

## Rola cytokin w patomechanizmie chorób pęcherzowych

### The role of cytokines in the pathogenesis of autoimmune bullous skin disease

ELŻBIETA WASZCZYKOWSKA, KATARZYNA WYSOCZAŃSKA, AGNIESZKA ŻEBROWSKA

Katedra Dermatologii i Wenerologii Uniwersytetu Medycznego, ul. Krzemieniecka 5, 94-017 Łódź

Pemfigoid, pęcherzyca i choroba Dühringa należą do grupy chorób pęcherzowych rozwijających się w wyniku procesu autoimmunizacji. Patomechanizm powstawania zmian skórnych w przebiegu tych jednostek chorobowych nie jest do końca poznany. Podobnie jak w innych chorobach o podłożu autoimmunologicznym, bierze się pod uwagę rolę odpowiedzi humoralnej i komórkowej. Połączenie przeciwciała z autoantygenem jest induktorem wielu reakcji, takich jak: uczynnienie układu dopełniacza, infiltracja i aktywacja komórek zapalnych (głównie eozynofiliów, neutrofilów i limfocytów T) oraz komórek stacjonarnych (keratynocytów, komórek tucznych). Pobudzone komórki uwalniają szereg mediatorów (m. in. cytokiny), które zapoczątkowują kaskadę reakcji prowadzących do uszkodzenia tkanek i powstania pęcherzy. W literaturze pojawia się coraz więcej doniesień dotyczących oznaczeń poziomu wybranych cytokin w surowicy, płynie pobranym z pęcherzy oraz w tkankach pobranych z okolic zmian chorobowych od pacjentów z chorobami pęcherzowymi. Blokowanie wydzielania cytokin odgrywających istotną rolę w patomechanizmie rozwoju zmian skórnych w chorobach pęcherzowych stworzyłoby nowe możliwości w leczeniu tych chorób. *Alergia Astma Immunologia, 2004, 9(4), 179-186*

**Słowa kluczowe:** choroby pęcherzowe, cytokiny

Bullous pemphigoid, pemphigus and dermatitis herpetiformis belong to the group of bullous skin diseases associated with autoimmune processes. Precise mechanism of skin lesions formation in these diseases is still unknown. Like with other autoimmune diseases the role of cell- and antibody-mediated immune reactions should be considered. Antigen-antibody reaction induces many processes such as: activation of complement and inflammatory cells (eosinophils, neutrophils and T-cells) as well as induction of stationary cells (keratinocytes and mast cells). Induced cells release large amounts of mediators such as cytokines which initiate a cascade of reactions leading to tissue damage and blister formation. There are many reports related to cytokine concentration in serum, blister fluid and lesional tissue in patients with bullous skin diseases. Inhibition of cytokines, which play an important role in pathomechanism of blister formation associated with autoimmune bullous diseases, may provide new therapeutic options. *Alergia Astma Immunologia, 2004, 9(4), 179-186*

**Key words:** bullous diseases, cytokines

Choroby pęcherzowe zaliczamy do chorób autoimmunologicznych swoistych narządowo, rozwijających się w wyniku zaburzenia tolerancji własnych antygenów. Charakteryzują się one obecnością przeciwciał skierowanych przeciwko strukturom desmosomalnym i antygenom powierzchniowym keratynocytów (dermatozy pęcherzowe akantolityczne) lub przeciwko strukturom półdesmosomów i błony podstawnej (dermatozy pęcherzowe podnaskórkowe). W obrazie klinicznym obserwujemy obecność wykwitów pęcherzowych i pęcherzykowych w obrębie skóry i/lub błon śluzowych. W zależności od miejsca tworzenia się pęcherzy, choroby pęcherzowe możemy podzielić na dwie grupy: śródskórkowe (akantolityczne), do

których zaliczamy wszystkie odmiany pęcherzy oraz podnaskórkowe, obejmujące opryszczkowe zapalenie skóry (chorobę Dühringa), pemphigoid (BP), nabyte pęcherzowe oddzielanie się naskórka (EBA) oraz liniową IgA dermatozę pęcherzową (LABD). Rozpoznanie kliniczne tych chorób, z racji ich rzadkiego występowania, jest trudne. Pełna diagnostyka opiera się na badaniach immunopatologicznych oraz badaniu histologicznym. Wykazanie w surowicy obecności krążących autoprzeciwciał i charakter złożeń immunologicznych w badaniu immunopatologicznym bezpośrednim oraz lokalizacja pęcherzy w badaniu histopatologicznym umożliwiają postawienie prawidłowej diagnozy.

### Patomechanizm powstania pęcherzy

Patomechanizm powstawania pęcherzy w przebiegu chorób pęcherzowych nie jest do końca poznany. Teoria przypisująca główną rolę obecności przeciwciał jest coraz częściej odrzucana gdyż udowodniono, że sama obecność przeciwciał nie jest wystarczająca do rozwoju zmian pęcherzowych. Obecnie uważa się, że reakcja antygen-przeciwciała uruchamia kaskadę reakcji prowadzących do przerwania połączeń międzykomórkowych i utworzenia pęcherzy. Połączenie przeciwciała z autoantygenem indukuje powstanie nacieku zapalnego składającego się w głównej mierze z eozynofików, neutrofilów i limfocytów T. Pobudzone komórki nacieku wydzielają cytokiny, z których wiele zapoczątkowuje aktywację innych komórek zapalnych. Cytokiny uwalniane są również przez keratynocyty. W efekcie mamy do czynienia ze złożoną siecią cytokinową obecną w środowisku, w którym powstają pęcherze. Zagadnienie to jest ciekawe w kontekście chorób pęcherzowych, gdyż pojawia się coraz więcej badań wykazujących obecność zwiększonej lub zmniejszonej ilości określonych cytokin w surowicy, płynie pobieranym z pęcherzy oraz wycinkach z okolicy zmian pęcherzowych [1].

### Pęcherzyca

Pęcherzyca jest przewlekłą, autoimmunologiczną chorobą skóry, charakteryzującą się histologicznie występowaniem śródskórnych pęcherzy. Cechą charakterystyczną tej jednostki jest obecność akantolizy czyli zniszczenia połączeń między keratynocytami. W wyniku połączenia przeciwciała z antygenami, keratynocyty tracą zdolności adhezyjne, co prowadzi do akantolizy i powstania pęcherzy. Kliniknym odzwierciedleniem tego procesu jest występowanie w aktywnym okresie choroby objawu Nikolskiego czyli spękania naskórka w wyniku delikatnego nawet urazu. W surowicy chorych obecne są przeciwciała klasy IgG, rzadziej IgA, skierowane przeciwko strukturom desmosomalnym (mostki łączące keratynocyty) oraz antygenom powierzchniowym keratynocytów. Przeciwciała te obecne są także w postaci złogów na powierzchni keratynocytów u wszystkich pacjentów w aktywnym okresie choroby. Głównym autoantygenem jest kadheryna – desmogleina III [2] glikoproteina przezłonowa o ciężarze cząsteczkowym 130 kDa oraz desmogleina I – 160 kDa. W pęcherzycy – modelowej chorobie autoimmunologicznej, istnieje korelacja pomiędzy poziomem wykrywanych przeciwciał a nasileniem choroby.

