

# **Alopecia immunológiai vonatkozásai**

**PhD értekezés**

**Telegdy Enikő dr.**

**Pécsi Orvostudományi Egyetem  
Bőrgyógyászati Klinika**

**Pécs, 1996.**

## Tartalomjegyzék

Bevezetés	2
I. Alopecia klinikai formái, etiológiája	2
II. Alopecia immunológiai háttere	3
Célkitűzések	4
Beteganyag és módszer	5
Eredmények és következtetések	8
Fontosabb eredmények és az eredmények felhasználása és hasznosítása	12
Témával kapcsolatos fontosabb irodalmak jegyzéke	15
Témával kapcsolatos saját közlemények, fontosabb előadások	17
Saját közlemények melléklete a hivatkozás sorrendjében	20

## Bevezetés

### I. Alopecia klinikai formái, etiológiája /cit.24.,26./

Az alopecia gyakori megbetegedés, a népesség mindegy 2 %-át érinti, családi halmozottság az esetek 20 %-ában fordul elő /Price 1991/.

**I/1. Klinikai formái** közül, enyhe esetben **effluviium**ról beszélünk, ami akár napi 100 telogen hajszál vesztesét is jelentheti.

Fokozott formája, amikor a hajzat látható megritkulása lép fel jelentő az alopecia kórképet /Rook 1992/.

**I/2. Az alopecia lehet diffúz /alopecia diffusa/, aminek oka:**

+ hormonális eredet /szérum tesztoszteron, prolaktin, kortisol szint emelkedése /cit.28./ ill. lokális vagy szisztémás dehidro-epiandrosteron szint emelkedése/. Ez a klinikai manifestáció az **androgen alopecia** /változatos etiológiája miatt helyesebb androgén típusú alopeciának nevezni/.

+ hiányállapotok: nyomelemek hiánya /zink, réz, vas/, fehérjehiány, vitaminhiány /B, A vitamin/. Akut megjelenése

+ belszervi megbetegedések: májbetegség, pajzsmirigy rendellenesség.

+ krónikus infekció

+ autoimmun megbetegedések /SLE, Hashimoto thyroiditis, vitiligo/

+ iatrogén tényezők: retinoid, citosztatikum, penicillinamin /Orfanos 1990/.

+ kémiai, fizikai ágenssek: ólom, hajfesték, dauer. Ez utóbbiak a hajszálak strukturális anomáliáit is előidézik /Whiting 1987/cit.23.,27./.

+ fiziológiások: újszülöttnél a születés utáni 3.-4. hónapban /anyai hormonhatás/, anyánál a szülés után néhány hónappal /hormonális változás/.

**I/3. A hajvesztés másik formája a foltos hajhullás, az alopecia areata. Oka lehet:**

+ infekciós eredet /góc/ az esetek nagy részében.

+ genetikai tényező: családon belüli halmozottság, HLA fenotípussal való összefüggés /Kianto 1977/, genetikai rendellenességekhez társulva /Down-kor. Netherton ill. Menkes szindróma/.

+ pszichés zavar -trichotillomania- /Schneider 1994//cit.29/

+ immunológiai eredet

**I/4.** Az alopecia areata valamennyi formája átmehet teljes hajhiány állapotába - **alopecia totalis**- ill. a teljes szőrzet hiányába -**alopecia universalis**-. Amennyiben ez rapidan alakul ki **alopecia malignának** nevezzük a kórképet..Oka lehet:

+ genetikai rendellenesség.

+ immuneredet.

## **II. Alopecia immunológiai eredete**

Az alopecia **immunológiai**, elsősorban autoimmun **hátterére** ma már számos bizonyíték van /Bystrin 1991/, bár az adatok ellentmondásosak ill. elégtelenek.

**II/1.** Szisztémás megbetegedés, az esetek 10 %-ában a körmök, 80 %-ában a szem érintett

**II/2.** Az alopeciás egyén folliculusa nude egérre ültetve haját termel, ami bizonyítja, hogy a haj veszítésében külső tényezők játszanak szerepet

**II/3.** Más immunbetegségekhez való társulása 3 %, autoantitestek előfordulása kétszer gyakoribb alopecias betegeknél, bár az adatok vitathatók, mivel az eltérések nem szignifikánsak

**II/4.** T sejtek számbeli és funkcionális eltérése: a T helper/ T szupresszor arány megemelkedik, a perifériás T sejtek mitogénekkal való stimulálhatósága lecsökken.

**II/5.** Perifollicularis lymphocytás infiltráció: a folliculus elleni rendellenes celluláris immunválasz bizonyítéka. Az infiltrációt elsősorban aktivált /Dr pozitív/ T helper sejtek alkotják, melyek kezdetben a peribulbaris kapillárisok körül jelennek meg, majd infiltrálják a bulbaris mátrixot.

**II/6.** Perifollicularis antitestek jelenléte: C3, IgG és IgM depozitumok észlelhetők alopecia areata follicularis basalmembránja körül. Bár a jelenséget normál egyéneknél is /kisebb mértékben/ megfigyelték, miszerint az antitest képződés nem csak a hajvesztésben, de a normál hajciklus regulálásában is szerepet játszik.

**II/7.** MHC-I és MHC-II antigének follicularis expressziója, valamint Langerhans sejtek megjelenése a bulbusban: Mind a Langerhans sejtek és mind az MHC-I antigének antigén prezentációban játszanak szerepet. Jelenlétükkel így képesek a

bulbus elleni autoreaktív immunválsz indukciójára, valamint a cytotoxicus T sejtek bevonására.

**III/8.** Az effektív terápia szuppressálja a bőr lymphoid sejtjeit: valamennyi hatásosan alkalmazott lokális szer /kortikoszteroid, UV fény, citosztatikum, szenzibilizáló szerek/ a lymphocyták szuppresszióját hozza létre, ami a celluláris infiltráció gátlását eredményezi.

**III/9.** Az immunválsz targetjei:

keratinocyták - hisztológiai és immunológiai bizonyítékok vannak, arra, hogy az alopecia késői stádiumában károsodnak

melanocyták - a hajvesztés megkíméli a depigmentált sejteket

- elektronmikroszkópos vizsgálatok szerint a celluláris infiltráció a melanocyták fölött alakul ki
- pigmentsejt ellenes antitestek mutathatók ki alopecia areatában

endothelsejtek - az alopecia korai stádiumában az infiltráció perivascularis, ami endothelsejt elleni antitestek jelenlétét feltételezi

### Célkitűzések

Mivel az irodalmi adatok megjelölhetően ellentmondásosak, ezért kezdjük el vizsgálni az alopecia areata ill. alopecia totalis diagnózissal jelentkező betegeket.

Ezen munkánk során nem kívánok kitérni az alopecia, mint más betegséghez társuló, tüneti formáira; továbbá ugyancsak nem térnék ki az androgén jellegű alopeciás kórképekre.

Immunológiai eredetére számos, fentebb felsorolt, részben ellentmondásos adat szolgál, ezért munkánkban ennek tanulmányozását tűztük ki célul:

**I/1.** Alopeciás betegeinknél milyen **autoantitestek** és milyen gyakorisággal fordulnak elő ill. ezen adatok mennyiben támaszlják alá a kórkép más immunbetegségekkel való összefüggését.

**I/2.a.** A szisztémás folyamat bizonyításául vizsgáltuk a szérum **humorális** immunológiai eltéréseit, immunglobulin-szinteket, **immunkomplex** koncentrációkat, **celluláris** immunológiai funkciókat. Vizsgálataink arra irányultak, hogy milyen frakciókban és milyen mértékben észlelhető eltérés betegeinknél

**b.** és ez mennyiben változik szisztémás terápiánk hatására. Továbbá ezen változások révén terápiánk effektivitása igazolható-e.

**I/3.a.** A **perifoliculáris infiltráció** jelenléte nem vitatott. Munkánkban fejbőr-biopsziás anyagon az infiltráció sejtjes összetételét vizsgáltuk, ezek lokalizációját és aktiváltságát különböző monoklonális savók segítségével.

**b.** Ezen eredményeinket összehasonlítottuk alkalmazott lokális szenzibilizáló terápiánk előtt és után.

**I/4.** Az **immunválasz targetsejtjei** közül a keratinocytákat és az endothelesejteket vizsgáltuk monoklonális savók segítségével, szövettani metszeteken. Munkánkban arra kerestünk választ ezen sejtek részt vesznek-e ill. milyen mértékben az immunológiai folyamatokban, valamint milyen szerepet játszanak a hajhullásban.

**I/5.** Ellentétes irodalmi adatok utalnak az alopecia immungenetikai hátterére, összefüggése a **HLA** rendszerrel ma is vita tárgyát képezi. / Kuntz 1977, Hacham-Zadeh 1981, Duvic 1991/. Vizsgálatainkkal mi is összefüggést kerestünk a két alopeciás kórforma és a HLA rendszer között ill. választ kerestünk eredményeink prognosztikai tényezőként való alkalmazhatóságára.

## **Beteganyag és módszer**

A POTE Bőrgyógyászati Klinikáján 1987 óta folyók alopecia gondozás. Jelenleg 365 nyilvántartott betegünk van. A betegek életkora 6-69 év között

változik. 76% nőbeteg, 24% férfibeteg. A betegek 14,5 %-a jelentkezett effluviummal, 22,6%-nál észleltünk alopecia aerata, 5,7%- nál volt alopecia totalis kimutatható. 27,5% androgén típusú alopeciával volt kezelve, 6,8% diffúz jelegű, bizonytalan etiológiájú hajvesztéssel és 8,7%-ban más betegséghez társuló ill. fejbőrre lokalizált egyéb bőrbetegséget igazoltunk.

Vizsgálataink más-más években ill. különböző, meghatározott szempontok szerint kiválasztott beteganyagon történtek, ezért számbeli eltérések észlelhetők.

### **I/1. Autoantitest meghatározások**

A meghatározásokat számunkra a Megyei Vértranszfúziós Állomás Végezte. 51 alopecia areata és 27 alopecia totalis diagnózisú betegnél vizsgáltuk gasztrikus parietális sejt ellenes, antinukleáris faktor ellenes, antimitokondriális faktor ellenes, síma - ill. harántcsikoltizom ellenes, pajzsmirigy mikroszóma ellenes, valamint fehérvérsejt ellenes autoantitest jelenlétét.

### **I/2.a. Szérum humorális és celluláris immunológiai vizsgálatai**

34 beteget vizsgáltunk alopecia areata /13 férfi és 21 nő/ és 17 beteget alopecia totalis diagnózissal /7 férfi és 10 nő/. Utóbbi betegcsoportból 7 beteg alopecia universalis diagnózissal állt kezelésünk alatt. Betegeink átlageleikora alopecia areata esetén 27,5 év, alopecia totalis esetén 23,2 év volt.

- A szérum immunglobulin-szint ( IgG, IgA, IgM, C3 ) quantitaiv meghatározást Mancini immundiffúziós módszerével végeztem.

- A keringő immunkomplex (KIK) - meghatározás Husz /1986/ által módosított Diezel /1978/ módszerével végeztük, PEG precipitációs eljárással, fordított radiális immundiffúzióval, monospecifikus antihuman szérumokka vizsgáltuk. Az immunkomplex fehérje komponenseinek mennyiségét standard fehérjeoldatok ismert IgG, IgA, IgM, C3 és prealbumin tartalma segítségével, aránypárral

számítottuk ki. A KIK összefehérje-meghatározás spektrofotométerrel, Biuret reagens felhasználásával történt.

- **Immuncitológiai vizsgálatainkhoz** vénás vérből izolált fehérvérsejteket és szeparált mononukleáris ejteket használtunk /Boyum 1986/.

- **T lymphocyták** arányát birka vörösvértesttel történt spontán rozettaképzés alapján Lay /1971/ által kidolgozott eljárás szerint végeztük. A fitohemagglutinin reaktivitás mértékét lymphocyta transzformációs teszttel határoztuk meg /Simon 1980/.

- **B lymphocyták** arányát egér vörösvértesttel való rozetta képződésük alapján /MERF sejtek/, Dobozy /1976/ és mtsai által kidolgozott módszer alapján határoztuk meg.

- **A tisztított tuberkulin** fehérje migráció gátló hatását **/MIF index/**, szintén Dobozy és mtsai /1973/ által leirt eljárással vizsgáltuk.

**b.** Vizsgálatainkat összehasonlítottuk az 1 éven át, napi 100 mg/tskg dózisban, eredményesen alkalmazott Isoprinosine terápiát követő eredményekkel.

### **I/3.a. Perifollicularis infiltráció sejtjes összetételének, aktivitásának vizsgálatai**

Immunistológiai vizsgálatainkat a fenti (I/2) beteganyagon kriosztátos metszeteken, monoklonális antitestek sorozatával ( CD 3,4,6,8 , OKB 7, OKM 1, OKIa1, Leu7 ) streptavidin-biotin komplex peroxidáz (ABC) módszerrel történt.

