $\beta 4$ [36]. Jest ona również ważna w procesie proliferacji komórek, ich różnicowaniu i migracji [39].

Charakterystyczną cechą podjednostki $\beta 4$ jest jej duży wewnątrzkomórkowy region liczący 1000 reszt aminokwasowych w porównaniu z 50 resztami w przypadku innych łańcuchów β [37]. Funkcje tej integryny są prawdopodobnie regulowane sekwencjami wewnątrzcytoplazmatycznymi domeny $\beta 4$, która składa się z dwóch par fibronektyny III oddzielonych fragmentem łączącym [36, 40]. Obserwacje te wskazują, iż autoprzeciwciała muszą przechodzić przez błonę komórkową. Jednym z możliwych wyjaśnień ww. zjawiska jest jego zapoczątkowanie przez reakcję przeciwciał skierowanych przeciw zewnątrzkomórkowym fragmentom. Przeciwciał takich do tej pory nie opisano, wiadomo jednak, że możliwe jest ich występowanie np. tylko w przedklinicznej fazie choroby. Innym wytłumaczeniem może być to, że rozpoczynające chorobę są przeciwciała niezwiązane z $\beta 4$ integryną, a następnie w przebiegu zjawiska *epitope spreading* dołączane są epitopy homologiczne do $\beta 4$ integryny. Kompleksy auto-przeciwciał i tych antygenów mogą być internalizowane i wewnątrzkomórkowo przeciwciała mogą się łączyć z domenami, prowadząc w konsekwencji do powstania objawów chorobowych [23].

Kurpakus i wsp. na modelu *in vitro* badali udział $\alpha 6\beta 4$ w tworzeniu hemidesmosomów w przebiegu procesu gojenia się ran. Przeciwciała skierowane przeciw podjednostce $\beta 4$ nie zaburzały migracji komórek nabłonka, ale zapoczątkowywały rozrywanie się połączeń utworzonych wcześniej, a także nie dochodziło do prawidłowego formowania hemidesmosomów. Przeciwciała przeciw $\alpha 6$ całkowicie odizolowywały komórki nabłonka od miejsca gojenia [41].

Badania własne wykazały słabą, ale liniową i regularną ekspresję $\beta 4$ integryny w wycinkach skóry osób zdrowych. Ekspresja ta świadczy o konstytutywnej obecności tej cząsteczki w strukturach zakotwiczących naskórka. Natomiast w przebiegu immunologicznego rozwarstwienia naskórka w DH, mediowanego przeciwciałami skierowanymi przeciwko naskórkowej transglutaminazie, a spowodowanego kaskadą reakcji cytokinowych i enzymatycznych, ekspresja ta ulegała istotnej zmianie. Nieregularna i ogniskowa ekspresja tej integryny w obrębie mikroropni i pęcherzy świadczy o zniszczeniu połączenia skórno-naskórkowego.

Stężenie badanych cząsteczek adhezyjnych jest podwyższone w różnych chorobach zapalnych, np. reumatoidalnym zapaleniu stawów, toczniu rumieniowatym, astmie oskrzelowej, atopowym zapaleniu skóry i łuszczycy [17].

W literaturze opisano praktyczne wykorzystanie hamowania aktywności cząsteczek adhezyjnych w leczeniu różnych chorób poprzez stosowanie przeciwciał lub fragmentów peptydowych blokujących ich interakcje. Dobry efekt terapeutyczny uzyskano w terapii pemfigoidu [42]. Autorzy podawali immunoglobuliny we wlewach dożylnych u pacjentów, u których istnieją przeciwwskazania do konwencjonalnej terapii.

Obecnie natalizumab, czyli rekombinowane monoklonalne przeciwciało, jest stosowany w leczeniu stwardnienia rozsianego i choroby Leśniowskiego-Crohna. Efekt terapeutyczny wywołany jest prawdopodobnie blokowaniem wiązania z receptorem VCAM-1 w układzie nerwowym i MAdCAM-1 (*mucosal addressin cell adhesion molecule-1*) w jelitach [43]. Natalizumab jest przeciwciałem skierowanym przeciwko integrynie $\alpha 4$, znajdującej się na powierzchni leukocytów i pośredniczącej w migracji limfocytów przez śródbłonek naczyń do ściany jelita. Badania kliniczne prowadzone u chorych na chorobę Leśniowskiego-Crohna w aktywnym okresie schorzenia wykazały skuteczność natalizumabu w uzyskaniu remisji, a także poprawy jakości życia. MLN02 (LDP-02) przeciwciało skierowane przeciwko integrynie $\alpha 4\beta 7$ we wstępnych badaniach klinicznych wykazuje pozytywny wpływ na przebieg zarówno choroby Leśniowskiego-Crohna, jak i wrzodziejącego zapalenia jelita grubego [44].