Pęcherzyca występuje w kilku odmianach klinicznych: pęcherzyca zwykła (*pemphigus vulgaris* – PV) to najcięższa odmiana pęcherzycy, w której zmiany występują w skórze oraz na błonach śluzowych. Pęcherze powstają na podłożu skóry zmienionej rumieniowo oraz w skórze pozornie zdrowej; odmiana pęcherzycy zwykłej – pęcherzyca bujająca (*pemphigus vegetans*) charakteryzuje się obecnością przerosłych, brodawkowych tworów w fał-

dach pachwinowych, w dołach pachowych oraz w okolicach często drażnionych (czerwień wargowa). W pęcherzycy liściastej (*pemphigus foliaceus* – PF), w której akantoliza dotyczy górnych warstw naskórka, tuż pod warstwą rogową, dominującymi zmianami są nadżerki oraz złuszczenie. Pęcherze są wiotkie i łatwo pękają, a błony śluzowe wolne są od zmian chorobowych. PF może występować w odmianach: rumieniowatej, łojotokowej i opryszczkowatej. Poza tym wyróżnia się jeszcze pęcherzycę paraneoplastyczną oraz pęcherzycę ze złogami IgA.

### Pemfigoid (*bullous pemphigoid* – BP)

Jest to przewlekła dermatosa pęcherzowa charakteryzująca się występowaniem pęcherzy podnaskórkowych, nacieku zapalnego w skórze, złogów immunoglobulin IgG (rzadziej innych klas) oraz składników dopełniacza wzdłuż błony podstawnej naskórka. Kliniknie pęcherze są dobrze napięte, twarde i pojawiają się w skórze pozornie niezmienionej lub zmienionej rumieniowo, rzadko pojawiają się również na błonach śluzowych. Zmiany skórne mogą być wielopostaciowe: pęcherze, pęcherzyki, rumienie i bąble pokrzywkowe. Wysiewom zmian może towarzyszyć świąd i pieczenie skóry. Pemfigoid występuje w kilku odmianach klinicznych: pemfigoid pęcherzowy, pęcherzykowy, zlokalizowany, łojotokowy, guzkowy erythrodermiczny, bliznowaciejący oraz pemfigoid ciężarnych. Wspólną cechą wszystkich odmian klinicznych jest obecność przeciwciał IgG (rzadziej innych klas) skierowanych przeciwko składnikom błony podstawnej. Głównymi autoantygenami są białka hemidesmosomalne oznaczane jako BP180 oraz BP230. Najistotniejszą rolę odgrywa antygen BP180 będący przezłonową glikoproteina [3]. Najbardziej immunogennym jej fragmentem jest domena zewnątrzkomórkowa NC16A. Miano przeciwciał skierowanych przeciwko temu fragmentowi koreluje z aktywnością choroby. Antygen BP230 należący do rodziny białek zwanych plakinami, zlokalizowany wewnątrzkomórkowo, związany jest z płytką (blaszką) hemidesmosomalną [4]. Diagnostyka immunologiczna BP opiera się na badaniu immunofluorescencyjnym bezpośrednim (*direct immunofluorescence* – DIF), w którym wykrywa się złogi przeciwciał IgG na granicy skórno-naskórkowej oraz na badaniu immunofluorescencyjnym pośrednim (*indirect immunofluorescence* – IIF), w którym wykrywa się krążące w surowicy przeciwciała skierowane przeciwko antygenom błony podstawnej naskórka (*basement membrane zone* – BMZ).

### Opryszczkowate zapalenie skóry (choroba Duhring, *dermatitis herpetiformis*, DH)

Jest przewlekłą chorobą pęcherzową charakteryzującą się obecnością ziarnistych złogów IgA w brodawkach skórnych i/lub wzdłuż błony podstawnej. Choroba indukowana jest przez spożywanie glutenu, i podobnie jak

w celiakii, w jej przebiegu mogą być obecne zmiany w obrębie błony śluzowej jelit, jednak o dużo mniejszym nasileniu niż w celiakii [5]. Po zastosowaniu diety eliminacyjnej negatywnie się przeciwciała skierowane przeciwko endomysium mięśni gładkich (IgAEmA), będące markerem glutenozałej enteropatii. Dopiero po około pół roku jej stosowania cofają się zmiany skórne.

Klinicznie opryszczkowe zapalenie skóry charakteryzuje się obecnością swędzącej polimorficznej osutki (pęcherzyki, grudki, rumienie, bąble pokrzywkowe) z predylekcją do zajmowania określonych części ciała, takich jak: pośladki, kolana, łokcie, okolica międzyłopatkowa, twarz oraz owłosiona skóra głowy. Błony śluzowe są wolne od zmian chorobowych. Diagnostyka opiera się na wykazaniu obecności w surowicy przeciwciał IgAEmA. W bezpośrednim badaniu immunofluorescencyjnym z okolic chorobowo zmienionej skóry, a głównie skóry pozornie zdrowej okolic nadgarstka i pośladka, wykrywa się ziarniste złogi IgA, zlokalizowane w szczytach brodawek skórnych. Czasami złogi te można również obserwować wzdłuż błony podstawnej. Oprócz IgA w tych samych miejscach obserwuje się czasem złogi składnika C3 dopełniacza. W badaniu histopatologicznym obecny jest okołonaczyniowy naciek limfocytów i monocytów, a także nagromadzenie neutrofilów i eozynofiliów w brodawkach skórnych we wczesnym okresie zmian oraz pęcherze podnaskórkowe i mikroropnie neutrofilowe Pierrarda w szczytach brodawek skórnych w zmianach dojrzałych [6,7].

