

Opracowanie udoskonalonego modelu tworzenia pęcherzy mającego na celu wyjaśnienie funkcji IL-17B w odpowiedzi zapalnej związanej z pemfigoidem pęcherzowym

mgr Artur Jędreas

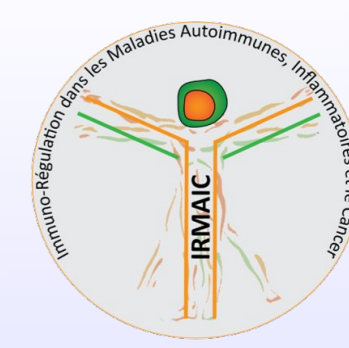
Promotor pracy: dr Sylwia Michorowska, Opiekun naukowy: dr Sebastien Le Jan
Praca wykonana w Zakładzie Chemii Leków, Analizy Farmaceutycznej i Biomedycznej



WARSZAWSKI
UNIWERSYTET
MEDYCZNY
WYDZIAŁ
FARMACEUTYCZNY



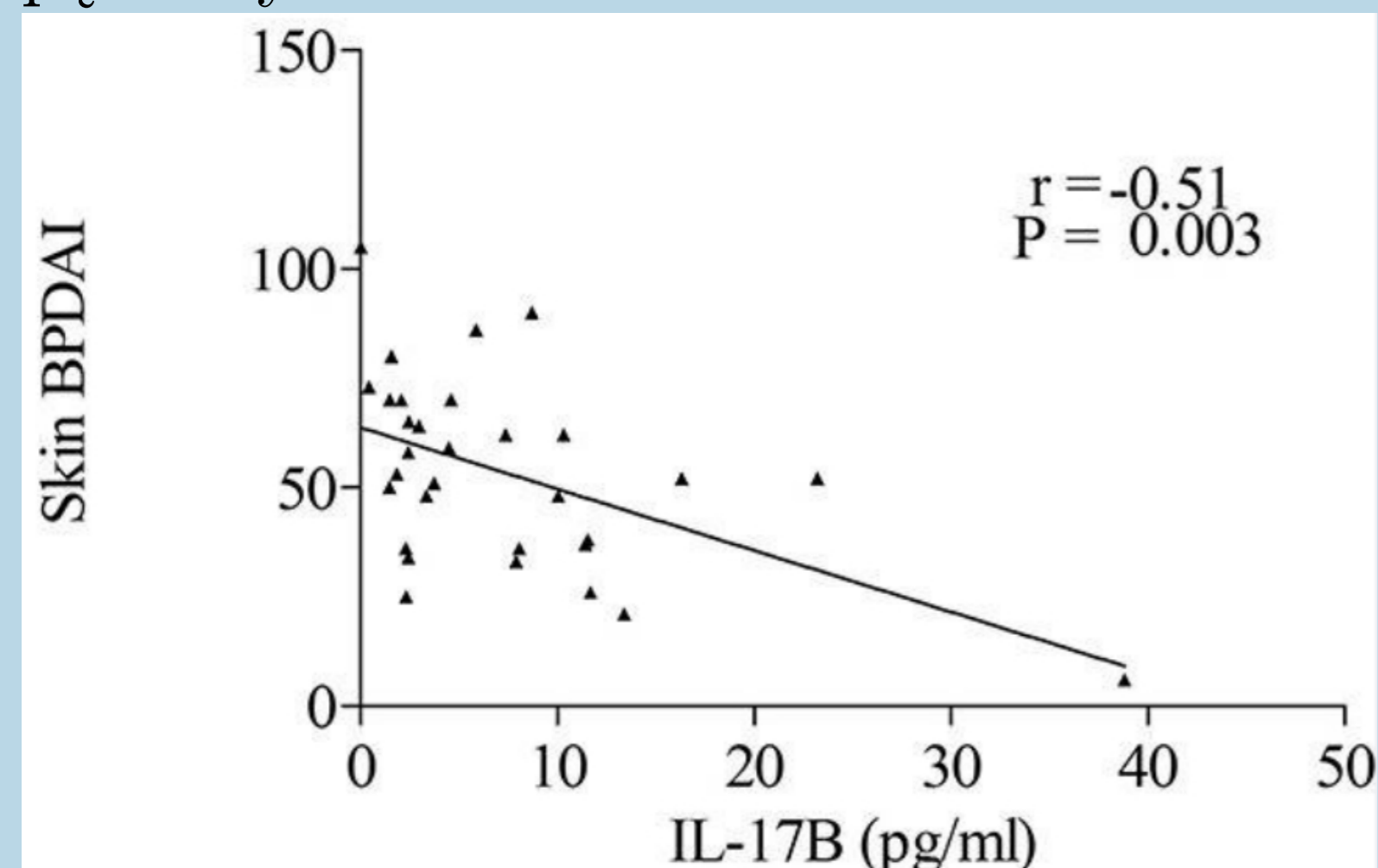
WARSZAWSKI
UNIWERSYTET
MEDYCZNY



Wprowadzenie

Pemfigoid pęcherzowy (BP)

-autoimmunologiczna choroba pęcherzowa skóry, która występuje głównie u osób starszych, znacząco wpływając na ich zdrowie i jakość życia. Laboratorium IRMAIC zidentyfikowało IL-17B w surowicy i płynie pęcherzowym pacjentów z BP i potwierdziło ujemną korelację między poziomami IL-17B w płynie pęcherzowym, a punktacją związaną z pęcherzami i nadzerkami, co sugeruje potencjalną ochronną rolę IL-17B w powstawaniu pęcherzy w BP.