Betegeink a vizsgálatok előtt legalább egy hónapig sem lokális sem szisztémás kezelésben nem részesültek.

**b.** Ugyanezen módszerrel végeztük összehasonlító vizsgálatainkat diphencyprone (DCP) -Zaun /1987/ módszere alapján- félévig tartó, emelkedő koncentrációban alkalmazott hajás fejbőr DCP ecsetelését követően is.

### **I/4. Immunválasz targetsejtjeinek vizsgálata**



Más felszíni sejtmarkereket a Bonni Bőrgyógyászati klinika beteganyagán végeztem 20 alopecia areatával kezelésbe vett - 15 nő és 5 férfi - betegnél. A betegek életkora 13-61 év között volt. Autoimmun folyamatot a vizsgált egyéneknél kizártunk. A hajás fejbőrön az alopecias gócek jelentkezése 3 hónapnál nem volt régebbi és a biopsziát megelőzően a betegek semmiféle kezelésben nem részesültek. Monoklonális antitestekkel, alkalikus foszfátáz-antialkalikus foszfátáz (APAAP) módszerrel történtek vizsgálataink. Az alkalmazott monoklonális savókkal, - mint intercelluláris adhéziós molekula-1 /ICAM-1, CD54/, vascularis sejt adhéziós molekula-1 /VCAM-1, CD106/, endotheliális leukocytá adhéziós molekula-1 /ELAM-1, CD62E/, leukocytá adhéziós molekula-1 /LECAM-1, LAM-1, CD62L /, interleukin-1-alfa /IL1-alfa/, interleukin-1-beta /IL1-beta/, interleukin-2 /IL2/, gamma-interferon / $\gamma$ -IFN/ - nemesak a reaktív lymphocytákat, de a kapilláris endothelsejtek valamint a bulbaris és epidermalis keratinocyták ativációja is megfigyelhető volt.

#### **I/5. Immungenetikai vizsgálatok**

HLA vizsgálatokat a Megyei Véralomás segítségével, a Terasaki /1980/ által leírt lymphocytá toxicitási mikromódszerrel végeztük.

#### **Eredmények és következtetések**

##### **I/1. Autoantitest meghatározások /cit.2.,8.,9./**

A vizsgált 51 alopecia areata diagnózisú betegnél 2 ízben mutattunk ki pajzsmirigy microszóma ellenes antitest és 1 esetben antinukleáris faktor ellenes antitest jelenlétét. A vizsgált 27 alopecia totalis esetében 1-1 esetben mutattunk ki gasztrikus parietális sejt ellenes, simaizom ellenes, pajzsmirigy microszóma ellenes és antinukleáris faktor ellenes antitestet ill. 3 ízben thyreoglobulin ellenes antitestet. Ezen betegeinknél harántcsikolt, antinukleáris faktor, valamint mitokondriális faktor ellenes antitestet kimutatni nem tudtunk.

Autoantitest vizsgálatokat a kórkép kivizsgálása során lényegesnek tartjuk, egyrészt egyéb autoimmun betegség kizárása céljából, másrészt a kezelés megválasztása miatt. Pozitivitás igazolása esetén az Isoprinosine alkalmazása nem jön ugyanis szóba.

### 1/2.a. Szérum humorális és celluláris immunológiai vizsgálatai

- az 1992-ig feldolgozott és statisztikailag analizált 5 év beteganyagából 34 alopecia areata és 17 alopecia totalis diagnózisú beteg **szérum immunglobulin-** szint értékeinél szignifikáns eltérést nem tudtunk igazolni /cit.2./.

- 10 éves beteganyag esetén azonban /1983-1993/ 55 alopecia areata és 21 alopecia totalis diagnózisú vizsgált eseteinkből 11 alopecia areata és 1 alopecia totalis betegnél találtuk **IgA** hiányt ill. csökkent IgA szintet, ami kontroll csoporthoz képest szignifikáns volt /cit.17./

Terápiaként 1 betegnél alkalmaztunk IgA derivátum szubsztitúciót. Eredménye azonban átmeneti jellegű volt, indikációja a mai napig is megkérdőjelezeti. Többi betegünknel Isoprinosine tartós kezelést alkalmaztunk. Eredményes terápiát követően az IgA szint emelkedését észleljük. Átmeneti, IgA szint csökkenés esetén az eredmény tartós lehet, genetikusan determinált IgA hiánynál azonban csak átmeneti javulás érhető el.

- **Keringő immunkomplex** /KIK/ vizsgálatainkkal /cit.2.,14,16./ IgA-KIK-et kimutatni sem alopecia areata sem alopecia totalis esetében nem sikerült. Az emelkedett KIK-összfehérje szintet az emelkedett KIK-C3 szintnek tulajdonítottuk. A KIK-IgM szintje is normál tartományon belüli volt. Az autoimmun folyamatokban gyakran végeznek keringő immunkomplex vizsgálatokat, összetételére vonatkozó vizsgálatok azonban még kevésbé elterjedtek. Az általunk elvégzett keringő immunkomplex vizsgálatokat és elsősorban az immunkomplex összetételére vonatkozó vizsgálatokat a kórkép progressió ill. lezajlott stádiumának megítélésére használható egyik módszernek

tartjuk. Azt a tényt, hogy IgA-KIK-et kimutatni egy esetben sem sikerült úgy értékeljük, hogy az alopecia kialakulását az IgA csökkent szintje mégis befolyásolja.

- **Celluláris immunológiai vizsgálatainkkal** /cit.2.,11.,12./ kimutattuk, hogy mindkét alopeciás betegcsoportban a **T sejtszám** lecsökkent, alopecia areata esetében a T sejtek stimulálhatósága nagyobb mértékben volt csökkent, mint alopecia totalis esetében; amit az alopecia aktivitásaként értékelünk.

**A B sejteket** illetően megállapítottuk, hogy mindkét betegcsoportban a B sejtszám normál tartományon belüli volt, azonban a roztartakötő-képességű szubpopuláció ill. a sejtek immunglobulin receptor kötőképessége csökkentnek bizonyult.

Mivel a T sejtek esetében az eltérés jelentősebb volt, nemcsak funkciócsökkenést, hanem számbeli csökkenés is igazoltunk, értékelésünk szerint ez is bizonyítaná a T sejtek elsődleges szerepét a folyamat patomechanizmusában.

- **A leukocyta migráció gátlásának** indexe egyik alopeciás kórképben sem volt szignifikánsan eltérő, ami megfelel annak, hogy az alopeciát lymphocytá mediaiáta kórkép /Braun-Falco 1991/.

b. Tartós Isoprinosine terápiát követően a kóros celluláris immunfunkciók a normál tartományt megközelítették ill. elérték, amely hajnövekedést eredményezett /cit.2.,16./.

### **I/3. Perifollicularis infiltráció sejtes összetételének, aktivitásának vizsgálatai**

Imunhisztológiai vizsgálatainkkal megállapítottuk /cit.1.,10.,13./:

**a./** - A perifollicularis infiltrációban elsősorban T lymphocyták, ezen belül is **T helper lymphocyták** vannak jelen, arányuk a T szuppresszor lymphocytákhoz 4:1.

**b./** - Az alkalmazott **DCP** kezelést követően megemelkedett a T szuppresszor lymphocyták száma, így a **T helper/ T szuppresszor arány 2:1** lett,

megközelítve a normális 1:1 arányt. Az így észlelt hajnövekedést annak bizonyítékául tekintjük, hogy az alopeciás kórkép kialakulásában citotoxikus lymphocytáknak szerepét van /D' Ovidio 1981/.

- A fenti kezelést követően továbbá megemelkedett a **Langerhans-sejtek** száma, ami egyrészt antigén prezentációban, másrészt egyéb sejtmediátorok indukciójában tölt be szerepet.

#### **I/4. Immunválasz targetsejjeinek vizsgálata**

Az APAAP technikával vizsgált citokin vizsgálatainkból alopecia areata eseteiben kiemelném /cit.4.,5.,21.,25./

- a peribulbáris **kapilláris endothelsejtek** jelentős CD106, CD54 és CD62E pozitívítását, mely arra utal, hogy a kapillárisok aktívan részt vesznek az alopecia kialakulásában, aktivációjuk révén képesek reaktív sejtek bevándorolni a gyulladós szövetbe, ezáltal kiszélesítve és nem csupán a bulbusra lokalizálva a gyulladós jelenségeket, amelynek következtében jön létre a hajhullás.

- a **peribulbáris infiltráció** vizsgálatánál a gamma-interferon kivételével valamennyi antitesttel intenzív pozitívítást találtunk. Ez arra utalhat, hogy a gyulladásban részvevő sejtek aktivációja jelentős; további citokint expressziók indukciója révén, a gyulladós kaszkádot tovább triggerelik. A CD106 pozitívítás talán a lymphocyták erőteljes inváziós készségére utal /Johnson 1989/, a CD54 pozitívítás ill. a korábban igazolt, elsősorban CD4 pozitív sejtek jelenléte az infiltrációban a citotoxikus T sejtek részvételtét igazolja a folyamatban.

- a **peribulbáris lymphocyták** továbbá erőteljes interleukin-2 pozitívítása ezen sejtek aktív, gyulladásban játszott volta utal /cit.3.,22./

- a **bulbáris keratinocyták** jelentős CD62E és CD106 pozitívítása a peribulbáris lymphocytákkal megtörtént interakcióra utalhat, melynek révén létrejöhet azok bulbáris inváziója /Pober 1991/.

- a gamma-interferon jelenlétét /cit.6.,7.,19./ szintén ki tudtuk mutatni a bulbáris keratinocytákon. A gamma-interferon CD54 expressziót indukál /Griffith 1988/.

amit a peribulbáris lymphocytákon igazoltunk, tehát következtetésünk szerint a gamma-interferon expressziója következtében indul be a bulbáris sejtek, mint target sejtek elleni **citotoxikus reakció**.

#### **I/5. Immungenetikai vizsgálatok /cit.8.,9.,18./**

HLA vizsgálatainkkal alopecia areata esetében szignifikáns összefüggést kimutatni nem tudtunk. Alopecia totalis esetében a HLA A2 szignifikánsan gyakoribbnak bizonyult, csakúgy mint a B16 és B35 fenotípus előfordulása. Ezen fenotípusokat eddig alopeciával nem hozták összefüggésbe.

Alopecia areataban a HLA B8 előfordulása bizonyult a leggyakoribbnak, de nem volt szignifikáns az eltérés, amit autoimmun kórképekkel hoznak egyértelmű összefüggésbe. Ezen betegeknél azonban mi 3 esetben tudtunk autoantitestet igazolni. Ez a HLA fenotípus kimutatása alapján, megfigyelésünk szerint, nem bizonyítható az alopecia autoimmun eredete.

#### **Fontosabb eredmények és az eredmények felhasználása és hasznosítása**

**1. Autoantitestek jelentését** egyes betegeknél igazolni tudtunk. A vizsgálatokat a kórkép kivizsgálása során lényegesnek tartjuk, elsősorban a terápia megvalósítása szempontjából /Isoprinosine, Sulfone ill. egyéb/.

**2. A szerum humorális és celluláris immunfunkciói vizsgálatával** igazolni tudtunk

- számos betegnél **IgA** csökkenést ill. hiányt, ami terápiánk hatékonyságát eredményezte

- csökkent, elsősorban **T** sejtszámot ill. funkciót, ami igazolta az alopecia lymphocytámediációját és meghozta az ennek megfelelően kiválasztott terápiánk hatékonyságát.

**3. Perifollicularis infiltráció vizsgálatával igazoltuk**

a./ a CD4/CD8 pozitív T sejtek arányának eltolódását 4:1-re /normál érték 1:1/. Kimutattuk továbbá, hogy hatásos lokális immunterápiára /DCP/ ez az arány a szupresszor sejtek javára eltolódva, csaknem normalizálódik, 2:1 lesz. Ebből két következtetés vonható le

- az immunfolyamatot elsősorban T helper sejtek modulálják  
 - a szupresszor T sejtek arányának megnövekedése hatásos terápia esetén bizonyítaná ezen T helper sejtek feltételezett citotoxikus hatását ill. effektív kezelés során a hatás gátlódását a T szupresszor sejtek által.

b./ CD 4 és egyidejű CD54 pozitívítást, ami a citotoxikus T sejtek reaktivitását igazolná

c./ CD106 pozitívítást, amit a lymphocyták inváziós aktivitásának markerének tartunk. Eddig csupán néhány malignus tumornál számoltak be a lymphocyták CD106 pozitívításáról, alopeciában ilyen megfigyelések még nem ismertek.

4./ **Immunválasz targetsejtjeinek vizsgálata** révén monoklonális savókkal kimutattuk

a./ **peribulbaris kapilláris endothelsejtek** intenzív CD106, DC54 és CD62E pozitívítást, ami a kapillárisok aktív részvételére utal, továbbá bizonyítja az immunfolyamatok bulbuson kívüli aktivációját is.

b./ **bulbaris keratinocyták** CD62E és CD106 pozitívítást, ami révén megvalósul a peribulbaris lymphocyták bulbaris inváziója. Alopeciában ilyen irányú immunhisztológiai közlés még nem jelent meg.

c./ **bulbaris keratinocytákon** továbbá kimutattunk  $\gamma$ -interferon pozitívítást is, ami további szignált ad az immunfolyamatnak, CD54 pozitív lymphocyták képzését indukál.