### Rola cytokin w chorobach pęcherzowych

Cytokiny są małymi cząsteczkami glikoproteinowymi o niskiej masie cząsteczkowej, wydzielanymi przez aktywne komórki (limfocyty T, B, NK, makrofagi, komórki Langerhansa i inne komórki zaangażowane w przekazywanie informacji między komórkami). Jest to grupa bardzo niejednorodna pod względem budowy chemicznej, a sklasyfikowanie ich do jednej grupy jest pojęciem jedynie czynnościowym. Cytokiny regulują większość procesów biologicznych komórek. Pośredniczą w przekazywaniu sygnału między komórkami, indukują wzrost komórek, różnicowanie, chemotaksję, aktywację, wzmagają cytotoxycytność oraz uczestniczą w regulacji odporności i procesach krwiotworzenia. Są one mediatorami reakcji zapalnych i immunologicznych. Ze względu na pełnioną funkcję, cytokiny możemy podzielić na kilka grup: interferony, chemokiny, interleukiny, cytokiny biorące udział w hemopoezie. Inny podział biorący pod uwagę udział cytokin w procesie zapalnym dzieli je na cytokiny przeciwzapalne i prozapalne (monokiny). Cytokiny prozapalne, TNF- $\alpha$  czy IL-1 odpowiedzialne są za podtrzymywanie stanu zapalnego w przebiegu wielu chorób autoimmunizacyjnych. W chorobach pęcherzowych aktywność cytokin prozapalnych obserwuje się zarówno lokalnie w miejscach zmian chorobowych, w płynie pobranym z pęcherzy lub w tkankach pobranych z okolic zmian skórnych, jak i sys-

temowo w surowicy. Istnieją duże różnice w otrzymywanych wartościach poziomu cytokin w różnych badaniach. Przypuszcza się, że wynikają one z różnego czasu trwania się pęcherza [8], ciężkości choroby oraz od różnych metod ich oznaczania (użycie różnych przeciwciał).

Rodzinę limfocytów Th można podzielić w zależności od profilu wydzielanych cytokin na dwie grupy: limfocyty Th1 oraz limfocyty Th2. Th1 profil cytokinowy zaangażowany jest w wiele chorób o podłożu autoimmunologicznym i charakteryzuje się dominacją następujących cytokin: IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-12, TNF- $\beta$ . Th2 profil cytokinowy odgrywa istotną rolę w rozwoju i podtrzymaniu procesu zapalnego w przebiegu chorób alergicznych, jest charakterystyczny dla chorób atopowych i innych alergicznych, a dominującymi cytokinami są: IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 [9].

Określenie profilu cytokinowego w przebiegu chorób pęcherzowych skóry jest przedmiotem badań wielu ośrodków. Lin i wsp. [10] wykazali, że limfocyty T we wczesnej fazie immunizacji wydzielają cytokiny o profilu Th2. Podobne wyniki otrzymali Caproni i wsp. [11] oznaczając metodami: immunohistochemiczną oraz RT-PCR (*Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction*) ekspresję dominujących cytokin i obecność markerów zapalenia (granulocyty, komórki tuczne) w PV i PF w skórze zmienionej chorobowo i niezmienionej. We wszystkich próbkach pobranych ze skóry zmienionej dominował profil cytokin Th2. Rico i wsp. [9] oznaczali cytokiny o profilu Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$ ) i Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) w biopsjach tkanek pobranych z okolic pęcherzy od pacjentów z BP i PV używając technik immunohistochemii i hybrydyzacji *in situ*. Wyniki wskazują na wyraźną dominację profilu cytokinowego Th2 w przebiegu BP oraz obecność profilu mieszanego Th1/Th2 w PV [9]. Dominacja profilu Th2 (obecne IL-4, IL-5, IL-13) w BP jest o tyle ciekawa i nietypowa, że w grupie chorób autoimmunologicznych swoistych narządowo (RZS, LE, SM, *miastenia gravis*) dominującym profilem cytokinowym jest Th1. Być może poziom uwalnianych cytokin zależy od czasu trwania choroby (pacjenci w tym badaniu poddani byli biopsji we wczesnym etapie choroby), jej aktywności oraz zastosowanej terapii. Ci sami autorzy wykazali obecność profilu mieszanego Th1/Th2 w PV (obecne IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4 i nieznaczalny poziom IL-5 i IL-13 [9]). Inne badania Baroni i wsp. [12] sugerują, że w ostrej fazie pęcherzycy dominuje profil Th1 (IL-6, IFN- $\gamma$ ), natomiast w fazie przewlekłej zmniejsza się poziom IFN- $\gamma$ , a zwiększa IL-10, która jest cytokiną Th2 [12]. Odwrotne stanowisko zajmuje Hertl [13] uważając, że w PV i BP autoreaktywne limfocyty T CD4 rozpoznają epitopy zewnątrzkomórkowych fragmentów desmogleiny 3 i antygeny BP180 i powodują preferencyjnie uwalnianie profilu cytokin Th2. Wykazano, że przeciwciała IgG4- zależne od odpowiedzi Th2 przeważają w aktywnym okresie choroby, podczas gdy przeciwciała IgG1- zależne od odpowiedzi Th1 występują głównie w okresie przewlekłym tych chorób [13].

Giomi i wsp. [14] badając ekspresję tkankową cytokin w przebiegu BP technikami immunohistochemicznymi oraz hybrydyzacją *in situ*, wykazali, że w rozwiniętej fazie choroby obserwuje się mieszany profil cytokin. Autorzy wykazali zwiększoną ekspresję cytokin Th1: IFN- $\gamma$  i IL-2, Th2: IL-4 i IL-5 oraz Th3 TGF- $\beta$  [14]. Najmniej doniesień na temat dominującego profilu cytokinowego dotyczy opryszczkowego zapalenia skóry. Caproni i wsp. [7] metodą immunohistochemiczną oraz RTPCR wykazali zwiększoną ekspresję cytokin o profilu Th2 (IL-4 i IL-5) w tkankach pobranych z obszarów zmian skórnych pacjentów z DH.