Wyk.1 Ujemna korelacja między IL-17B a aktywnością choroby [1].

Cele pracy

1. Analiza składników komórkowych i molekularnych oraz funkcji osi IL-17B/IL-17 receptor B (IL-17RB) w momencie rozpoznania BP.

Identyfikacja komórek krwi, które mogą potencjalnie reagować na IL-17B, poprzez ocenę ekspresji IL-17RB i IL-17RA na komórkach limfoidalnych, a zwłaszcza wrodzonych komórkach limfoidalnych (ILCs).

2. Opracowanie modelu *ex vivo* separacji skóry właściwej i naskórka, w celu zbadania roli IL-17B w procesie tworzenia się pęcherzy.

Metody

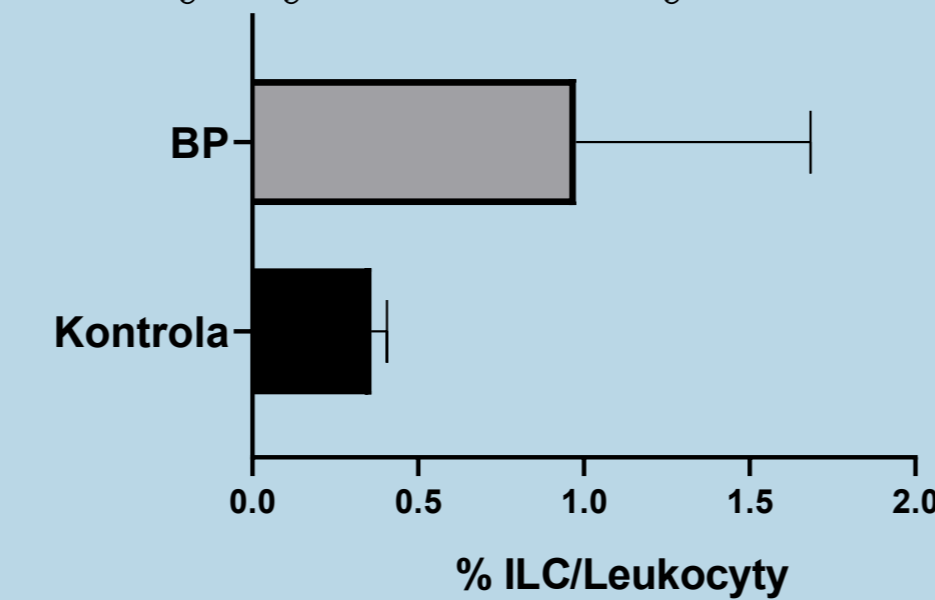
1. Badanie pilotażowe z udziałem 3 pacjentów z BP, z których u dwóch doszło do nawrotu choroby, a także 3 osób z grupy kontrolnej dobranych pod względem płci i wieku. Od wszystkich 6 osób pobrano komórki jednojądrzaste krwi obwodowej (PBMC) na początku leczenia oraz dodatkowo w 60 i 90 dni po rozpoczęciu leczenia od pacjentów, u których wystąpił nawrót choroby.