5. HLA rendszerrel alopecia totalis esetében szignifikáns összefüggést észleltünk **HLA A2, B16 és B35** esetén. Ezen antigénfenotípusokat még nem mutatták ki alopecia totalis háttérében.

6. Az alopeciás betegek **rendszeres gondozása** és körlefolyasuk nyomonkövetése egyelőre egyedül a Pécsi Bőrgyógyászati Klinikán történik az országban, külön

szakambulancia keretében, rendszeresen, meghatározott időben. Ennek révén nemcsak a potos kivizsgálás, de a beállított terápia nyomonkövetése, betegek pszichés vezetése is megoldható.

7. Más terápiás lehetőségek bevezetéséhez ill. az immunológiai történések pontosabb tisztázásához tervünk **bulbaris keratinocyta-tenyészetek** vizsgálata.

### Témával kapcsolatos fontosabb irodalmak jegyzéke

- Boyum A.: Scand J Clin Lab Invest 21:97. 1968.
- Braun-Falco O., Plewig G., Wolff H.H., Winkelman R.K.: Dermatology ed. Springer Verlag, Berlin, Ch 31. 1991.
- Bystrin J.C., Tamesis C.: Immunologic aspects of hair loss. J Invest Dermatol Vol 101, 885-895. 1993.
- Diezel W. és mtsai: Dt. Gesund Wesen 33:1822. 1978.
- Dobozy A. és mtsai: Clin Exp Immunol. 23:382. 1976.
- Dobozy A., Hunyadi J., Simon N.: Berufs-Dermatosen 21:137. 1973.
- D'Ovidio R., Vena G.A., Angelini G.: Cell-mediated immunity in alopecia areata. Arch Dermatol Res 271:265-273. 1981.
- Griffiths C.E., Voorhees J.J., Nickoloff B.J.: Characterisation of intercellular adhesion molecule-1 and HLA-DR expression in normal and inflamed skin. Modulation by recombinant gamma interferon and tumor necrosis factor. J Am Acad Dermatol. 20:617-629. 1989.
- Hacham-Zadeh S., Bratbar C., Cohen T.: HLA and alopecia areata in Jerusalem. Tissue antigens 18:71-74. 1981.
- Husz S., Tiba A., Tóth-Kása I., Bala Zs., Budai E., Hunyadi J.: Keringő immunkomplexek vizsgálata bőrgyógyászati körképekben. Bőrgyógy Vener Szle. 62:121-125. 1986.
- Johson J.P., Stade B.G., Holzmann B., Schwable W., Rietmüller G.: De novo expression of intercellular-adhesion molecule-1 in melanoma correlates with increased risk of metastasis. Proc Natl Acad Sci. USA 86:641-644. 1989 et al.
- Kianto U., Reunala T., Karvonen J., Lassus A., Tiilikainen A.: HLA - b 12 in alopecia areata. Arch Dermatol 1977; 113: 1716.
- Kuntz B.M., Selzle D., Braun-Falco O.: HLA antigens in alopecia areata. Arch Dermatol. 1977; 113: 1717.
- Lay W.H., Mendes N.F., Bianco C.: Nature. 230:531. 1971.
- Orfanos C.E., Happle R.: Hair and hair disease ed. Springer-Verlag. Berlin. 1990.
- Price V.H.: Alopecia areata. Clinical Aspects. J Invest Dermatol Vol. 101, 68S. 1993.
- Prober J.S., Cottrai R.S.: Expression of endothelial adhesion molecules in tissue. Laboratory Investigation 64:301-304. 1991.
- Rook A., Wilkinson D.S., Ebling F.J.G., Champion R.H., Burton J.L.: Textbook of Dermatology. Ed. Blackwell Scientific Publications Oxford London 1992.
- Schneider D., Janniger C.K.: Trichotillomania. Pediatrics 53:289-294. 1994.
- Simon N., Dobozy A., Hunyadi J.: Berufsdermatosen. 18:189. 1980.
- Terasaki P. Ed. Histocompatibility Testing 1980. UCLA Tissue Typing Lab, Los Angeles. Berlin Springer-Verlag 1980. 18-21.
- Whiting D.A., Dallas T.X.: Structural abnormalities of the hair shaft. J Am Acad Dermatol 16:125. 1987.



Zaun H.: Neue Therapeutische Aspekte bei Nicht-Narbigen Alopecien. Z. Hautkr. 63(8): 639-641  
1987.

## A témával kapcsolatos saját közlemények, fontosabb előadások

1. Telegdy E., Magyarlaki M., Schneider I.  
Alopecia areatában és alopecia totalisban szenvedő betegek immunperoxidase-vizsgálattal követett diphencyprone külső és Isoprinosine belső kezelése Bőrgyógy. v.ener. Szle. 68, 59-64. 1992.
2. Telegdy E., Somos Zs., Schneider I.  
Immunológiai vizsgálatok alopecia areatában és alopecia totalisban szenvedő betegeknel Bőrgyógy. v.ener. Szle. 68, 65-68. 1992.
3. Telegdy E., Lutz G., Mojzes J., Kreysel H.W., Schneider I.  
Cytokine expression on keratinocytes in alopecia areata Exp Dermatol 1994;3:119-149
4. Telegdy E., \* Lutz G., \*\* Kreysel H.W., \*\* Schneider I., \* Szekeres Gy \*\*\*  
\* Pécs Univ. Med. Sch. Dept. Dermatol./Hungary  
\*\* Bonn Univ. Med. Sch. Dept. Dermatol./Germany  
\*\*\*Laboratory of Histopathology, Pécs  
Immunohistochemical assesment of adhesion molecules in alopecia areata megjelenés alatt
5. Telegdy E., \* Lutz G., \*\* Kreysel H.W., \*\* Schneider I., \* Szekeres Gy \*\*\*  
\* Pécsi Bőrgyógyászati Klinika  
\*\* Bonni Bőrgyógyászati Klinika, Németország  
\*\*\* Hisztopatológiai Laboratórium, Pécs  
Adhéziós molekulák immunhisztokémiai vizsgálata alopecia areatában megjelenés alatt
6. Telegdy E., \* Schneider I., \* Lutz G., \*\* Kreysel H.W., \*\*  
\* Univ. Med. School, Dept. Dermatol. Pécs, Hungary  
\*\* Univ. Med. School, Dept. Dermatol., Bonn, Germany  
Examination of CD54 (ICAM-1) and interferon-gamma expression in alopecia areata megjelenés alatt
7. Telegdy E., \* Lutz G., \*\* Kreysel H.W., \*\* Schneider I.  
\* Pécsi Bőrgyógyászati Klinika  
\*\* Bonni Bőrgyógyászati Klinika, Németország  
CD54 és gamma-interferon expresszió immunhisztológiai vizsgálata alopecia areatában megjelenés alatt
8. Telegdy E., \* Mojzes J., \* Schneider I., \*  
Sáfrány B., \*\* Kerekes E. \*\*  
\* Dept. of Dermatology, University of Medical School Pécs  
\*\* County Blood Transfusion Centre, Pécs  
HLA determination in patients with alopecia megjelenés alatt
9. Telegdy E., \* Mojzes J., \* Schneider I., \*  
Sáfrány B., \*\* Kerekes E. \*\*  
\* Pécsi Bőrgyógyászati Klinika  
\*\* Baranya Megyei Vértranszfúziós Állomás, Pécs  
HLA meghatározások összefüggésének vizsgálata alopeciás korkepekben megjelenés alatt
10. Telegdy E., Magyarlaki M.

- Helyi immunológiai változások nyomkövetése  
Diphencyprone allergizáló hatása során  
Magyar Allergológiai és Immunológia Társulat  
17. Vándorgyűlése, Eger 1989.
11. Telegdy E., Magyarlaki M., Schneider I.  
Immunológiai összefüggések alopecia areata és alopecia  
totalisban  
19. Magyar Immunológiai Vándorgyűlés, Szeged, 1989
12. Telegdy E., Schneider I.  
Immunológiai vizsgálatok alopecia areata és totalisszal  
kezelt betegeknel  
Fiatal Bőrgyógyászok Fóruma, Kecskemét, 1990
13. Magyarlaki M., Telegdy E.  
Immunologische Untersuchungen bei Patienten mit  
Alopecia areata und totalis vor und nach Diphencyprone-  
Behandlung  
36. Tagung der Deutscher Dermatol. Gesellschaft,  
Hannover, 1990.
14. Schneider I., Telegdy E.  
Lehetőségek és eredmények alopecias kórképek  
kezelésében  
Pastinszky Emlékülés, Budapest, 1990
15. Telegdy E., Schneider I.  
Terápiás lehetőségek és eredményeink alopeciával  
kezelt betegeknel  
Fiatal Bőrgyógyászok Fóruma, Kecskemét, 1991. 04. 25.  
Legjobb terápiás díj (CILAG)
16. Telegdy E., Mojzes J., Schneider I.  
Therapy and Results on Patients with Alopecia areata  
and Alopecia totalis  
III. Meeting of European Hair Research Society  
Berlin, Oct. 2-3, 1992.
17. Mojzes J., Telegdy E., Somos Zs., Schneider I.,  
Alopecia areata and IgA Deficiency.  
A Coincidence or a real Association  
Dermatology 2000, Bécs, 1993. 05. 18.-21.
18. Telegdy E., Schneider I., Mojzes J., Sáfrány B.  
Az alopecia areata és a HLA-rendszer kapcsolata  
Magyar Dermatológiai Társaság 4. Pécsi Tudományos  
Vándorgyűlése, 1993. 10. 14.-16.
19. Telegdy E., Lutz G., Kreysel H.W., Schneider I.  
Gamma-interferon és ICAM-1 expresszió vizsgálata  
alopecia areatában  
Magyar Dermatológiai Társaság Naggyűlése  
Budapest 1993. dec
20. Telegdy E., Schneider I.  
Az alopecia areata immunológiai vonatkozásai  
Dermatoimmunológiai Napok  
Pécs 1994.05

21. Telegdy E., Lutz G., Kreysel H.W., Schneider I.  
Adhéziós molekulák vizsgálata alopecia areataban  
Fiatal Bőrgyógyászok Fóruma  
Kecskemét 1994.04.23.-24.
22. Telegdy E., Lutz G., Kreysel H.W., Schneider I.  
Cytokine Expression on Keratinocytes in Alopecia areata  
6th Immunodermatology Symposium of European  
Immunodermatology Society, Münster 1994. 06.24-26.
23. Telegdy E., Mojzes J., Várszegi D.  
Bambuszhaj és pseudomoniletinix együttes, családon  
beli előfordulása  
Magyar Dermatológiai Társaság Nagygyűlése  
Budapest 1994.12.
24. Telegdy E., Mojzes J., Várszegi D., Zombai E., Schneider I.  
Ritka Alopeciás kórformák  
Fiatal Bőrgyógyászok Fóruma, Kecskemét 1995.04.21-22
25. Telegdy E., Schneider I., Lutz G., Kreysel H.W.  
Untersuchung der Adhensions-molekule in der Alopecia  
Areata  
38. Tagung der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft  
1995.04.29.-05.03.Berlin
26. Gerencsér K., Telegdy E., Mojzes J., Várszegi D.,  
Zombai E., Schneider I.  
Sonderformen der Alopezie  
38. Tagung der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft  
1995.04.29.-05.03.Berlin
27. Telegdy E., Mojzes J., Várszegi D., Battyáni Z., Schneider I.  
A hajzat strukturális anomáliái  
Dermatológusok 5. Pécsi Tudományos ülése  
1995.09.07.-09. Pécs
28. Telegdy E., Gerencsér K., Mojzes J., Nemes J.  
Mellékvesekéreg tumorhoz társuló androgén alopecias eseteinek  
Fiatal Bőrgyógyászok Fóruma, Kecskemét 1996.04.26.-27
29. Telegdy E., Várszegi D., Karg E., Mojzes J.  
Cases of trichotillomania  
Német-Magyar Dermatológiai Társaság Ülése,  
Szeged 1996.05.17.-18.

**Melléklet**

1.

**Telegdy E., Magyarlaki M., Schneider I.:**

**Alopecia areatában és alopecia totalisban szenvedő  
betegek immunperoxidase-vizsgálattal követett  
diphencyprone külső és Isoprinosine belső kezelése**

**Bőrgyógy. vener. Szle. 68, 59-64. 1992.**

Pécsi Orvostudományi Egyetem Bőrgyógyászati Klinika  
(igazgató: Schneider Imre dr., egyetemi tanár) közleménye

## Alopecia areataban és alopecia totalisban szenvedő betegek immunperoxidase-vizsgálattal követett diphencyprone külső és Isoprinosine belső kezelése

TELEGDY ENIKÓ DR., MAGYARLAKI MÁRTA DR.,  
SCHNEIDER IMRE DR.