### Cytokiny a pemfigoid

W badaniu histologicznym u chorych na BP w miejscu zmian chorobowych obserwuje się naciek komórek zapalnych, złożony głównie z eozynofików, limfocytów i histiocyty. Uważa się, że uszkodzenie tkanek może być zależne od obecności eozynofików, których aktywacja powoduje uwalnianie toksycznych ziarnistości tj. ECP (*eosinophilic cationic protein*), MBP (*major basic protein*) oraz peroksydazę neutrofilową [15]. W świetle tej teorii istotne jest poszukiwanie czynników chemotaktycznych zwiększających rekrutację eozynofików w obszar zmian skórnych. Najlepiej poznanym chemoatraktantem oraz kluczowym czynnikiem różnicowania i aktywacji eozynofików jest IL-5. Interleukina ta wytwarzana przez limfocyty Th2 i komórki tuczne, bierze udział w aktywacji limfocytów B i produkcji przeciwciał IgA, jest też czynnikiem wzrostu i różnicowania eozynofików oraz komórek tucznych [16]. IL-5 indukuje apoptozę eozynofików i uwalnianie z nich toksycznych ziarnistości [17,18]. Jej podwyższony poziom w surowicy, płynie pęcherzowym i tkankach okołopęcherzowych w aktywnym okresie choroby potwierdzają liczne badania [9,14,15,19,20,21]. Potencjalnym chemoatraktantem i aktywatorem eozynofików jest kooperująca z IL-5 eotaksyna. Jest to należąca do grupy C-C chemokina, której zwiększoną ekspresję zaobserwowano w chorobach z naciekiem eozynofilowym, takich jak: astma oskrzelowa, przewlekłe zapalenie zatok czy AZS. Wyniki badań Shrikhande i wsp. [15] wykazały znacznie podwyższone stężenie tej chemokiny zarówno w zmianach pęcherzowych (płynie pobranym z pęcherzy), jak i w surowicy pacjentów z BP w porównaniu z grupą kontrolną. Podobne rezultaty badań otrzymali Wakugawa i wsp. [22], którzy dodatkowo wykazali korelację między poziomem eotaksyny w płynie pęcherzowym oraz liczbą eozynofików obecnych w tym płynie. W przeprowadzonym przez nich badaniu immunohistochemicznym ekspresja eotaksyny w keratynocytach wokół zmian pęcherzowych była znacznie podwyższona w stosunku do grupy porównawczej. Eotaksyna w kooperacji z IL-5 wywołuje i nasila dojrzewanie i aktywację eozynofików w szpiku kostnym oraz ich gwałtowny wyrzut do krążenia. Gerber i wsp. stwierdzili, że receptor CCR3 dla eotak-

syny wykazuje selektywną ekspresję na limfocytach Th2 [23]. Znaczenie tej chemokiny może być więc istotne nie tylko ze względu na jej działanie chemotaktyczne w stosunku do eozynofików, ale także limfocytów Th2. Z kolei uwalnianie z limfocytów Th2 cytokin: IL-4, IL-5, IL-13 może w mechanizmie sprzężenia zwrotnego powodować wzrost stężenia eotaksyny. Badając patomechanizm powstawania pęcherzy w przebiegu BP nie sposób pominąć istotnej roli jaką odgrywają limfocyty T. Wiadomo, że limfocyty T zwłaszcza o profilu Th2 zwiększają produkcję przeciwciał oddziałując na limfocyty B. Limfocyty T są jednymi z pierwszych komórek nacieku zapalnego rozwijającego się w obrębie zmian skórnych w BP [9]. Udowodniono również, że sama obecność przeciwciał nie jest wystarczająca do indukcji zmian pęcherzowych [24]. Pobudzone limfocyty T uwalniają między innymi sCD4 oraz sCD8. Poziom tych cząstek w surowicy koreluje z aktywnością wielu chorób o podłożu immunologicznym, zapalnym i infekcyjnym. Sun i wsp. [1] badali poziom tych cząstek w płynie pęcherzowym oraz poszukiwali zależności między ich stężeniem a stężeniem określonych cytokin. Stosując metodę ELISA wykazali oni zwiększony poziom sCD4 oraz w nieco mniejszym stopniu sCD8 w płynie pęcherzowym pacjentów z BP. Autorzy zaobserwowali także odwrotną korelację pomiędzy poziomem sCD4 i IL-10 oraz dodatnią korelację między poziomem sCD8 a poziomem IL-8 w płynie pęcherzowym pacjentów z BP. Wynik taki potwierdza immunosupresyjne działanie IL-10 na limfocyty T. Ostatnio podkreśla się rolę IL-10 w patogenezie różnych chorób zapalnych i autoimmunologicznych. Jej źródłem mogą być zarówno limfocyty Th2, makrofagi, jak i keratynocyty. Wydaje się, że cytokina ta może odgrywać więc istotną rolę w hamowaniu zapalenia rozwijającego się przy udziale limfocytów T. IL-10 pobudza odpowiedź limfocytów Th2, hamuje odpowiedź limfocytów Th1 i aktywuje limfocyty B. W badaniu Sun i wsp. [1] nie potwierdzili wyników przedstawionych przez Schmidta i wsp. [25] dotyczących zwiększonego poziomu IL-10 w płynie pęcherzowym w stosunku do poziomu tej interleukiny w surowicy tych samych chorych. Podobne wyniki dotyczyły IL-6 oraz TNF- $\alpha$  [1]. Wykazano także obecność korelacji między poziomem sCD8 a poziomem IL-8. Poziom IL-8 w płynie pęcherzowym był istotnie wyższy w porównaniu z surowicą pacjentów, jak również grupą porównawczą osób zdrowych. Wyniki te potwierdzają wcześniejsze badania Ameglio i wsp. [26]. W tym samym badaniu wykazano zwiększony poziom IL-8 także w płynie pobranym z pęcherzy sztucznie wytworzonych w mechanizmie ssania, co sugeruje, że podwyższony poziom IL-8 może być niezależny od sposobu w jakim powstają pęcherze.

IL-8 jest najlepiej poznaną  $\alpha$ -chemokina o silnych właściwościach chemotaktycznych w stosunku do neutrofilów, limfocytów i monocytów [12]. Schmidt i wsp. [27] wykazali dużo wyższe stężenia IL-8 w płynie pęcherzowym

w porównaniu z surowicą tych samych pacjentów, co sugeruje miejscowe uwalnianie tej cytokiny w trakcie powstawania pęcherzy. Wykrycie IL-8 w płynie pęcherzy wytworzonych przez ssanie jest zgodne z dotychczasowymi doniesieniami Kuhna [28]. Autor ten badał poziom IL-8 w takich pęcherzach w ciągu 24 godzin. W ciągu pierwszych 5 godzin nie zaobserwowano różnic w poziomie uwalnianej IL-8. Znamienny wzrost uwalniania IL-8 następował między 8 a 24 godziną. Źródłem IL-8 mogą być komórki stacjonarne skóry: keratynocyty, fibroblasty, komórki endothelium, komórki tuczne lub napływające z krążenia monocyty/makrofagi, limfocyty T czy neutrofile. Wszystkie te komórki obserwuje się w miejscach zmian skórnych w przebiegu BP. Kristensen i wsp. [29] stosując metody biologii molekularnej nie wykazali obecności mRNA dla IL-8 w naskórku pobranym z pęcherzy, co sugeruje, że źródłem IL-8 nie są prawdopodobnie komórki stacjonarne. Wysoki poziom IL-8 w przeciwieństwie do większości innych cytokin utrzymuje się dłużej w miejscach zmian skórnych, co wynika z oporności IL-8 na proteazy degradujące. Zupełnie inne wyniki otrzymał w swoim badaniu nad IL-8 oraz Bornscheuer [30]. Stosując metodę immunohistochemii przy użyciu przeciwciał przeciwko IL-8 oraz RATNES nie znalazł różnic w ekspresji tych chemokin w skórze osób zdrowych oraz pacjentów z BP, PV, DH [30].