2. Model powstawania pęcherzy *ex vivo* został zoptymalizowany poprzez dostosowanie jakości i grubości krioskrawków, stężenia przeciwciał w surowicy krwi pacjentów z BP, liczby granulocytów, zastosowanych do inkubacji krioskrawków oraz sposobu aktywacji komórek.

[1]: Nesmond S et al. 2019. *Front Immunol.* 10:2107.

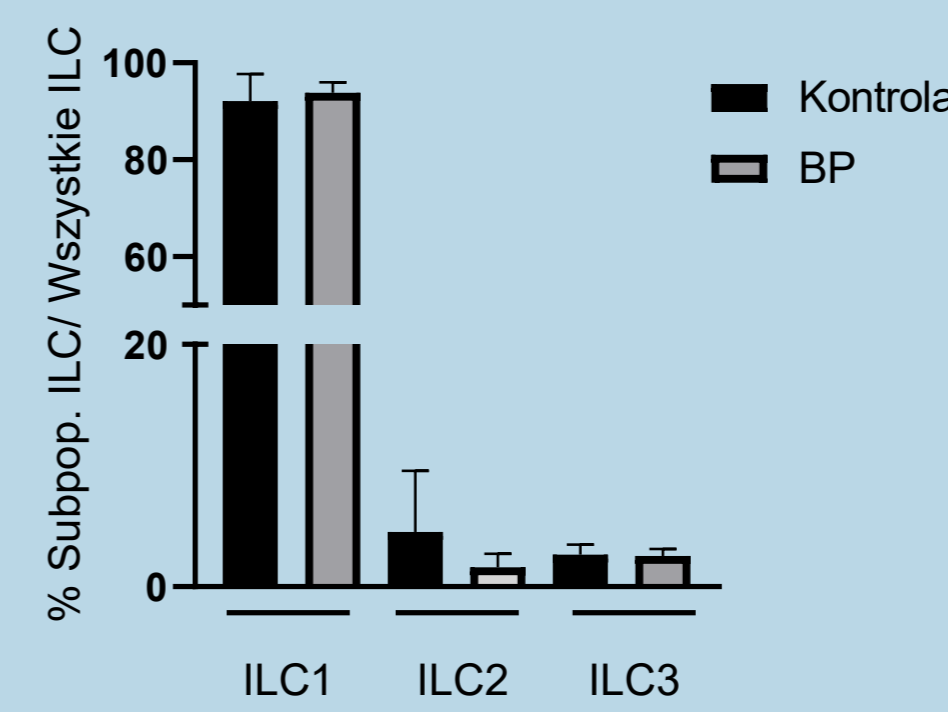
Wyniki: Profil ILC i ocena ekspresji IL-17RB i IL-17RA

1. Analiza cytometrii przepływowej u pacjentów z BP, w porównaniu z grupą kontrolną, wykazała wzrost odsetka całkowitej populacji ILC w stosunku do żywych leukocytów.