**ÖSSZEFOGLALÁS:** A külföldi és hazai irodalmi adatokból ismert, hogy az alopecia areata és alopecia totalis kórképek háttérében kóros immunológiai eltérések húzódnak meg. Az okok háttérének feltárása és az eredmények után a szerzők lokális diphencyprone, ill. szisztémás Isoprinosine<sup>(R)</sup> immunterápiát végeztek. A terápia előtt és után a hajas fejbőr területéből histológiai és immunkémiai vizsgálatokat végeztek.

**Kulcsszavak:** alopecia progresszív stádiuma, immunperoxidase-technika, kombinált immunterápia

Az alopecia pathomechanizmusa egyelőre még pontosan nem tisztázott. Számos kórképhez, hiányállapothoz, immunzavarhoz társulóan figyelhető meg alopecia areata (AA), alopecia totalis (AT), alopecia diffusa, ill. univerzális jelentkezése. A kezelési effektus szempontjából igen lényeges a hajvesztés okának a megállapítása és az ennek megfelelő oki terápia. Lényeges továbbá a hajmentes terület nagysága, kiterjedtsége, valamint az alopecia fennállásának ideje, mivel az alopeciás kórformák a betegség fennállásának progresszív stádiumában kezelhetők eredményesen (10).

Betegeinknél a kezelés megkezdése előtt általános laboratóriumi és részletes serum immunológiai vizsgálatokat, valamint lokális immunperoxydase-technikával elvégzett (kezelés előtt és után) szövettani vizsgálatokat végeztünk. Ez utóbbi technikával az alopecia progresszív stádiuma pontosabban állapítható meg.

### Módszer

Az alopecia areata kórformában 13 férfi- és 21 nő-, összesen 34 beteget, alopecia totalis kórformában 7 férfi- és 10 nő-, összesen 17 beteget vizsgáltunk. A kórfolyamat jelentkezését AA esetében több mint 10 éve 3 beteg, 5—10 év között 6 beteg, 4 éven belül 9 beteg, 1 éven belül 16 beteg esetében észleltünk. AT jelentkezését 10 évnél régebb óta 6 betegnél, 5 és 10 év között 2 betegnél, 4 éven belül 7 betegnél, 1 éven belül 2 betegnél igazoltuk. Betegeink átlagéletkora AA esetében 27,4 év, míg AT esetében 23,1 év volt.

Betegeinket kezelésük során 3 csoportba osztottuk. Csoportonként 10 AA, ill. 5 AT diagnózisú beteget kezeltünk. A fennmaradó 4 AA, ill. 2 AT beteg más kezelésben részesült, őket a kezelés szempontjából nem vettük be a közölt sémába.

Az első csoportba tartozó betegeknél *Isoprinosine*<sup>®</sup>-terápiát (7, 12) alkalmaztunk. A második csoportba tartozóknál *lokális diphencyprone*-kezelést, a *harmadik* csoportba tartozóknál a *két szer kombinációját* alkalmaztuk kezelésenként. A kezelés megkezdése előtt, igazolt góc-pozitivitás esetén a göcöt szanáltattuk, az esetlegesen hiányzó nyomelemeket a normális tartományon belüli értékig pótoltuk.

A csoportokban a kezeléseket a terminális haj megjelenéséig, ill. annak kozmetológiailag elfogadható sűrűségéig folytattuk, ez fél—egy éves kezelést jelentett betegeknek.

Isoprinosine<sup>®</sup>-terápia során 50 mg/ttkg/nap mennyiségű inosiplexum-ot adagoltunk p. o. a betegeknek. A kezelés alatt 2 havonta vérképet és rendszeresen serum húgysav szintet ellenőriztünk.

A lokális immunkezelésként diphenylcyclopropenon-t alkalmaztunk (Alfa-Ventron GmbH) (DCP) [1, 3, 7, 9]. A kezelés megkezdése előtt az alkaron 10x10 cm nagyságú területen 2%-os oldattal szénbibilizáltuk betegeinket. Ezt követően 2 héttel később az egyéni érzékenységi tisztázására, epicután-probát tettünk fel betegeinknél 1,0—0,1—0,01—0,001%-os koncentrációkban. 24, 48, 72 óras leolvasást követően megkezdtük a lokális immunkezelést. Heti egy alkalommal a fejbőr alopeciás területét 2 ml-nyi, fokozatosan emelkedő koncentrációjú, acetonnal oldott DCP solutionnal kezeltük. A lokális terápia betegeinknél átlagosan 0,01—0,1, ill. 1,0%-os oldattal történt. Mivel a szer erős contact allergén, olyan higítást alkalmaztunk, amivel csupán erythemát kelttünk a fejbőrön. A hétnaponként történő kezelés során ettől a keltett erythemától függően változtattuk a DCP solutio koncentrációját.

Amennyiben erythemát nem észleltünk — alacsony volt a koncentratio, vagy a fejbőr „megszokta” az adott koncentraciot — úgy ötszörösére emeltük az előző DCP-kezelés során alkalmazott oldat százalékát. Amennyiben a kezelést követően a beteg néhány napig tartó hyperaemia fennállásáról számolt be, de 7 nap után ez már nem volt észlelhető, a concentration nem változtattunk. Kiemelnénk, hogy ezt a lokális DCP-kezelést olyan betegek esetében vezettük be terápiaként, akiknél más, korábban kipróbált hagyományos módszerek (steroid-terápia, hajszeszek, dithranol lokális kezelés stb.) eredményt nem hoztak.

A kezelés megkezdése előtt mindkét betegcsoportnál (AA, AT) szövettani vizsgálatot is végeztünk. A kezelést olyan esetekben alkalmaztuk, ahol nem hegesező típusú alopeciát igazoltunk [13]. Elvégzett vizsgálataink előtt a betegek sem lokális, sem szisztémás immunsuppressív, ill. immunstimuláns kezelésben nem részesültek, legalább 3 hónapon keresztül. Az alopeciás göccök széli részéből vett szövettani mintákon, immunperoxidase-technikával nyomonkövettük a lokális immunterápia okozta változásokat. A vizsgálatokat cryostatoss metszeteken, monoclonális antitestek sorozatával (OKT 3, 4, 6, 8, OKB 7, OKM 1, OKJal (Ortho-), Leu 7 (Becton—Dickinson)) streptavidin-biotin complex peroxidase (ABC) módszerrel végeztük [14]. Ennek során a kereksejtes infiltrátum összetételét elemeztük a lokális diphencyprone-kezelés előtt és 25 héttel a kezelés után.

### Eredmények

Az elvégzett immunperoxidase-vizsgálattal mind az AA, mind az AT esetében kapott eredmények hasonlóak voltak (I. táblázat). Az OKM 1, OKB 7, Leu 7 savóval elvéve észleltünk 1—1 pozitív sejtet. Az OKIa savóval az infiltrátum sejtjeinek többsége pozitív volt csakúgy, mint az OKT 3 savóval. Kezelés előtt a hámban az OKT 8 pozitív sejtek száma a normál kontrollokhoz hasonlítva enyhén megsaporodott és a basalis réteg felett is megfigyelhetők voltak pozitív sejtek. A kezelés után számuk mind az infiltrátumban, mind a hámban tovább növekedett, a CD4/CD8 hányados 4:1-értékről 2:1



## Immunperoxidase-vizsgálatok

(ABC-technika)

AT — n = 10

AA — n = 10

	terápia előtt	terápia után
CD 11 b	(OKM 1)	—
CD 21	(OKB 7)	—
	OKIa 1	78—85%
CD 4	(OKT 4)	50—60%
CD 8	(OKT 8)	25—30%
CD1a	(OKT 6)	—
perifolliculáris infiltrátumban		
	5—10%	10—15%
intraepidermálisan		
CD3	(OKT 3)	7—10/100 basalsejt
	Leu 7	75—85%

arányúra változott [2, 3, 5, 6, 7, 8]. Normális körülmények között 1:1 a sejtarány [2].

A kezelésünk során az egyes csoportok között, a terápiás módtól függően eltérést tapasztaltunk. A csak helyileg kezelt betegeknel, féléves lokális DCP solutios kezelést követően mind a 10 AA betegnél kisméretű hajnövekedést észleltünk, míg 1-éves kezelést követően jó eredményt tapasztaltunk a terminális hajnövekedés tekintetében. AT esetében 1-éves kezelést követően is csak kisméretű hajnövekedést tapasztaltunk: 5 betegből 1 esetében. A csak szisztémásan kezelt, p. o. 50 mg/ttkg/die adagban adott Isoprinosine<sup>®</sup>-terápia során AA esetében mind a 10 betegnél féléves kezelést követően közepes mértékű hajnövekedést tapasztaltunk, míg jó eredményt értünk el valamennyiüknel 1-éves kezelést követően. AT esetében az 5 betegből 1-nél észleltünk jó eredményt 1-éves kezelést követően. A két szer kombinációját alkalmazva már féléves kezelést követően jó eredményt értünk el mind a 10 betegünknel AA kórformában. AT esetében az 5 beteg közül 2 esetében figyeltünk meg közepes fokú javulást féléves kombinált terápiát követően, míg ennél a két betegnél jó, kozmetikailag elfogadható eredményt tapasztaltunk 1-éves kezelés után.

## Megbeszélés

Az alopeciás betegek esetében immunperoxidase-technikával végzett szövettani vizsgálatainkból kitűnik, hogy az általános immunológiai eltérések mellett jelentős szerepet játszanak a lokális immunológiai változások is. Az elvégzett vizsgálataink és az irodalmi adatok alapján tudott, hogy a sikeresen kezelt területeken a T supressor sejtek megszorodnak. A DCP hatásmechanizmusa szerint [5] — mint erős allergén — kontakt szenzibili-

zációt okoz és a peribulbáris infiltrációt adó T helper/supressor sejtek arányát megváltoztatva — mégpedig a T supressor sejtek számának megnövekedésével — indukál hajnövekedést [2]. Ilyen módon feltehetően a bulbusok működését gátló cytotoxicus sejtek gátlódnak és jön létre a hajnövekedés [2].

Immunhistológiai módszerünkkel igazoltuk továbbá a Langerhans sejtek felszaporodását a lokális kezelés során (*I. táblázat*) a sikeresen kezelt területeken. Ezen sejtek szerepe az alopecia pathomechanizmusában egyelőre nem tisztázott. Feltehetően az antigén-prezentációban játszott szerepük, ill. egyéb mediátorok indukciója révén vagy közvetlen módon is szerepük lehet a hajnövekedés indukciójában.

Betegeinknél a lokális immuneltérés kimutatása mellett, csökkent celluláris immunválaszt is igazoltunk, normális B sejttség mellett csökkent T sejtfunkciót [10], amely indokoltá tette a szisztémás immunterápiát, a p. o. adott Isoprinosine<sup>®</sup> szedését.

Terápiánk eredményeképpen megállapítható volt, hogy az immundefektus igazolása után alkalmazott immunterápiánk effektivitását jelentősen növelte a lokálisan (DCP) és szisztémásan alkalmazott (Isoprinosine<sup>®</sup>) szerek együttes alkalmazása.

Az alopecia terápiája meglehetősen komplex. A terápiás beavatkozások megkezdése előtt mindenképpen fontos az általános laboratóriumi vizsgálatok mellett az immunstátus részletes felmérése is.