Badania japońskiej grupy Teraki i wsp. [31] nad rolą cytokin w patomechanizmie rozwoju zmian skórnych udowadniają, że zwiększony poziom IL-4 oraz IL-13 w surowicy oraz w płynie pęcherzowym pacjentów z BP jest wynikiem uwalniania tych cytokin z limfocytów T. Wyniki te otrzymano stosując metodę cytofluorometrii przepływowej, a większość badań nad cytokinami w chorobach pęcherzowych przeprowadzanych jest w oparciu o metodę ELISA. Jednocześnie ci sami autorzy zaobserwowali istotny spadek poziomu IL-13 po terapii kortykosteroidowej oraz zwiększone stężenie IL-10 w okresie remisji BP.

Schmidt i wsp. [32] przeprowadzili eksperyment *in vitro* na hodowli ludzkich keratynocytów (*normal human epidermal keratinocytes* – NHEK) inkubowanych w środowisku przeciwciał IgG pobranych od pacjentów z BP lub królików immunizowanych rekombinowaną ludzką BP180-NC16A. Celem badania było sprawdzenie hipotezy sugerującej, że reakcja antygen-przeciwciała BP180 wywołuje sygnał transdukcji prowadzący do uwalniania prozapalnych cytokin z komórek keratynocytów. Na podstawie wykonanych oznaczeń stwierdzono zwiększony poziom (zależny od czasu) IL-6 oraz IL-8 w porównaniu z grupą porównawczą, natomiast poziom innych badanych cytokin: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ ,  $\beta$ , IL-10 był nieoznaczalny. Wyniki te potwierdzono obecnością mRNA dla IL-6 i IL-8 [32].

Wyraźnie zwiększone stężenie IL-6 oraz w mniejszym stopniu zwiększony poziom TNF- $\alpha$  u pacjentów z BP zaobserwowali także Rhodes i wsp. [33]. IL-6 aktywuje limfocyty T i B oraz indukuje migrację limfocytów *in vitro*, wpływa na zwiększone uwalnianie białek ostrej fazy. Jej źródłem są prawdopodobnie makrofagi i keratynocyty. TNF- $\alpha$  zaś aktywuje oraz nasila adhezję neutrofilów, stymuluje limfocyty T oraz wpływa na uwalnianie prostaglandyn oraz innych cytokin np. IL-6. Badania u tych samych pacjentów wykazały dużo wyższe stężenia IL-6 i TNF- $\alpha$  w płynie pęcherzowym niż w surowicy [33].

Zarówno w PV, jak i w BP, oprócz złogów przeciwciał i komplementu obserwuje się obecność nacieku komórkowego złożonego z leukocytów, eozynofiliów, neutrofilów, monocytów/makrofagów i trombocytów. W BP zaobserwowano zwiększoną akumulację bazofilów i komórek tucznych, a także złogów IgE w błonie podstawnej oraz zwiększony poziom IgE w surowicy i płynie pobranym z pęcherzy [34]. Uznaje się, że akantoliza jest wynikiem obecności endogennych proteinaz aktywowanych w reakcji immunologicznej [35]. Badania Grando i wsp. [5] wykazały obecność mediatorów zapalnych w płynie pęcherzowym pacjentów z PV i BP. Autorzy brali pod uwagę zarówno czas powstania pęcherzy, jak i trwania choroby. Wydaje się, że początkowo wysoki poziom IL-1 w płynie pęcherzowym może być wynikiem aktywności komórek prezentujących antygen (również keratynocytów). Aktywność IL-1 wykazującej zdolność aktywacji endoproteaz stymuluje produkcję i sekrecję białek ostrej fazy. W świeżo powstałych pęcherzach oznaczono także wysoki poziom eikozanoidów. Uwalniane metabolity kwasu arachidonowego bezpośrednio wpływają na zmniejszenie poziomu IL-1. Naciek zaś komórek zapalnych w okolicy skóry zmienionej jest wynikiem chemotaktycznego działania mediatorów pierwszej fazy: cytokin, eikozanoidów i enzymów [5].

Badania Schmidta i wsp. [25] przy użyciu metody ELISA wykazały zwiększoną ekspresję IL-4, IL-6 IL-10 w płynie pęcherzowym, natomiast poziom innych cytokin IL-3 i GM-CSF był taki sam jak w grupie porównawczej [25].

Przeprowadzone badania u pacjentów z BP, w których poszukiwano zależności między aktywnością choroby a poziomem określonych cytokin, wykazały korelację między ilością zmian skórnych (nasileniem choroby) a poziomem IL-6 i TNF- $\alpha$  w surowicy chorych [36]. Wyniki badań Inaoki i Takehara [19], w których zaobserwowano istotne zmniejszenie się poziomu IL-6 oraz IL-8 w surowicy u pacjentów po leczeniu sugerują, że cytokiny te mogą być wskaźnikami aktywności choroby. W tym samym badaniu nie wykazano zwiększonego w surowicy poziomu IL-2, IL-4, IL-13, sIL2R ani sCD23. Z kolei Engineer i wsp. [20] zaobserwowali istotnie statystycznie zwiększony poziom IL-5 w surowicy i płynie z pęcherzy

pacjentów w aktywnym okresie choroby oraz normalizację poziomu IL-5 w okresie remisji w stosunku do grupy porównawczej [20].

### Cytokiny a pęcherzyca

Anhalt i wsp. już w 1982 roku udowodnili, że pęcherzyca może zostać wyindukowana u myszy poprzez bierne przeniesienie przeciwciał IgG od pacjentów PV [37]. Autorzy potwierdzili w ten sposób autoimmunologiczne podłoże tej choroby. Autoprzeciwciała u pacjentów z pęcherzycą obecne są zarówno w surowicy, jak i na powierzchni keratynocytów. Obecność przeciwciał nie tylko w obrębie zmian pęcherzowych, ale również w otoczeniu skóry niezmienionej chorobowo sugeruje konieczność występowania równoległe obok odpowiedzi humoralnej, odpowiedzi komórkowej koniecznej do indukcji zmian pęcherzowych [38]. Istotną rolę odpowiedzi komórkowej w patomechanizmie zmian pęcherzowych w pęcherzycy podkreślał także Zillikens [39] i Lin [10]. Jednym z głównych mechanizmów, poprzez który działają limfocyty T jest uwalnianie cytokin. D'Auria i wsp. [40] wykazali podwyższony poziom IL-6 oraz TNF w surowicy pacjentów z PV oraz istnienie korelacji między poziomem tych cytokin a aktywnością choroby. Cytokiną wpływającą na obniżenie poziomu IL-6 i IL-1 jest IL-10, stąd uważa się, że istnieje potencjalna możliwość zastosowania tej interleukiny w terapii PV [5,41].