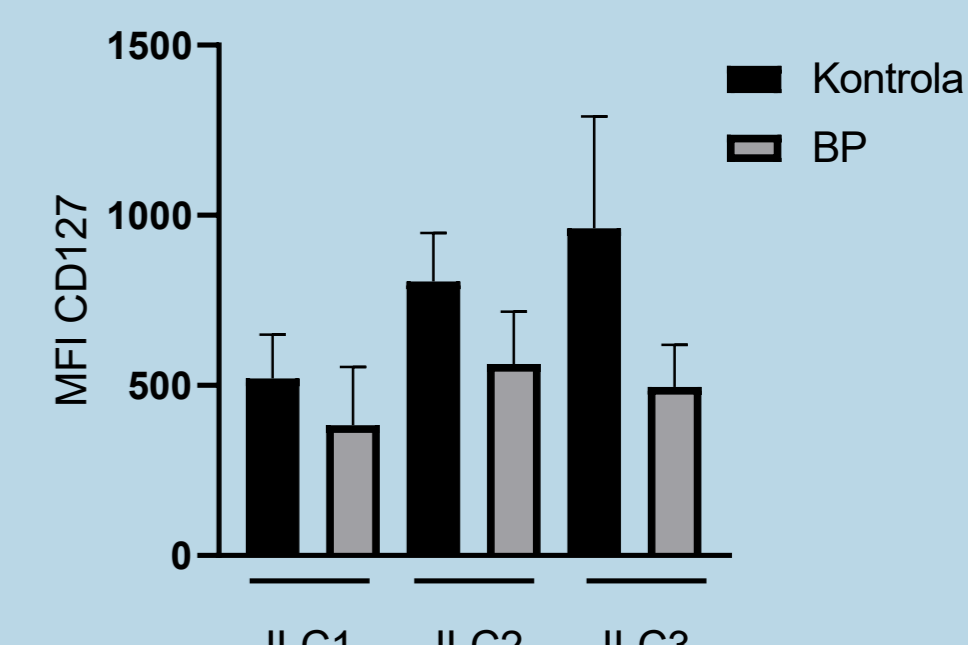
Wyk.2 Porównanie proporcji ILC

2. Zaobserwowano zmniejszenie subpopulacji ILC2 u pacjentów z BP w porównaniu do osób z grupy kontrolnej.



Wyk.3 Porównanie subpop. ILC

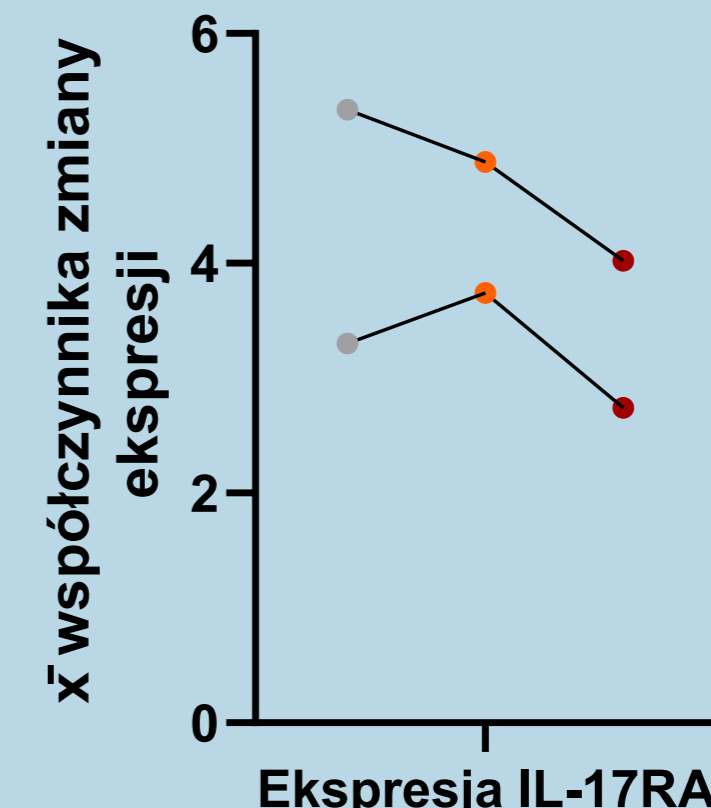
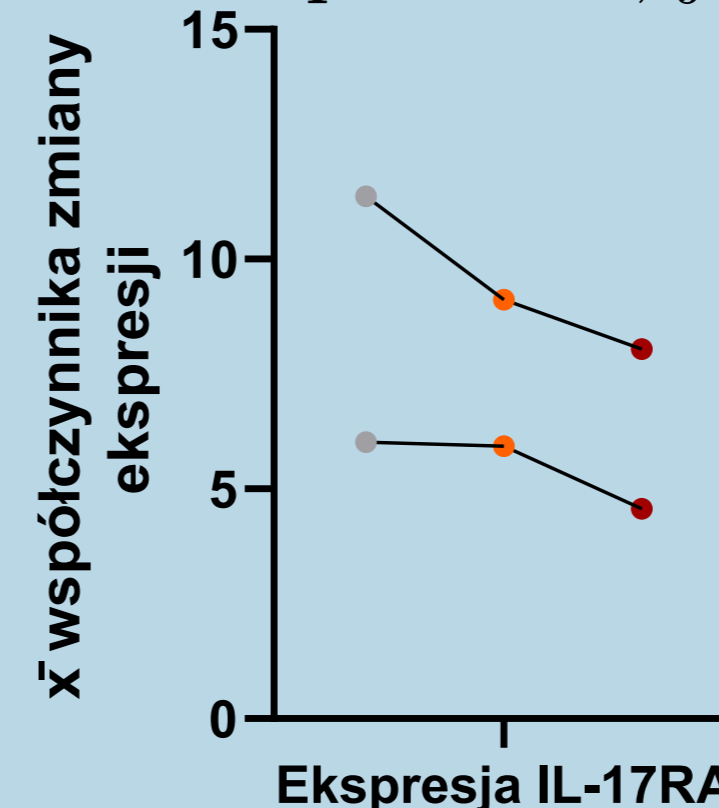
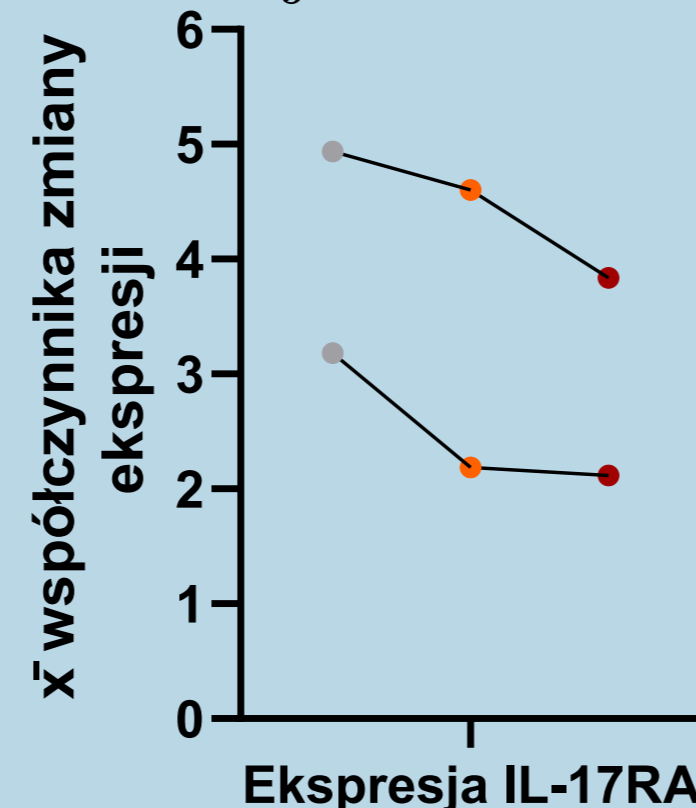
3. Stwierdzono obniżoną ekspresję CD127, co odzwierciedla internalizację receptora IL-7R, a tym samym zwiększoną aktywację ILC.



Wyk.4 Porównanie ekspresji CD127

4. IL-17RA jest powszechnie wyrażana w PBMC. Nie stwierdzono istotnych różnic w ekspresji IL-17RA na początku badania pomiędzy osobami chorymi i zdrowymi.

5. Dla każdej analizowanej populacji komórek zaobserwowano tendencję do zmniejszenia ekspresji IL-17RA w czasie u pacjentów z BP, którzy doświadczyli nawrotu choroby. Natomiast, nie zaobserwowano ekspresji IL-17RB na komórkach limfoidalnych we krwi obwodowej zarówno w momencie rozpoznania, jak i w trakcie leczenia.



Wyk.5 Analiza ekspresji IL-17RA na komórkach ILC; limfocytach i monocytach; komórkach NK (od lewej do prawej), pobranych od dwóch pacjentów z BP. Nawrót choroby nastąpił między wizytą 3 a 4 w szpitalu.