Liu i wsp. [45] wykazali, że podawanie neutralizujących przeciwciał przeciw CD11a (LFA-1), CD11b (Mac-1), CD11A+CD11b, lub CD18 przed wstrzyknięciem patogennych przeciwciał nie powodowało rozwinięcia zmian w mysim modelu BP. Myszy genetycznie pozbawione Mac-1 były odporne na eksperymentalny BP pomimo prawidłowego komplementu i degranulacji komórek tucznych czy neutrofilii. Zaobserwowano przy tym również znaczne zmniejszenie akumulacji neutrofilii, co może tłumaczyć korzystny efekt terapeutyczny w *dermatitis herpetiformis*, w przebiegu którego tworzą się mikroropnie w obrębie brodawek skórnych.

Dane z literatury z ostatnich lat jak też uzyskane wyniki badań własnych potwierdzają udział cząsteczek adhezyjnych w patogenie opryszczkowatego zapalenia skóry i wskazują na nowe możliwości terapeutyczne chorób pęcherzowych poprzez modulujący wpływ na ich aktywność.

Praca wykonana z funduszu nr: 503-1019-1, 503-8019-1.

Piśmiennictwo

1. Grando SA, Glukhenky BT, Orannik GN, et al. Mediators of inflammation in blister fluids from patients with pemphigus vulgaris and bullous pemphigoid. *Arch Dermatol* 1989; 125: 925-30.
2. Caproni M, Feliciani C, Fuligni A, et al. Th2-like cytokine activity in dermatitis herpetiformis. *Br J Dermatol* 1998; 138: 242-7.
3. Garioch J, Baker B, Leonard J, et al. T lymphocytes in lesional skin of patients with dermatitis herpetiformis. *Br J Dermatol* 1994; 131: 822-826.