Baroni i wsp. [12] porównywali poziom IL-10, IL-8 oraz IFN- $\gamma$  w płynie z pęcherzy oraz surowicy pacjentów z pęcherzycą. Poziom oznaczanych cytokin był zdecydowanie wyższy w płynie pęcherzowym w porównaniu z surowicą, co może świadczyć o ich lokalnej produkcji. Jak wiadomo z badań *in vitro*, keratynocyty mają zdolność miejscowej produkcji różnych cytokin. Wykonane oznaczenia wykazały podwyższony poziom IL-8 zarówno w płynie pęcherzowym, jak i w surowicy pacjentów z PV w porównaniu z grupą porównawczą. Poziom zaś IL-10 był podwyższony jedynie w płynie pobranym z pęcherzy, natomiast w surowicy badanych pacjentów jak i w grupie porównawczej był nieoznaczalny. Wyniki takie poddają pod dyskusję przeciwzapalną rolę IL-10 w przewlekłej pęcherzycy, jak również nie potwierdzają wcześniejszych doniesień Bhole i wsp. [42], którzy wykazali zwiększone stężenie IL-10 zarówno w płynie z pęcherzy, jak i surowicy pacjentów z PV. Poziom tej cytokiny w płynie z pęcherzy był dziesięciokrotnie większy w porównaniu z surowicą tych samych pacjentów. Zwiększony poziom IL-10 obserwowano w surowicy 87,5% pacjentów z aktywną PV w porównaniu z osobami zdrowymi. W okresie remisji zwiększony poziom obserwowano tylko u 12,5% pacjentów. W grupie porównawczej osób zdrowych oznaczalny poziom IL-10 wykazano tylko u 4,6% osób. W tym samym badaniu autorzy wykazali istnienie korelacji między poziomem IL-10 a aktywnością choroby. Odmienne wyniki dotyczące IL-8 otrzymał Bornscheuer [30], który sto-

sując metodę immunohistochemii badał uszkodzoną skórę u pacjentów z BP, PV, DH przy użyciu przeciwciał przeciwko IL-8 oraz RATNES. W badaniu tym nie uzyskał żadnych różnic w ekspresji badanych chemokin w porównaniu z grupą porównawczą.

Toto i wsp. [43] zaproponowali model, w którym limfocyty T odgrywają istotną rolę inhibitorów akantolizy produkując przeciwzapalną IL-10. IFN- $\gamma$  [12] wykrywany był u wszystkich pacjentów natomiast w grupie kontrolnej był nieoznaczalny. Wskazuje to na systemową aktywację profilu Th1.

Istnieją także doniesienia o zwiększonym poziomie rozpuszczalnego receptora IL-2 (sIL-R2) w surowicy pacjentów z pęcherzycą oraz korelacji jego poziomu z aktywnością choroby [39]. Jeszcze wyższy poziom sIL-R2 oznaczono w płynie pęcherzowym tych samych pacjentów, co wskazuje na obecność aktywnych limfocytów T w obrębie uszkodzonej skóry i jej okolicach [39].

Badania w odmianie brazylijskiej pęcherzycy liściastej [44] potwierdzają dominację profilu Th2 cytokin (zwiększony poziom IL-10, obniżone zaś stężenia IL-2, IFN- $\gamma$  i IL-4 i IL-5). IL-10 stymuluje proliferację limfocytów B i produkcję przeciwciał oraz hamuje odpowiedź Th1. Zwiększona ilość limfocytów B odpowiedzialna jest za wzrost stężenia IL-12, która z kolei hamuje odpowiedź Th2. Być może zwiększony poziom tej cytokiny jest przyczyną obniżonego stężenia IL-4 i IL-5 [44].

### Cytokiny a opryszczkowe zapalenie skóry (Choroba Dühringa, *dermatitis herpetiformis*)

Istnieje hipoteza, że autoprzeciwciała IgA aktywują na drodze alternatywnej dopełniacz, prowadząc do pojawienia się czynników chemotaktycznych dla komórek zapalnych. Fakt, że złogi C3 fragmentu dopełniacza oraz C5-C9 kompleksu atakującego błonę obserwuje się także w klinicznie niezmienionej skórze [45] wskazuje, że w patomechanizmie powstawania pęcherzy biorą udział także inne czynniki.

Graeber i wsp. [6] badając rolę wybranych cytokin w tworzeniu nacieku zapalnego i uszkodzeń skóry w chorobie Dühringa wykazali zwiększony poziom IL-8 w warstwie podstawnej naskórka i keratynocytach. Może to mieć istotne znaczenie, ponieważ IL-8 jest silnym chemoatraktantem dla neutrofilów. W tym samym badaniu oznaczono także zwiększoną ekspresję GM-SCF (*granulocyte macrophage colony stimulating factor*) w obrębie zmian skórnych pacjentów z DH. Czynnikiem ten stymuluje ekspresję receptorów IgAFc na komórkach wielojądrowych PMN (*polymorpho-nuclear neutrophils*) i tą drogą może zwiększać adhezję tych komórek w złożach IgA. W konsekwencji powoduje to aktywację komórek PMN oraz uwalnianie z nich enzymów odpowiedzialnych za tworzenie pęcherzy w DH. Autorzy w dalszej części badań poszukując czynników mogących wpływać na zwiększoną

ekspresję IL-8, nie wykazali zwiększonej ekspresji IL-1, IL-6 ani TNF- $\alpha$ , które mogłyby spełniać taką funkcję. Badacze uważają jednak, że stosowana przez nich metoda była mało czuła i podtrzymują teorię o istotnym znaczeniu IL-1. Wiadomo, że źródłem IL-1 mogą być komórki naskórka, a jej uwalnianie może być indukowane wieloma czynnikami, takimi jak uraz – uszkodzenie naskórka, a także innymi czynnikami immunologicznymi. Wiadomo, że zmiany skórne w DH powstają szczególnie w miejscach najbardziej narażonych na pocieranie i urazy, co może powodować zwiększone uwalnianie IL-1 z komórek naskórka. IL-1 jest silną limfokiną i uwalnianie jej z keratynocytów nawet w niewielkiej ilości może powodować zwiększone uwalnianie IL-8 i GM-CSF obserwowane w uszkodzonej skórze pacjentów z DH.