Wyniki: Wizualizacja rozszczepienia podnaskórkowego

Przedstawiono model *ex vivo* dla powstawania pęcherzy zależnego od autoprzeciwciał, który w połączeniu z barwieniem immunofluorescencyjnym dla kolagenu IV i anty-BP180, stanowi użyteczne narzędzie do przyszłych badań nad wpływem różnych czynników biologicznych na tworzenie pęcherzy. Wprowadzenie lipopolisacharydu do modelu wzmocniło szlak niezależny od dopełniacza i może być obecnie wykorzystywane do analizy wpływu IL-17B.

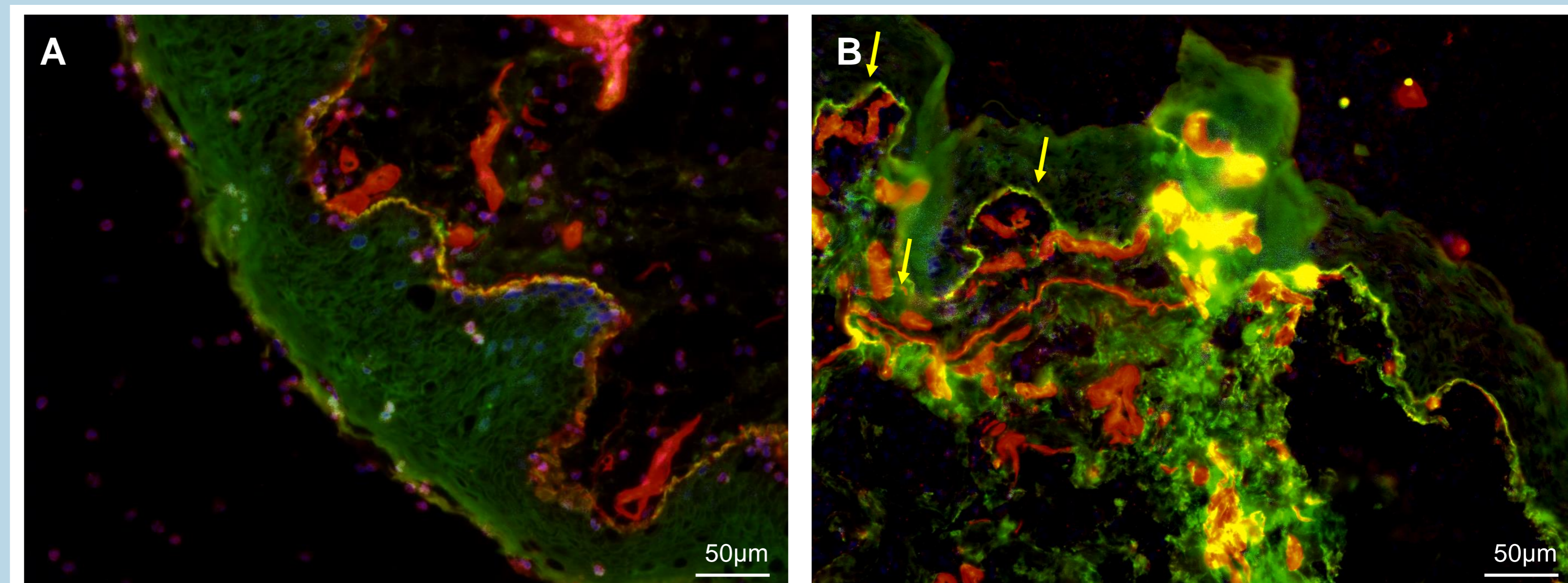


Fig.1 Separacja skóry właściwej i naskórka przy użyciu nowego barwienia immunofluorescencyjnego kolagenu IV/XVII. (A) Nienaruszone połączenie skórno-naskórkowe (B) Separacja skóry oznaczona żółtymi strzałkami.

Wnioski

- IL-17RB nie ulega ekspresji na komórkach limfoidalnych na poziomie ogólnoustrojowym.
- Przedstawiono narzędzie, które będzie przydatne do przyszłych badań nad funkcją różnych interleukin w procesie tworzenia się pęcherzy w BP. **Model ten**, wraz ze stymulacją granulocytów supernatantami z komórek IL-17RB+ indukowanych IL-17B, **umożliwi lepsze zdefiniowanie roli IL-17B w tworzeniu się pęcherzy w BP.**