1. ábra



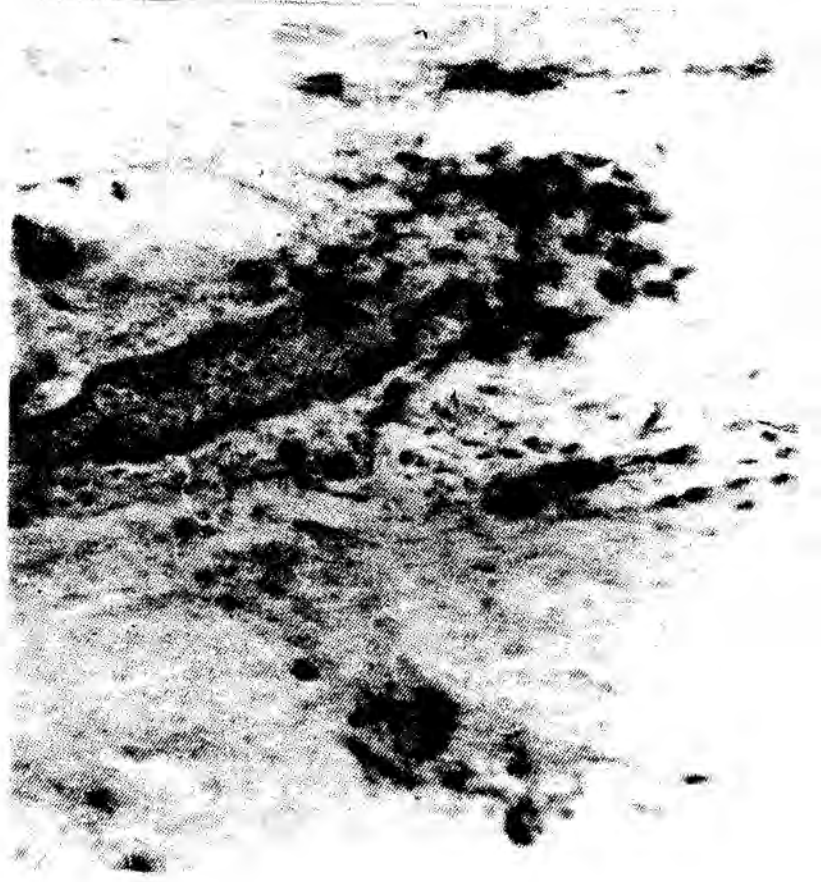
OKT\_4 reakció kezelés előtt, 60x. Perifollicularisan-65—70%-ban pozitív lymphocyták

2. ábra



OKT 4 reakció kezelés után, 40x. Perifollicularisan 50—60%-ban pozitív lymphocyták

3. ábra



OKT 8 reakció kezelés előtt, 60x. Perifollicularisan 15—20%-ban pozitív lymphocyták



OKT 8 reakció kezelés után, 40x. Perifollicularisan 25—30%-ban pozitív lymphocyták

- IRODALOM:** 1. Bröckner, E. B., John, S. M., Hamm, H.: Arch. Dermatol. Res., 281, 158 (1989). — 2. D'Ovidio, R., Vena, G. A., Angelini, G.: Arch. Dermatol. Res., 271, 265 (1981). — 3. Happle, R., Hausten, B. M., Wiesner-Menzel, L.: Acta Dermatovener. (Stockh.), 63, 49 (1985). — 4. Hsu, S. M., Raine L., Fauger, H.: Histochem. Cytochem., 29, 577 (1981). — 5. Ledesma, G. N., York, K. K.: Arch. Dermatol. Res., 271, 1 (1982). — 6. Lutz, G., Fritsche, Ch., Bauer, R., Kreysel, H. W.: Akt. Dermatol., 14, 222 (1988). — 7. Mitchell, A. J., Krull, E. A.: J. Am. Acad. Dermatol., 11, 763 (1984). — 8. Ochendorff, F. R., Mitron, G., Millradt, R.: Z. Hautkr., 61, 94 (1986). — 9. Orzechina, G., Rabbiosi, G.: Dermatologica, 171, 193 (1985). — 10. Perret, Ch., Wiesner-Menzel, L., Happle, R.: Acta Dermatovener. (Stockh.) 64, 26 (1984). — 11. Telegyi E., Schneider, I.: Immunológiai vizsgálatok alopecia areata és totalis diagnózisra hirtő betegek serumában (Bőrgyógy. veter. Szle. be beküldve). — 12. Zauli, D., Vironesi, S., Fucsoni, M., Lama, L., Melino, M.: Dermatologica, 171, 12 (1985). — 13. Zaun, H.: Z. Hautkr., 68, 639 (1987).

Érkezett: 1990. 11. 22.

Közlésre elfogadva: 1991. 04. 25.

**TELEGYI, E., MAGYARLAKI, M., SCHNEIDER, I.: Immunoperoxidase examination on patients with alopecia areata and alopecia totalis following local diphenecyprone and systemic inosiplexum therapy**

From the foreign and Hungarian literature datas it is known that in the background of alopecia areata and totalis diseases there are abnormal immunological changes. Examining the etiology of these diseases and of their results, the authors used local diphenecyprone and systemic inosiplexum therapy as an immunotherapy. Before and after the therapy they made histological and immunological examinations from the scalp.

2.

**Telegdy E., Somos Zs., Schneider I.:**

**Immunológiai vizsgálatok alopecia areatában  
és alopecia totalisban szenvedő betegeknél**

**Bőrgyógy.vener.Szle.68,65-68.1992.**

Pécsi Orvostudományi Egyetem Bőrgyógyászati Klinika  
(igazgató: Schneider Imre dr., egyetemi tanár) közleménye

## Immunológiai vizsgálatok alopecia areata-ban és alopecia totalis-ban szenvedő betegeknél

TELEGDY ENIKÓ DR., SOMOS ZSUZSANNA DR.,  
SCHNEIDER IMRE DR.

**ÖSSZEFOGLALÁS:** Az alopecia areata et totalis kórképek hátterében az immunológiai részvétel az irodalmi adatok alapján feltételezhető. A szerzők 34 alopecia areata és 17 alopecia totalis diagnózisú betegeiken végeztek — a betegek gyógykezelését megelőzően — részletes immunológiai háttérvizsgálatot.

**Kulcsszavak:** alopecia areata, alopecia totalis, csökkent T sejt funkció, keringő immunkomplex vizsgálatok

Az alopecia etiológiájában számos háttérbetegség játszhat szerepet, hormonzavarok, lichen ruber planus, lupus erythematosus, neoplasma. Ismert örökletes formája, okozhatja fizikai, kémiai behatás, különböző hiányállapotok, kromoszóma aberrációk (pl. *Down-kór*) [2].

Számos szerző foglalkozott az alopecia autoimmun eredetével [2, 3, 9, 11]. Az összefüggés egyelőre még egyértelműen nem bizonyított, az azonban bizonyított, hogy alopecia areata (AA) és alopecia totalis (AT) eseteinek jelentős részében autoantitestek és társult autoimmun kórképek mutathatók ki [6, 7, 8].

### Beteganyag és módszer

Kiterjedt típusú AA diagnózissal 34 beteget — 13 férfit és 21 nőt —, AT diagnózissal 17 beteget — 7 férfit és 10 nőt — vizsgáltunk, ill. kezeltünk. Ez utóbbi betegcsoportból 7 beteg — 4 férfi és 3 nő — alopecia universalis diagnózissal került felvételre. Betegeink átlagéletkora AA esetében 27,5 év, AT esetében 23,2 év volt.

*Laboratóriumi* vizsgálatainkkal alacsony se—Fe-értéket (14 umol/l alatti) AA esetében 23,5%-ban, AT esetében 23,5%-ban, alacsony se—Zn (12 umol/l alatti) AA esetében 3%-ban, AT esetében 0%-ban, emelkedett AST-értéket (240 IU feletti) AA esetében 26,5%-ban, AT esetében 12%-ban mutattuk ki. Egyéb általános laboratóriumi vizsgálatok nem játszanak lényeges szerepet az alopecia esetében, ezért azok részletezésére nem térnek ki.

Elvégzett góckutatás során pozitivitást AA esetében 29,4%-ban, AT esetében 12%-ban igazoltuk.

Betegeinknél a fent említett irodalmi adatok alapján, immunológiai vizsgálatokat is végeztünk. A vizsgálatok elvégzése előtt, legalább 3 hónapig sem lokális, sem szisztémás immunstimuláns, ill. immunsuppressív kezelésben nem részesültek a betegek. Más természetű, korábban diagnosztizált autoimmun megbetegedésben nem szenvedtek.

## Immuncytológiai vizsgálatok

T sejt <sup>(5)</sup>	alopecia areata (%) ± SD	alopecia totalis (%) ± SD	norm. érték (%) ± SD
spontán rozetta formációs test			
teljes	52,05 ± 6,09 NSZ	48,75 ± 13,17 NSZ	54,64 ± 10,29
aktív	31,30 ± 13,17	32,16 ± 14,87 NSZ	39,24 ± 9,31
B sejt			
MERF <sup>(1)</sup>	9,45 ± 7,00	8,90 ± 6,10	17,87 ± 7,09
IgGAM <sup>(1,2)</sup>	8,57 ± 5,86 NSZ	11,80 ± 11,95 NSZ	16,27 ± 6,87
MIF index (10)	0,98 ± 0,19 NSZ	1,09 ± 0,23 NSZ	0,96 ± 0,13

A serum immunglobulin quantitativ meghatározást Mancini módszerével végeztük.

A serum frakciók felbontását elektroforézissel, cellulóz acetát membránon végeztük. Immuncytológiai vizsgálataink rozetta technikával történtek.

Betegeinknél keringő immunkomplex meghatározást is végeztünk [4]. PEG precipitációs módszerrel. A CIC összefehérje-meghatározást spektrofotométerrel, Biuret reagens felhasználásával, míg a kvalitatív felbontást agargél immundiffúzióval végeztük. Eredményeink értékelésekor a statisztikai számítások a Student-féle kétmin-tás t-próbával történtek.

## Eredmények

Mindkét betegségrcsoport tagjainál elvégzett serum immunglobulin meghatározás és a serum frakciók elektroforezissel történt meghatározása során, átlagértékeink a normál tartományon belüliek voltak.

Celluláris immunológiai vizsgálatainkkal kimutattuk (I. táblázat), hogy mindkét betegségrcsoport tagjainál a B sejttség a normális tartományon belül van. Ezen belül azonban az egér rozetta kötő képességű subpopuláció csökkent és az Ig receptorok kötőképességének csökkenését észleltük a B sejteken. A macrophag-funkcióban lényeges eltérést nem észleltünk. A T-sejt vizsgálattal mind AA, mind AT esetekben csökkent T sejttség volt igazolható. A T-sejtek stimulálhatósága az AA formában jelentősen csökkent, míg AT kórfarmákban csökkent értékűnek bizonyult [8].

Az irodalmi adatok szerint az alopecia kórkepekben az antithyreoidea autoantitestek jelenléte a leggyakoribb [6], ezt vizsgálatainkkal 5 esetben tudtuk kimutatni (AA-ban 2, AT-ban 3 betegnél). Gastricus parietális autoantitestet AA esetében 2 betegnél igazoltunk.

Keringő immunkomplex vizsgálatainkkal (II. táblázat) a két betegségrcsoport tagjainál kórosan emelkedett keringő immunkomplex összefehérje szintet igazoltunk AT esetében. A kvalitatív felbontás során, kifejezetten az AT

## Keringő immunkomplexek vizsgálata

	alopecia areata (g/l) n = 12	alopecia totalis (g/l) n = 12	norm. érték (g/l)
immunkomplex összfehéje	1,565 ± 0,801 NSZ	2,030 ± 0,398	1,653 ± 0,163
IgG immunkomplex	0,358 ± 0,011	0,762 ± 0,398 NSZ	0,863 ± 0,198
IgA immunkomplex	—	—	0,029 ± 0,004
IgM immunkomplex	0,021 ± 0,001	0,025 ± 0,013	0,045 ± 0,013
C3 immunkomplex	0,013 ± 0,004	0,045 ± 0,025	0,028 ± 0,009

kórformában, C3 típusú keringő immunkomplexek emelkedett serumszintjét igazoltuk. IgA—CIC-et betegeinknél nem tudunk kimutatni, míg IgG és IgM—CIC serumszintje mindkét betegségsoport tagjainál a normál értékhez viszonyítva csökkentnek bizonyult.

## Megbeszélés

Az elvégzett vizsgálataink alapján is megállapítható, hogy az alopeciás kórképekben az immunológiai folyamatok szerepe nem vitatható. Valamennyi betegnél, mind az AA, mind AT kórformákban kimutattuk, hogy celluláris immundeficiencia áll fenn, ami elsősorban a T-sejtek funkcióképességének csökkenését jelenti. AT kórképekben valószerű azért nem olyan szembetűnő ez a csökkenés, mivel az aktív immunológiai folyamatok nagyrészt lezajlottak, a kórkép főleg többéves fennállást követően ún. nyugalmi stádiumba került. Az autoantitestek vizsgálata szintén fontos jelentőségű, a későbbi terápia szempontjából. Amennyiben egyéb autoimmun folyamatok állnak a háttérben, azok célzott kezelése szükséges, mivel ilyenkor az alopecia secunder történésnek értékelendő. A CIC-vizsgálatok szintén utalnak a kórkép immunológiai vonatkozására, elsősorban az immunológiai változások progrediáló, ill. lezajlott minőségére.

Ezen eredmények egyrészt a kórkép prognózisára szolgáltattak adatokat, másrészt a terápiás kezelés megválasztására.

A pontos pathomechanizmus tisztázására, ill. annak a megválasztására, hogy az AA, ill. AT esetében lokális vagy szisztémás immunológiai folyamatok játszó-e az elsődleges szerepet, további vizsgálatok szükségesek, ill. további, nagyobb számú beteganyag vizsgálatát igényli.

A közölt adatokból következtetve a terápia effektivitása szempontjából lényegesnek tartjuk a rutinvizsgálatok — góckutatás, serum laboratórium vizsgálatok, így nyomelemek, AST-érték, stb. — mellett az immunológiai status felmérését is.