Obecność złogów IgA w skórze niezmięnionej sugeruje, że do rozwoju uszkodzeń potrzebna jest nie tylko obecność IgA oraz aktywacja komplementu, ale także pojawienie się nacieku komórkowego [7]. Caproni i wsp. [7] metodą immunohistochemiczną oraz RTPCR wykazali zwiększoną ekspresję cytokin o profilu Th2 (IL-4 i IL-5) w tkankach pobranych z obszarów zmian skórnych pacjentów z DH.

IL-4 wytwarzana przez limfocyty Th2 i komórki tuczne jest czynnikiem wzrostu i różnicowania limfocytów (głównie Th2). Cytokina ta bierze udział w procesie przełączania klas wytwarzanych immunoglobulin na IgE, a także hamuje odpowiedź limfocytów Th1. Wpływa również na infiltrację eozynofiliów do tkanek poprzez promowanie ich migracji przez nabłonek naczyń. IL-4 jest także czyn-

nikiem zwiększającym poziom cząstek adhezyjnych dla eozynofiliów takich jak ICAM-1 i VCAM-1 [46].

W nacieku okołokomórkowym oznaczono również IFN- $\gamma$ , jednak wyniku tego nie udało się potwierdzić w reakcji PCR. W tym samym badaniu zaobserwowano dodatnią silną reakcję na obecność białek kationowych eozynofiliów. Wynik ten dostarcza dowodów nie tylko na istotną rolę, jaką odgrywają eozynofile w rozwoju uszkodzeń skóry w przebiegu DH, ale także możliwość miejscowej syntezy IL-5 przez same eozynofile w miejscach zmian skórnych [47].

Wydzielanie cytokin może być hamowane również poprzez ich inhibitory. Związki te możemy podzielić na swoiste i nieswoiste. Znane są dwie grupy białek będące inhibitorami cytokin: 1. Antagoniści receptorów, które po związaniu się z receptorem danej cytokiny nie wywołują aktywacji komórki. Przykładem może być antagonist receptoru dla IL-1. 2. Rozpuszczalne inhibitory cytokin, czyli antagoniści cytokin blokujący receptory, a same cytokiny. Są to, jak dowodzą badania, fragmenty złuszczonej na drodze enzymatycznej domen zewnątrzkomórkowych receptorów cytokinowych. Przykładem takiego antagonisty jest obecny w surowicy rozpuszczalny receptor dla IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IFN- $\gamma$ , TNF. Ten ostatni z powodzeniem stosowany jest w terapii reumatoidalnego zapalenia stawów.

Możliwość blokowania uwalnianych cytokin oraz regulowanie ich ekspresji stworzyłoby nowe możliwości w leczeniu wielu chorób, między innymi chorób o podłożu autoimmunologicznym.

## Piśmiennictwo

- Sun CC, Wu J, Wong TT i wsp. High levels of interleukin-8 soluble CD4 and soluble CD8 in bullous pemphigoid blister fluid. The relationship between local cytokine production and lesional T-cell activities. *Br J Dermatol* 2000; 143: 1235-1240.
- Amagai M. Adhesion molecules. I: Keratinocyte-keratinocyte interactions; cadherin and pemphigus. *J Invest Dermatol* 1995; 104: 146-152.
- Liu Z, Diaz LA, Troy JL i wsp. A passive transfer model of the organ-specific autoimmune disease, bullous pemphigoid, using antibodies generated against the hemidesmosomal antigen, BP180. *J Clin Invest* 1993; 92: 2480-2488.
- Schmidt E, Brocker EB, Zillikens J. New aspect on the pathogenesis of bullous pemphigoid. *Hautarzt* 2000; 51: 637-645.
- Grando SA, Glukhenky BT, Drannik GN i wsp. Mediators of Inflammation in Blister Fluids From Patients With Pemphigus Vulgaris and Bullous Pemphigoid. *Arch Dermatol* 1989; 125: 925-930.
- Graeber M, Baker BS, Garioch JJ i wsp. The role of cytokines in the generation of skin lesions in dermatitis herpetiformis. *Br J Dermatol* 1993; 129: 530-532.
- Caproni M, Feliciani C, Fuligni A i wsp. Th2-like cytokine activity in dermatitis herpetiformis. *Br J Dermatol* 1998; 138: 242-247.
- Giachalone B, D'Auria L, Ferraro C et i wsp. Bullous pemphigoid blisters of the same duration have similar cytokine concentrations which decrease in older blisters. *Br J Dermatol* 1998; 139: 158-159.
- Rico MJ, Benning C, Weingart ES i wsp. Characterization of skin cytokines in bullous pemphigoid and pemphigus vulgaris. *Br J Dermatol* 1999; 140: 1079-1086.
- Lin MS, Swartz SJ, Lopez A i wsp. Development and Characterization of Desmoglein-3 Specific T Cells from Patients with Pemphigus Vulgaris. *J Clin Invest* 1997; 99: 31-40.
- Caproni M, Giomi B, Cardinali C i wsp. Further Support for a Role for Th2-like Cytokines in Blister Formation of Pemphigus. *Clin Immunol* 2001; 98: 264-271.
- Baroni A, Perfetto B, Ruocco E. Cytokine Pattern in Blister Fluid and Sera of Patients with Pemphigus. *Dermatology* 2002; 205: 116-121.
- Hertl M. Humoral and cellular autoimmunity in autoimmune bullous skin disorders. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 122: 91-100.
- Giomi B, Caproni M, Calzolari A i wsp. Th1, Th2 and Th3 cytokines in the pathogenesis of bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci* 2002; 30: 116-128.
- Shrikhande M, Hunziker T, Braathen LR i wsp. Increased Coexpression of Eotaxin and Interleukin 5 in Bullous Pemphigoid. *Acta Derm Venereol* 2000; 80: 277-280.
- Marsh MN, Hinde J. Inflammatory component of celiac sprue mucosa. I. Mast cells, basophils, and eosinophils. *Gastroenterology* 1985; 89: 92-100.