4. Graeber M., Baker B, Garioch J, et al. The role of cytokines in the generation of skin lesions in dermatitis herpetiformis. *Br J Dermatol* 1993; 129: 530-2.
5. Baker B, Garioch J, Bokth S, et al. Absence of gluten specific T lymphocytes in the skin of patients with dermatitis herpetiformis. *J Autoimmunity* 1995; 8: 75-82.
6. Hendrix J, Magnum K, Zone J, et al. Cutaneous IgA deposits in bullous diseases function as ligands to mediate adherence of activated neutrophils. *J Invest Dermatol* 1990; 94: 667-72.
7. Dahl M, Falk J, Carpenter R, et al. Membrane attack complex of complement in dermatitis herpetiformis. *Arch Dermatol* 1985; 121: 70-2.
8. Reitamo S, Reunala T, Konttinen Y, et al. Inflammatory cells, IgA, C3, fibrin and fibronectin in skin lesions in dermatitis herpetiformis. *Br J Dermatol* 1981; 105: 167-77.
9. 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: 881-92.
10. Lorand L, Conrad S: Transglutaminases *Mol Cell Biochem* 1984; 58: 9-35.
11. Aeschliman D, Paulsson M, Mann K. Identification of Gln²⁶ in nidogen as the amine acceptor in transglutaminase-catalyzed cross-links of laminin-nidogen complexes. *J Biol Chem* 1992; 267: 11316-21.
12. Aeschliman D, Paulsson M. Cross-linking of laminin-nidogen complexes by tissue transglutaminase. A novel mechanism for basement membrane stabilization. *J Biol Chem* 1991; 266: 15308-17.
13. Kleman J, Aeschliman D, Paulsson M, et al. Transglutaminase-catalyzed cross-linking of fibrils of collagen V/XI in A204 rhabdomyosarcoma cells. *Biochemistry* 1995, 34: 13768-75.
14. Tyrell D, Sale W. Fibronectin is a component of the sodium dodecyl sulfate – in soluble transglutaminase substrate. *J Biol Chem* 1988; 263: 8468-9.
15. Fremont AJ. Adhesion molecules. *J Clinical Pathology* 1998; 51: 175-84.
16. Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990; 346: 425-34.
17. D'Auria L, Cordiali Fei P, Pietravalle M, et al. The serum levels of sE-selectin are increased in patients with bullous pemphigoid or pemphigus vulgaris. Correlation with the number of skin lesions and recovery after corticosteroid therapy. *Br J Dermatol* 1997; 137: 59-64.
52. Smith AD, Streilein RD, Hall III RP. Neutrophil CD11b, L-selectin and Fc IgA receptors in patients with dermatitis herpetiformis. *Br J Dermatol* 2002; 147: 1109-17.
19. Bouvard D, Brakebush C, Gustafsson E, et al. Functional consequences of integrin gene mutations in mice. *Circulation Research* 2001; 89: 211-23.
20. Stepp MA, Spurr-Michaud S, Tisdale A. Alpha 6 beta 4 integrin heterodimer is a component of hemidesmosomes. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87: 8970-4.
21. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002; 110: 673-87.
22. Parish WE. Inflammation. In: Rook, Wilkinson, Ebling Textbook of Dermatology. RH Champion, JL Burton, DA Burner, SM Breathnach. 6th edition, Blackwell Science Ltd. Oxford, London, Edinburgh, Massachusetts 1998: 229-76.
23. Hynes RO. Integrins: Versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992; 69: 11-25.
24. Ginsberg MH, Du X, Plow EF. Inside-out integrin signaling. *Curr Opin Cell Biol* 1992; 4: 766-71.
25. O'Toole TE, Katagiri Y, Faull RJ, et al. Integrin cytoplasmic domains mediate inside-out signal transduction. *J Cell Biol* 1994; 124: 1047-59.
26. Andrian UH, Engrlhardt B: alpha4 integrins as therapeutic targets in autoimmune disease. *N Eng J Med* 2003; 348: 65-9.
27. Merono A, Lucena C, Lopez A, et al. Immunohistochemical analysis of beta3 integrin (CD61): expression in pig tissues and human tumors. *Histol Histopathol* 2002; 17: 347-52.
28. Liu X, Timmons S, Lin Y, et al. *Proc Natl Acad Sci Medical Sciences* 2000; 93: 11819-11824.
29. Hynes RO. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 1987; 48: 549-54.
30. Plow EF, Haas TA, Zhang L, et al. Ligand binding to Integrins. *J Biol Chem* 2000; 275: 21785-8.
31. Berman AE, Kozlovz NI, Morozevich GE. Integrins: structure and signaling. *Biochemistry* 2003; 1284-99.
32. Xiong JP, Stehle T, Goodman SL, et al. New insights into the structural basis of integrin activation. *Blood* 2003, 102: 1155-9.
33. Stupack DG, Cheresch DA. Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *J Cell Sci* 2002; 115: 3729-38.
34. Sterk LM, Geuijen CA, Oomen LC, et al. The tetraspan molecule CD151, a novel constituent of hemidesmosomes, associates with the integrin alpha6beta4 and may regulate the spatial organization of hemidesmosomes. *J Cell Biol* 2000; 149: 969-82.
35. Marchisio PC, Bondanza S, Cremona O, et al. Polarized expression of integrin receptors and their relationship with the cytoskeleton and basement membrane matrix in cultured human keratinocytes. *J Cell Biol* 1991, 112: 761-73.
36. Borradori L, Koch PJ, Niessen CM, et al. The localization of Bullous Pemphigoid Antigen 180 (BP180) in hemidesmosomes is mediated by its cytoplasmatic domain and seems be regulated by the beta 4 integrin subunit. *J Cell Biol* 1997; 136: 1333-47.
37. Eody RA. The hemidesmosome: a target in autoimmune bullous disease. *Dermatology* 1994; 189 (suppl. 1): 38-41.
38. Koster J, Geerts D, Favre B, et al. Analysis of interactions between BP180, BP230, plectin and the integrin $\alpha 6 \beta 4$ important for hemidesmosome assembly. *J Cell Science* 2003; 116: 387-9.
39. Leverkus M, Bhol K, Hirako Y, et al. Cicatricial pemphigoid with circulating autoantibodies to $\beta 4$ integrin, bullous pemphigoid 180 and bullous pemphigoid 230. *Br J Dermatol* 2001; 145: 998-1004.
40. Schaapveld RQJ, Barradori L, Geerts D, et al. Hemidesmosome formation is initiated by the beta 4 integrin subunit, requires complex formation of beta 4 and HD1/Plectin and involves a direct interaction between beta 4 and the Bullous Pemphigoid Antigen 180. *J Cell Biol* 1998; 142: 271-84.
41. Kurpakus MA, Quaranta V, Jones JC. Surface relocation of alpha 6 beta 4 integrins and assembly of hemidesmosomes in an in vitro model of wound healing. *J Cell Biol* 1991; 115: 1737-50.
42. Sami N, Bhol KC, Ahmed AR. Treatment of oral pemphigoid with intravenous immunoglobulin as monotherapy. Long term follow-up: influence of treatment on antibody titres to human $\alpha 6$ integrin. *Clin Exp Immunol* 2002; 129: 533-40.
43. Shigematsu T, Specian RD, Wolf RE, et al. Identification of a functionally important sequence in the cytoplasmic tail of integrin f33 by using cell-permeable peptide analogs (signal transduction/cell adhesion/glycoprotein IIb-IIIa/peptide delivery. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: G1309-15.
44. Ghosh S, Goldin E, Gordon F H, et al. Natalizumab for active Crohn's disease. *N Engl J Med* 2003; 2; 348: 24-32.
45. Liu Z, Zhao M, Lin S, et al. Differential roles for beta 2 integrins in experimental autoimmune bullous pemphigoid. *Blood* 2006; 107: 1063-9.