**IRODALOM:** 1. Dobozy A. és mtsai: *Clin. exp. Immunol.*, 23, 382 (1976). — 2. Fitzpatrick, T. B.: *Dermatology in General Medicine*. McGraw Hill Book Company, USA, p. 627 (1987). — 3. Humbert, Ph., Dupond, J. L., Vuitton, D., Agache, P.: *Acta Dermatovener. (Stockh.)*, 63, 49 (1985). — 4. Husz S. és mtsai: *Bőrgyógy. Vener. Szle.*,



62, 121 (1986). — 5. *Johansen, U. S., Johansen, T. S., Talmage, D. W.: J. Allergy Clin. Immunol., 54, 86 (1974).* — 6. *Lutz, G., Bauer, R.: Hautarzt, 39, 5 (1988).* — 7. *Lutz, G., Bauer, R., Kreysel, H. W.: XVII. World Congress of Dermatology, Berlin, May 24–29 (1987).* — 8. *Lutz, G., Fritsche, Ch., Bauer, R., Kreysel, H. W.: Akt. Dermatol., 14, 222 (1988).* — 9. *Lutz, G., Kreysel, H. W.: 14. Kongress dem Ungarischen Dermatol. Gesellschaft, Budapest, 28–30. Aug. 1988.* — 10. *Szabó Gy. és mtsai: Orv. Hetil., 114, 32 (1973).* — 11. *Valsecchi, R., Rontempelli, M., Vicari, O., Frigeni, A.: Dermatologica, 171, 12 (1985).* — 12. *Winchester, R. J., Fu, S. M., Hoffman, T., Kunkel, H. G.: J. Immunol., 114, 1210 (1975).*

Érkezett: 1990. 11. 22.

Közlésre elfogadva: 1991. 04. 25.

TELEGDY, E., SOMOS, ZS., SCHNEIDER, I.: *Immunological examinations in patients with alopecia areata and alopecia totalis*

By the literature datas in the background of alopecia areata and totalis diseases the participation of the immunological system is supposed. The authors checked 34 patients with alopecia areata and 17 patients with alopecia totalis. They made their exact examinations about the immunological background before their therapy.

## Hazai hírek

1. 1991. októberében a MOTESZ — Kelet-Európában elsőként — megfigyelői státusszal felvételre nyert az *Európai Közösség Állandó Orvosi Bizottságába*. Az Állandó Bizottság az EK 12 tagállamának legjelentősebb orvosi szervezeteiből alakult és fő célkitűzései: a legmagasabb fokú orvosképzés, orvosi gyakorlat megvalósítása, az orvosi ellátás tanulmányozása, az orvosok szabad mozgása elősegítése az EK-n belül. Az Állandó Orvosi Bizottság munkáját 11 albizottság segíti elő. A MOTESZ célkitűzése az Állandó Bizottság munkájába történő mielőbbi bekapcsolódás és a tagegyesületek albizottságokban történő tevékenységének aktív elősegítése.

\*\*\*\*\*

2. A szakmai utak elősegítése céljából a MOTESZ együttműködési megállapodást kötött a Delta Tours Idegenforgalmi Irodával. A szerződés értelmében az utazási iroda a MOTESZ tagjai részére *Fl-térítés mellett* biztosít:

- kedvezményes menetjegyeket (repülő, vonat),
- egyedi és csoportos utakat (autóbusszal is),
- szállodai elhelyezést (világszerte),
- költőpénzt (nem napidíj),
- konkrét ajánlat néhány napon belül.

További információ: Dr. Kissné Kalmár Mária osztályvezető

MOTESZ Nemzetközi Kapcsolatok Osztálya Cím: 1145 Budapest, Columbus u. 11. Tel.: 163-38-99.

\*\*\*\*\*

3. A MOTESZ továbbra is biztosítja (Fl-térítés ellenében)

- a külföldi kongresszusok *részvételi díját*,
- a nemzetközi társasági *tagdíjak devizafedeztetését*.

További felvilágosítás: a Társaságok főtitkárainál és a MOTESZ Nemzetközi Kapcsolatok Osztályán.

3.

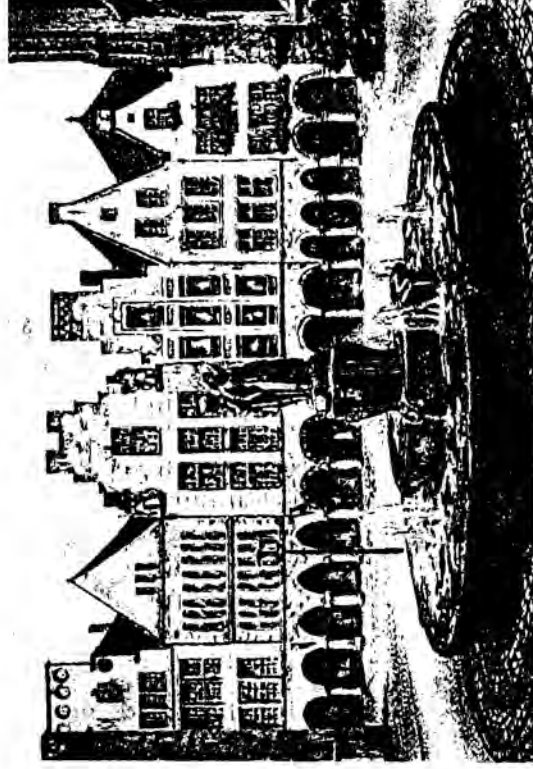
**Telegdy E., Lutz G., Mojzes J., Kreysel H.W.,  
Schneider I.:**

**Cytokine expression on keratinocytes in alopecia areata**

**Exp Dermatol 1994;3:119-149**

**EUROPEAN  
IMMUNODERMATOLOGY  
SOCIETY**

**6th Immunodermatology  
Symposium**



Münster, Germany

June 24-26

1994

**Abstracts**

from

***Experimental  
Dermatology***

#### CYTOKINE EXPRESSION ON KERATINOCYTES IN ALOPECIA AREATA.

Telegdy E.,\* Lutz G.,\*\* Mojzes J., Kreyssel H. W.,\*\* Schneider  
\*Med. Univ. Sch., Dept. Dermatol. Pecs, Hungary  
\*\*Med. Univ. Sch., Dept. Dermatol. Bonn, Germany

The object of this study is to establish the role of cytokines in alopecia areata (AA). 20 patients with AA were investigated. On scalp skin specimens IL 1 alfa and IL 2 receptors/expression as well as IL 1 beta and gamma-IF proteins' presence on the epidermal and bulbar keratinocytes in 25-50% while on the peribulbar lymphocytes these values were between 1-25%. The IL2 receptor's expression was observed in 25-50% on the peribulbar lymphocytes while the keratinocytes showed no positivity. The gamma-IFL was observed on the bulbar keratinocytes in 50-75% and in 1-25% on the peribulbar lymphocytes.

In healthy controls IL 1 alfa receptor and IL 1 beta protein expression on the epidermal and bulbar keratinocytes were negative. On the bulbar keratinocytes IL 2 receptors and gamma IL proteins in 1-25% were present, while the epidermal keratinocytes showed no positivity. Increased expression of IL 1 beta and gamma IF on the bulbar keratinocytes could be responsible for the secondary immunological mechanisms and for the consequent hair loss. According to our findings keratinocytes in strongly involved in the pathogenesis of AA.

#### SECRETION OF sIgA TO SKIN AND MUCOUS MEMBRANE OF PATIENTS WITH ATOPIC DERMATITIS

A. Toshitani, S. Imayama, Y. Hori, Department of Dermatology, Faculty of Medicine, Kuyushu University, Fukuoka 812, Japan.

By developing a relatively simple method, we measured the amount of secretory form of IgA (sIgA) present in sweat and tear in patients with atopic dermatitis (AD) and in normal healthy volunteers; for measuring sIgA in sweat, a cellulose membrane disk (10x10 mm) was affixed to the inner aspect of the upper arm skin for 24 hours, and a tiny tip (2x6 mm) was used to absorb sIgA in the tear. sIgA, which was absorbed to the membrane and accumulated during the period of application, was revealed by an enzyme immunoassay using antibodies for IgA and for the secretory component. The density was determined with a densitograph. The mean amount of sIgA secreted in sweat of patients with AD was  $3.86 \pm 0.71$  pg/mm<sup>2</sup>/day, which was significantly lower than that of normal donors. In contrast, the mean amount of sIgA in tear was  $799 \pm 105$  µg/ml in patients with AD, which was considerably higher than that of normal donors. These results may explain the high incidence of bacterial and viral skin infections seen in AD of the skin. Further investigation about ophthalmic lesions, especially allergic conjunctivitis and cataract associated with AD, should be necessary to evaluate.

#### THE EXPRESSION OF THE 27KD HEAT SHOCK PROTEIN IN HUMAN EPIDERMAL KERATINOCYTES IS RELATED TO DIFFERENTIATION

F. Trautinger<sup>1</sup>, D. Metzger<sup>2</sup>, I. Kindas-Mügge<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Div. of Spec. and Environ. Dermatol., Univ. Vienna;  
<sup>2</sup>Dept. Dermatol., Univ. Münster, FRG; <sup>3</sup>Inst. of Tumorbiology, Univ. Vienna, Austria;

The 27kD heat shock protein (HSP27) is a member of the small heat shock protein (HSP) family. Cell differentiation is a process in which a role for small HSPs has been suggested. We have focused on the expression of HSP27 in undifferentiated and in vitro differentiated human normal keratinocytes (HNK) as a marker of epidermal differentiation. The expression of HSP27 in normal human skin as well as in epidermal tumors has been investigated by immunohistology. Expression of HSP27 in HNK was investigated by immunohistochemistry and immunoblotting as well as by northern blotting.

We could demonstrate that HSP27 was expressed at low level in HNK, kept under low calcium conditions, where cells formed discrete colonies of undifferentiated, noncornified cuboidal cells (0.03mM Ca<sup>++</sup>). Upon cultivation in high calcium (1.00mM) a two fold increase in HSP27 expression was observed. A somewhat weaker increase in HSP27 mRNA expression was shown by northern blot analysis. Immunohistological investigations demonstrated that HSP27 is expressed in normal epidermis with an increased density in the upper layers. Staining of hair follicles was confined mainly to the outer root sheath. In contrast to benign epidermal proliferations, viral diseases, and inflammatory conditions epidermal carcinomas did not express significant amounts of HSP27.

Our studies provide evidence that HSP27 is accumulated in a differentiation-dependent manner in HNK in vitro, as well as in normal human skin and epidermal tumors. We conclude that HSP27 can be regarded as a marker of differentiation in human keratinocytes.

#### PUVA SUPPRESSES THE EXPRESSION OF CELL SURFACE MOLECULES OF KERATINOCYTES

K. Urano, R. Urano, T. Matsuyama, I. Matsuo, M. Ohkido, S. Habu\* Dept. of Dermatology, \*Division of Host Defence Mechanism, Dept. of Immunology, Tokai University School of Medicine, Isehara, Japan.

Adhesion of lymphocytes with target cells such as keratinocytes, fibroblasts or Langerhans cells is a mandatory event in pathogenesis of inflammatory skin diseases. We already reported the suppressive effect of PUVA on the expression of cell adhesion molecules of lymphocytes. To determine the therapeutic mechanism of PUVA on psoriasis vulgaris, the effects of PUVA on the expression of cell surface molecules of keratinocytes were investigated *in vitro*.

Keratinocytes cultured with r-TNF and r-IFN $\gamma$  were irradiated with UVA light in the presence of 8-methoxypsoralen. The expression of HLA-DR and ICAM-1 molecules analyzed by FACScan was decreased in PUVA treated keratinocytes with increasing UVA fluence. Moreover, these PUVA treated cells showed significantly decreased expression of HLA-DR and ICAM-1 molecules even with the addition of r-TNF and r-IFN $\gamma$  in culture medium. These results suggest that the therapeutic effects of PUVA on psoriasis vulgaris can be induced by suppression of the expression of cell surface molecules of keratinocytes.

**Telegdy E.,\* Lutz G.,\*\* Kreysel H.W.,\*\*  
Schneider I.,\* Szekeres Gy.\*\*\***

\* Pécs Univ.Med.Sch.Dept.Dermatol./Hungary

\*\* Bonn Univ.Med.Sch.Dept.Dermatol./Germany

\*\*\* Laboratory of Histopathology, Pécs

**Immunohistochemical assesement of adhesion molecules  
in alopecia areata**

megjelenés alatt

# IMMUNOHISTOCHEMICAL ASSESSMENT OF ADHESION MOLECULES IN ALOPECIA AREATA

Telegdy E., \* Lutz G., \*\* Kreyssel H.W., \*\* Schneider I., \* Szekeres Gy. \*\*\*

\* Pécs Univ. Med. Sch. Dept. Dermatol./Hungary

\*\* Bonn Univ. Med. Sch. Dept. Dermatol./Germany

\*\*\* Laboratory of histopathology, Pécs

Enikő Telegdy MD  
Univ. Med. School Pécs  
Dept. Dermatology  
Kodály Z.u.20.  
Pécs  
7624 - Hungary

## Summary

The immunomorphology of adhesion molecules on epidermal and bulbar keratinocytes, as well as on perifollicular endothelial and inflammatory cells in 30 patients with alopecia areata was studied using CD54 (intercellular adhesion molecule, ICAM-1), CD62E (endothelial adhesion molecule, ELAM-1), CD62L (leukocyte adhesion molecule, LAM-1) and CD106 (vascular adhesion molecule, VCAM-1) specific monoclonal antibodies and alkaline phosphatase anti alkaline phosphatase (APAAP) and streptavidin-biotin-peroxidase technique. Normal scalp was used as negative control tissue. The expression of CD54 was increased on both bulbar and epidermal keratinocytes, as well as on reactive cells of peribulbar inflammatory infiltrates in alopecia areata compared with skin of normal scalp. The expression of CD62E and CD62L was strongly increased on bulbar keratinocytes, as well as peribulbar inflammatory cells were also positive. Immunostaining of CD106 antigen was observed on vascular endothelial cells and also on peribulbar reactive cells and on bulbar keratinocytes. These findings suggest that cellular adhesion molecules expressed by keratinocytes and inflammatory cells play a significant role in the pathogenesis of alopecia areata, and the immunomorphological detection of adhesion molecules in tissue sections may help to study intercellular interactions in this disease.