17. Fujisawa T, Abu-Ghazaleh R, Kita H i wsp. Regulatory effect of cytokines on eosinophil degranulation. *J Immunol* 1990; 144: 642-646.
18. Kita H, Weiler DA, Abu-Ghazaleh R i wsp. Release of granule proteins from eosinophils cultured with IL-5. *J Immunol* 1992; 149: 629-635.
19. Inaoki M, Takehara K. Increased serum levels of interleukin IL-5, IL-6 and IL-8 in bullous pemphigoid. *J Dermatol Sci* 1998; 16: 152-157.
20. Engineer L, Bhol K, Kumari S i wsp. Bullous pemphigoid: interaction of interleukin 5 antibasement membrane zone antibodies and eosinophils. A preliminary observation. *Cytokine* 2001; 13: 32-38.
21. D'Auria L, Pimpinelli F, Ferraro C i wsp. Relationship between theoretical molecular weight and blister fluid/serum ratio of cytokines and five other molecules evaluated in patients with bullous pemphigoid. *J Biol Regul Homeost Agents* 1998; 12: 76-80.
22. Wakugawa M, Nakamura K, Hino H i wsp. Elevated levels of eotaxin and interleukin-5 in blister fluid of bullous pemphigoid: correlation with tissue eosinophilia. *Br J Dermatol* 2000; 143: 112-116.
23. Gerber BO, Zanni MP, Ugucioni M i wsp. Functional expression of the eotaxin receptor CCR3 in T lymphocytes colocalizing with eosinophils. *Curr Biol* 1997; 7: 836-843.
24. Gammon WR, Merritt CC, Lewis DM i wsp. An in vitro model of immune complex-mediated basement membrane zone separation caused by pemphigoid antibodies, leukocytes and complement. *J Invest Dermatol* 1982; 78: 285-290.
25. Schmidt E, Bastian B, Dummer R i wsp. Detection of elevated levels of IL-4, IL-6 and IL-10 in blister fluid of bullous pemphigoid. *Arch Dermatol Res* 1996; 288: 353-357.
26. Ameglio F, D'Auria L, Bonifati C i wsp. Cytokine pattern in blister fluid and serum of patients with bullous pemphigoid: relationship with disease intensity. *Br J Dermatol* 1998; 138: 611-614.
27. Schmidt E, Ambach A, Bastian B i wsp. Elevated levels of interleukin-8 in blister fluid of bullous pemphigoid compared with suction blisters of healthy control subjects. *J Am Acad Dermatol* 1996; 34: 310-312.
28. Kuhns DB, DeCarlo E, Hawk i wsp. Dynamics of the cellular and humoral components of the inflammatory response elicited in skin blister in humans. *J Clin Invest* 1992; 89: 1734-1740.
29. Kristensen M, Larsen CG, Jorgensen P i wsp. RNA purification from epidermal suction blister. *Acta Derm Venereol* 1991; 71: 423-426.
30. Bornscheuer E, Zillikens D, Schroeder JM i wsp. Lack of Expression of Interleukin 8 and RATNES in Autoimmune Bullous Skin Diseases. *Dermatology* 1999; 198: 118-121.
31. Yuichi T, Takayuki H, Tetsuo S. Skin-Homing Interleukin-4 and 13-Producing Cells Contribute to Bullous Pemphigoid: Remission of Disease is Associated with Increased Frequency of Interleukin-10-Producing Cells. *J Invest Dermatol* 2001; 117: 1097-1102.
32. Schmidt E, Reimer S, Kruse N i wsp. Autoantibodies to BP180 Associated with Bullous Pemphigoid Release Interleukin-6 and Interleukin-8 from Cultured Human Keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2000; 115: 842-848.
33. Rhodes LE, Hashim IA, McLaughlin PJ i wsp. Blister Fluid cytokines in Cutaneous Inflammatory Bullous Disorders. *Acta Derm Venereol* 1999; 79: 288-290.
34. Dvorak AM, Mihm MC Jr, Osage Je i wsp. Bullous pemphigoid, an ultrastructural study of the inflammatory response: eosinophil, basophil and mast cell granule changes in multiple biopses from one patient. *J Invest Dermatol* 1982; 78: 91-101.
35. Naito K, Morioka S, Ogawa H. The pathogenic mechanisms of blister formation in bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol* 1982; 79: 303-306.
36. D'Auria L, Mussi A, Bonifati C i wsp. Increased serum IL-6, TNF-alpha and IL-10 levels in patients with bullous pemphigoid: relationship with disease activity. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 1999; 12: 11-15.
37. Anhalt GJ, Labib RS, Voorhees JJ i wsp. Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of IgG from patients with the disease. *N Engl J Med* 1982; 306: 1189-1196.
38. Judd KP, Lever WF. Correlation of antibodies in skin and serum with disease severity in pemphigus. *Arch Dermatol* 1979; 115: 428-432.
39. Zillikens D, Ambach A, Zenter A i wsp. Evidence for cell-mediated immune mechanisms in the pathology of pemphigus. *Br J Dermatol* 1993; 128: 636-643.
40. D'Auria L, Bonifati C, Mussi A i wsp. Cytokines in the sera of patients with pemphigus vulgaris: interleukin 6 and tumor necrosis factor-alpha levels are significantly increased as compared with healthy subjects and correlate with disease activity. *Eur Cytokine Net* 1997; 8: 383-387.
41. Schmidt E, Bastian B, Dummer R i wsp. Detection of elevated levels of IL-4, IL-6 and IL-10 in blister fluid of bullous pemphigus. *Arch dermatol Res* 1996; 288: 353-357.
42. Bhol KC, Rojas AI, Khan IU i wsp. Presence of interleukin 10 in the serum and blister fluid of patients with pemphigus vulgaris and pemphigoid. *Cytokine* 2000; 12: 1076-1083.
43. Toto P, Feliciani C, Amerio P i wsp. Immune Modulation in Pemphigus Vulgaris: Role of CD 28 and IL-10. *J Immunol* 2000; 164: 522-529.
44. Zeoti DM, Figureiedo JF, Chioffi MP i wsp. Serum cytokines in patients with Brazilian pemphigus foliaceus (fogo selvagem). *Braz J Med Biol Res* 2000; 33: 1065-1068.
45. Dahl MV, Falk RJ, Carpenter R i wsp. Membrane attack complex of complement in dermatitis herpetiformis. *Arch Dermatol* 1985; 121: 70-72.
46. Durham SR, Ying S, Varney VA i wsp. Cytokine messenger RNA expression for IL-3, IL-4, IL-5, and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor in the nasal mucosa after local allergen provocation: relationship to tissue eosinophilia. *J Immunol* 1992; 148: 2390-2394.
47. Desreumaux P, Janin A, Delaporte E i wsp. Parallel interleukin 5 synthesis by eosinophils in duodenal and skin lesions of a patient with dermatitis herpetiformis. *Gut* 1995; 37: 132-135.
48. D'Auria L, Cordiali FP, Ameglio F. Cytokines and bullous pemphigoid. *Eur Cytokine Net* 1999; 10: 123-134.