## Introduction

There are a lot of arguments in the literature dealing with the autoimmune origin of alopecia areata pro (6) and contra (32).

The presence of the perifollicular lymphocytic infiltration, the destruction of the follicles has been proved histologically. The presence of antibulbar antibodies is also proved immunohistologically (6). The alopecia is also often associated with different autoimmune diseases. All these above should prove the autoimmune origin of alopecia areata (AA) (21).

In one of our previous studies we could demonstrate that the CD4:CD8 ratio of lymphocytes is four times greater than the normal value (30) and at the same time the number of MHC-II and CD3 positive cells significantly increased. We also showed out that there is a significant expression of interferon-gamma (IFN-gamma) on bulbar keratinocytes and there is a significant expression of ICAM-1 (CD 54) on the peribulbar infiltration (Table 1).

In a recent study we examined the role of other adhesion molecules as they have an important role in the inflammation through the induction of further lymphokines and further antigen expression on epithelial cells, T and B lymphocytes and keratinocytes (1,4,5,11,15,17,19,20, 22,28,30).

## Patients and methods

### Patients:

We examined 30 patients with alopecia areata. They were 20 female and 10 male patients ranging from 13 to 61 years of age. The possibility of autoimmune processes was precluded (we could not identify autoantibodies in the serum). The alopecia foci had been on the scalp for no longer than 3 months. The patients received neither systemic nor local treatment before the examinations. The results were compared to the biopsied material obtained from the normal scalp (remaining from scalp plastic

operations). We examined an average of 30 hair follicles per patient for antibody in cases of AA. An average of 60 hair follicles were examined from each of the 5 control patients with normal scalp from plastic surgery.

#### Biopsy

Six mm punch biopsies were removed from the active edge of the most recent AA scalp lesions. This histological material was frozen in liquid nitrogen and 5  $\mu$ m sections prepared by cryotomy. The sections were fixed in acetone at -25 °C after being dried for 10 minutes at room temperature.

#### Monoclonal antibodies

CD 54 (ICAM-1) (clone 84H 10 Immunotech GmbH, Hamburg, Germany) diluted 1:40 in Tris buffer (anti-ICAM-1 receptor anti-mouse immunoglobulin).

CD 106 (VCAM-1) (clone 1G11), (Immunotech GmbH, Hamburg, Germany) diluted 1:10 in

Tris buffer (anti-VCAM-1 membranprotein immunoglobulin)

CD62L (LAM-1) (clone DREG 56), (Immunotech GmbH, Hamburg, Germany) diluted 1:10 in Tris buffer (anti LAM-1 receptor immunoglobulin).

CD62E (ELAM-1) (clone 1.2B6) (Immunotech GmbH, Hamburg, Germany) diluted 1:25 in Tris buffer (anti ELAM-1 anti-glycoprotein immunoglobulin)

Rabbit anti-mouse immunoglobulin DAKO-PATTS, Kopenhagen, Denmark ) diluted 1:150 in Tris buffer with albumine medium.

APAAP ( monoclonal mouse alkaline phosphatase (clone AP7 (6.7) DAKO-PATTS, Kopenhagen, Denmark ) diluted 1:100 in Tris buffer.

#### Alcaline Phosphatase Anti Alcaline Phosphatase technique (APAAP)

The sections were washed with Tris buffer for 2 minutes and then incubated with CD54 primary antibody for 30 minutes at room temperature in a moist chamber, or with CD62E, CD62L, CD106 during a night at 4 °C in a humidity chamber, after which they were rinsed thoroughly in Tris buffer before being incubated in the secondary antibody for 30 minutes and then incubated with APAAP complex for 25 minutes. To stain we used



Naphtol AS-Mx phosphate and Fast-Red-Substrate solution (Sigma) diluted 1:10 to stain for 20 minutes.

#### Streptavidin-biotin complex peroxidase (ABC) technique

The immunohistochemical staining was performed with a routine three-step immunoperoxidase technique by Hsu (12). The slides were treated sequentially with normal goat serum, monoclonal rat antibody against CD106, biotinylated goat anti-rat IgG at a dilution of 1:500, and avidin-biotin-peroxidase complex at a 1:220 dilution. The reaction was visualized by adding 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride in the presence of hydrogen peroxide. The procedure was performed at room temperature.

#### Evaluation:

The stained slides were assessed by light microscope. The percentage of positive staining cells were evaluated. Cause of the low patients number statistical significance we didnot count.

#### Results

##### Peribulbar infiltrates

CD54 expression was observed in 25-50 % of the cells in cases of alopecia areata (Table 1., Fig 1 ) whilst in normal scalp the value was about 10 % with a range of 1-25 %.

CD62E (Table 2 ) and CD62L (Table 3 ) expression was observed in 25-50 % of cells in cases of alopecia areata (Fig.2.). Normal scalp proved negative for both antibodies. The results of CD106 examination we found an increased positively staining cells, reactive lymphocytes / in 50-75 % / (Fig 3 ) whilst the normal scalps were negative (Table 4.).

##### Peribulbar capillar endothelial cells

In alopecia areata we have found and extreme positivity with CD54 antibody on peribulbar capillar endothelial cells in a 50-75 %, while in normal cases this expression was only 1-25 % on these cells.

With the CD62E antibody we observed also a strong positivity, 50-75 % of the endothelial cell expressed CD62E antigen. In normal scalp we could not found any positivity.

And the endothelial cells of perifollicular capillaries showed a high, 75-100 % CD106 positivity of the cells in the cases of alopecia areata whilst in the normal cases only 1-25 %.

#### Keratinocytes

The CD106 expression on both bulbar and epidermal keratinocytes occurred with a frequency of 1-25% of the cells in cases of alopecia areata (Table 1. ). Normal scalp proved negative for both of the bulbar and epidermal cells .

The CD62E expression on bulbar keratinocytes occurred with a frequency of 50-75 % of these cells in cases of alopecia areata (Table 2.) as epidermal keratinocytes proved negative . On papillar cells this ratio was 75-100 % (Fig.2). Normal scalp proved also negative for both the cells of the bulb and the epidermis .

The CD62L expression was detected in 25-50 % of bulbar keratinocytes in alopecia areata (Table 3 ), while the occurrence of epidermal keratinocytes was 1-2 %. On examining the bulbar and dermal keratinocytes we did not get any positive findings in normal controls .

CD106 expression on epidermal keratinocytes proved negative, whilst on papillar endothel cells was strongly positive. (Table 4, Fig.4.)

#### Discussion

Alopecia is a lymphocyte mediated disease and its autoimmune origin has become less and less controversial recently (21) The hair loss is caused by an

inflammatory process in which not only the T lymphocytes but the bulbar keratinocytes play an important part (2,3). Though it is still disputable if the abnormal cell composition of the peribulbar infiltration is of primary importance in the loss of hair or it should be regarded as a secondary process triggered by certain cells of the bulbs (14,16)

It is already proved that due to antigen stimulus on the keratinocytes, lymphocytes, Langerhans cells and vascular endothelial cells different antigens are expressed as mediators of the inflammatory process (5,16). These expressed, different antigens release lymphokines, which take part in the regulation of other antigen expression and pass further inflammatory mechanisms (1,4,9,10,17,19,20,28,29,34). Presumably their most important role is that through their activation takes place the cellular invasion of the tissues along the capillaries, involving them into the inflammation (18).

Which is that antigen what can be considered as a primary antigen and can start that cytotoxic immunological process againsts the hair folliculus have not been sufficiently described so far (19). Some authors have found bulbar antigens binding specific antibodies in alopecia areata and consider that as a cause of the destroying process (6,14). Other authors observed the same antigen-antibody reaction on some follicules in normal scalp also and consider this expression as a part of the normal immunresponce (32).

One of our questions was if the antigen expression on the bulbar keratinocytes is primary or secondary which is even now controversial (2,7,25) and the other was what kind of cells are marked with our antibodies, proving their role in the etiology of alopecia . In the process of hair loss time also plays an important role. The earliest expressed antigen is the CD62E which disappears quite quickly. CD62E induces the expression of the CD62L. CD106 expression also takes place later than that of CD62E and could be observed for the shortest time. The CD54 is also expressed in the early stage but lasts much longer than CD106. The CD54 and CD106 positivity of peribulbar endothelial cells shows that capillaries really have an important role in the inflammatory mechanism and they became positive in a quite early stage of the alopecia areata (31,33). The high

coincidence of the CD4 and CD54 positive lymphocytes in the perifollicular infiltrate can be an evidence that cytotoxic T cells have an important role in the process of alopecia (8,30). The positivity of CD62L and CD106 bulbar keratinocytes and peribulbar inflammatory cells makes obvious that peribulbar lymphocytes do interact with the bulbar keratinocytes (23,24,25,26,28). CD106 normally expressed on activated endothelial cells, as we have found its expression on perifollicular lymphocytes and papillar cells we think that it could be a marker of the extream invasion of the lymphocytes towards the bulbar cells as it was observed by tumors analogous to CD54 (13).

We consider that the above mentioned antigen-expressions on the bulbar keratinocytes and papillar endothelial cells swich on also the immunological mechanisms causing hairloss as-through this processes their antigen character changes.

We are convinced that answering our questions namely which of the cells play the primary role in the hair loss and what kind of role the lymphocytes play in the whole process exactly requires further examinations on hair bulb cell cultures.

1. Table

## EXAMINATION OF CD54 (ICAM-1) EXPRESSION IN ALOPECIA AREATA

	alopecia areata	normal scalp
peribulbar infiltration	25 - 50 %	1 - 25 %
bulbar keratinocyte	1 - 25 %	NEGATIVE
epidermal keratinocyte	1 - 25 %	NEGATIVE
peribulbar capillaries	50-75 %	1 - 25 %

2. Table

## EXAMINATION OF CD62E (ELAM-1) EXPRESSION IN ALOPECIA AREATA

	alopecia areata	normal scalp
peribulbar infiltration	25 - 50 %	NEGATIVE
bulbar keratinocyte	50 - 75 %	NEGATIVE
epidermal keratinocyte	NEGATIVE	NEGATIVE
papillar cells	75 - 100 %	NEGATIVE
peribulbar capillaries	50-75 %	NEGATIVE

3. Table

## EXAMINATION OF CD62L (LECAM-1) EXPRESSION IN ALOPECIA AREATA

	alopecia areata	normal scalp
peribulbar infiltration	25 - 50 %	NEGATIVE
bulbar keratinocyte	1 - 25 %	NEGATIVE
epidermal keratinocyte	1 - 2 %	NEGATIVE

4. Table

## EXAMINATION OF CD106 (VCAM-1) EXPRESSION IN ALOPECIA AREATA

	alopecia areata	normal scalp
peribulbar infiltration	50-75 %	NEGATIVE
papillar endothel cells	50-75 %	NEGATIVE
epidermal keratinocyte	NEGATIVE	NEGATIVE
peribulbar capillaries	75 - 100 %	1 - 25 %

## Literature

1. Albeida SM, Buck CA: Integrins and other cell adhesion molecules The FASEB Journal. Vol.4 1990. 2868-2880
2. Barker JNWN, Sama V., Mitra RS., Dixit VM., Nickoloff B.J.: Marked Synergism between Tumor Necrosis Factor -alfa and Interferon- gamma in Regulation of Keratinocyte-derived Adhesion Molecules and Chemotactic Factor J Clin Invest Vol.85.1990.605-608
3. Boehncke WH, Kellner I., Konter U., Sterry W.: Differential Expression of Adhesion Molecules on Infiltrating cells in Inflammatory Dermatoses J Am Acad Dermatol Vol.26.No.6. 1992.907-913
4. Brod SA., Purvee M., Benjamin D., Hafler DA., T-T Cell Interaction are Mediated by Adhesion Molecules Eur J Immunol Vol.20.1990.2259-2268
5. Brooks G., Idson B.: Immunology - Concepts and Skin Relationship J Soc Cosmet Chem Vol.41.1989.249-257
6. Calver N.S., Macdonald - Hull S., Parkin S.M., Cunliffe W.J., Randall V.A.: Autoantibodies in alopecia areata. European Hair Research Society III. Annual Meeting Okt. 2.-3.1992, Berlin
7. Caughman SW., Lian-Jie L., Degitz K.: Characterization and Functional Analysis of Interferon-gamma-induced Intercellular Adhesion Molecule-1 Expression in Human Keratinocytes and A 431 Cells J Invest Dermatol Vol.94.No6S 1990.22S-26S
8. D'Ovidio R., Vena G.A., Angelini G.: Cell-mediated immunity in Alopecia Areata Arch Dermatol Res. Vol. 271. 1981. 265-273.
9. Gilhar A., Etzioni A., Assy B., Eidelman S.: Response of Grafts from Patients with Alopecia areata Transplanted onto Nude Mice. In Administration of Interferon-gamma Clin Immunol Immunopath. Vol.66 No 2. 1993.120-126
10. Hamm H., Klemmer S., Kreuzer I., Steijlen PM., Happle R., Bröcker EB HLA-DR and HLA-DQ Expression of anagen and telogen Hair Bulbs in Long-standing Alopecia areata Arch Dermatol Res Vol.280.1988.179-181
11. Huff J.C.: Epithelial Polymeric Immunglobulin Receptor J Invest Dermatol Vol.94. No 6S 1990.74S-78S
12. Hsu SM, Raine L., Fanger H.: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immuno peroxidase techniques: a comparison of ABC and unlabeled antibody (PAP) procedure. J Histochem Cytochem 1981 ;29:577-84.
13. Johnson J.P., Stade B.G., Holzmann B., Schwable W., Riethmüller G.: De novo expression of intercellular-adhesion molecule-1 in melanoma correlates with increased risk of metastasis. Proc Natl Acad Sci. USA Vol. 86. 1989. 641-644.
14. Kalish RS., Johnson KL., Hordinsky MK. Alopecia areata. Arch Dermatol Vol.128.1992.1072-1077
15. Kaufmann R., Weber L., Klein CE.: Integrine-neue Rezeptormolek: ihre Bedeutung für die Differenzierung, Regeneration und Immunantwort der Haut Hautarzt Vol. 41.1990.256-261
16. Khoury EL., Price VH., Greenspan JS. HLA-DR Expression by Hair Follicle Keratinocytes in Alopecia Areata: Evidence That it is Secondary to the Lymphoid Infiltration J of Invest Dermatol Vol.90.No.2.1988.193-200

17. Klein C.E. Adhesions-receptoren. *Hautarzt* 45:263-284, 1994
18. Lobb R.R., Chi-Rosso G., Leone D.R., Rosa M.D., Bixler S.: Expression and functional characterization of a soluble form of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1. *J. of Immunol.* Vol. 147, 124-129, No. 1, 1991.
19. Lofft T., Knoepfel B.: Expression of T6 Antigen on Keratinocytes in Alopecia areata. *Int J of Dermatol* Vol. 31, No. 2, 1992, 103-109
20. Luger T.A., Schwarz T.: Epidermal Growth factors and cytokines ed. *Markel Dekker, Inc.* 1994.
21. Lutz G., Bauer R.: Die Autoimmunität der Alopecia areata. *Hautarzt* Vol. 39, 1988, 5-11
22. Matsue H., Cruz PD., Bergstresser PR., Takashima A.: Cytokine Expression by Epidermal Cell Subpopulation. *J Invest Dermatol* Vol. 99, No. 5S, 1992, 42S-45S
23. Norton J., Sioane J.P., Delia D., Greaves M.F.: Reciprocal expression of CD 34 and cell adhesion molecule ELAM 1 on vascular endothelium in acute cutaneous graft-versus-host disease. *J. of Pathology*. Vol. 170, 173-177, 1993.
24. Orecchia G., Capelli E., Martinetti M., Beivedere MC., Rabbiosi G.: Decreased in vitro Lymphocyte stimulation and reduced Sensitivity to IL-2 in Patients with Alopecia areata. *Arch Dermatol Res* Vol. 280S, 1988, 47S-50S
25. Picker L.J., Kishimoto T.K., Smith C.W., Warnock R.A., Butcher E.C.: ELAM 1 is an adhesion molecule for skin homing T cells. *Nature* 349, No. 6312, 1991, 796-799
26. Pober J.S., Cottrai R.S.: Expression of endothelial adhesion molecules in tissue. *Laboratory Investigation*. Vol. 64, No. 3, 301-304, 1991
27. Shimizu Y., Shaw S., Graber N., Gopal T.V., Horgan K.J., Van Severter G.A., Newman U.: Activation-independent binding of human memory T cells to adhesion molecule ELAM 1. *Nature* Vol. 349, No. 6312, 799-802, 1991
28. Singer KH., Le PT., Denning SM., Whichard LP., Haynes BF.: The role of Adhesion Molecules in Epithelial - T -Cell interactions in Thymus and Skin. *J Invest Dermatol* Vol. 94, No. 6S, 1990, 85S-88S
29. Springer TA.: Adhesion receptors of the Immune System. *Nature* Vol. 346, 1990, 425-434
30. Telegdy E., Magyarlaki M., Schneider I.: Alopecia areaban és alopecia totalisban szenvedő betegek immunperoxidase vizsgálatát követett diphenocyprone kulső és isoprinosine belső kezelése. *Börgey és Vener Szle II* 1992, 59-64, vol. 68?
31. Teunissen MBM.: Functional Role of Adhesion Molecules LFA-1 and ICAM- 1 on Cultured Human Epidermal Langerhans Cells in Antigen-Specific T-cell Activation. *J Invest Dermatol* Vol. 99, No. 5S, 1992, 77S-79S
32. Tobin D.J., Bystrin J.C.: Autoimmunity to hair follicles in normal individuals. *Dermatology* 2000, Pécs, 18.-21. Majus, 1993.
33. Van Severter GA., Shimizu Y., Horgan K.J., Shaw S.: The LFA-1 Ligand ICAM-1 Provides an Important Costimulatory Signal for T Cell Receptor-Mediated Activation of Resting T Cells. *J of Immunology* Vol. 144, No. 12, 1990, 4579-4585



34. Winiski AP, Foster CA.: ICAM-1 Expression in a Spontaneously Transformed Human Keratinocyte Cell Line: Characterization by Simple Cell-ELISA Assay. J Invest Dermatol Vol.99, No. 1 1992 48-52

Fig.1. CD54 (ICAM-1) expression  
in alopecia areata  
APAAP, 40x



Fig.2. CD62E (ELAM-1) expression  
in alopecia areata  
APAAP, 40x

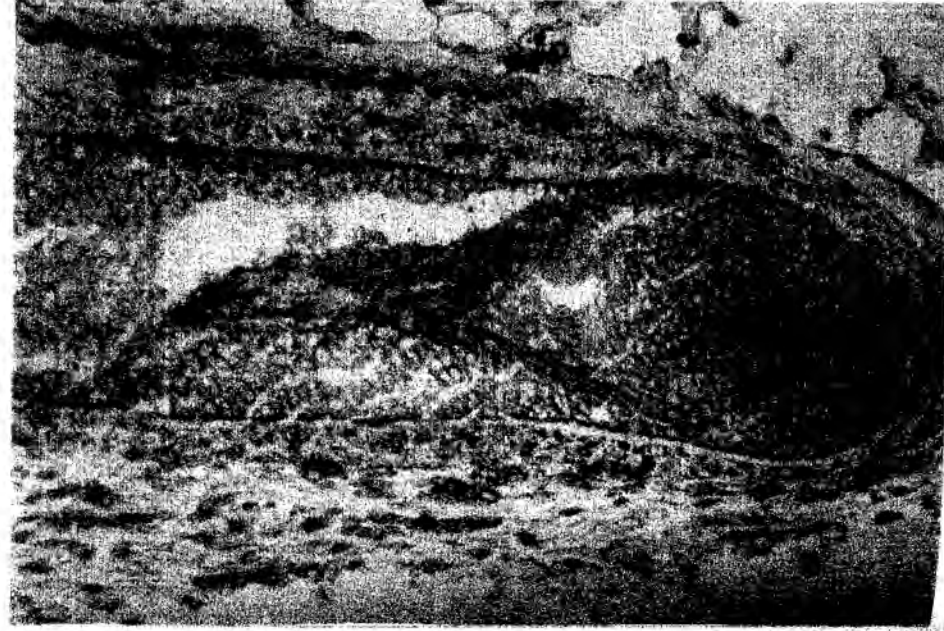
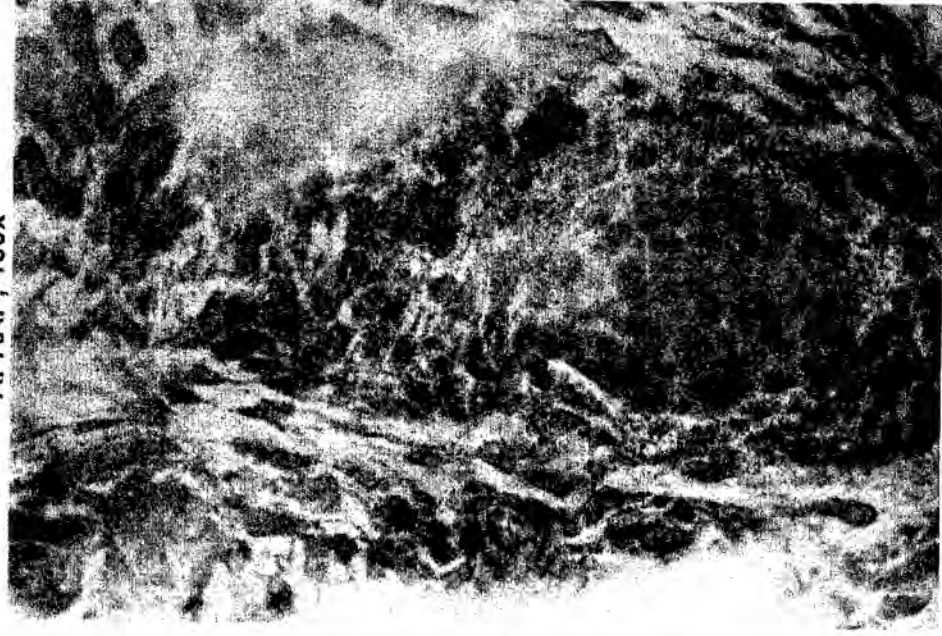


Fig.4. CD106 (VCAM-1) expression  
in alopecia areata  
on bulbar keratinocytes  
APAAP, 100x



**Fig.3. CD106 (VCAM-1) expression  
in alopecia areata  
ABC,40x**



5.

**Telegdy E.,\* Lutz G.,\*\* Kreysel H.W.,\*\*  
Schneider I.,\* Szekeres Gy.\*\*\***

\* Pécsi Bőrgyógyászati Klinika

\*\* Bonni Bőrgyógyászati Klinika, Németország

\*\*\* Hisztopatológiai Laboratórium, Pécs

**Adhéziós molekulák immunhisztokémiai vizsgálata alopecia  
areataban**

megjelenés alatt

Pécsi Orvostudományi Egyetem, Bőrgyógyászati Klinika / Ig. Farkas Betatrix Dr. /  
Bonni Orvostudományi Egyetem, Bőrgyógyászati Klinika / Ig. Kreysel H.W. Dr. /  
Hisztopatológiai Laboratórium, Pécs / vez.: Szekeres György dr. /  
közléménye

Adhéziós molekulák immunhisztokémiai vizsgálatai alopecia areatában

Telegdy E., \* Lutz G., \*\* Kreysel H.W., \*\* Schneider I., \* Szekeres Gy.\*\*\*

\* Pécsi Bőrgyógyászati Klinika

\*\* Bonni Bőrgyógyászati Klinika

\*\*\* Hisztopatológiai Laboratórium, Pécs

### Összefoglalás

A szerzők jelen közleményükben 30 alopecia areata diagnózisú betegnél, monoklonális antitestekkel, APAAP III. ABC technikával vizsgálták az epidermális ill. bulbáris keratinocytákon, perifolliculáris capilláris endothelsejteken, valamint perifolliculáris lymphocytákon az adhéziós molekulák immunmorfológiai sajátosságait.

Vizsgálatok CD54 ( ICAM-1, intercelluláris adhéziós molekula), CD62E ( ELAM-1, endothelialis adhéziós molekula), CD62L ( LAM-1, leukocyta adhéziós molekula), és CD106 ( VCAM-1, vascularis adhéziós molekula) molekulák expressziójára irányultak. Negatív kontrollként normál hajas fejbőrt használtak. A CD54 expresszió kifejezettnek bizonyult mind a bulbáris mind az epidermális keratinocytákon valamint a peribulbáris infiltrációt adó reaktív inflammatorikus sejteken alopecia areatában szemben a normál hajas fejbőrrel. A CD62E és CD62L expressziója megemelkedett volt a bulbáris keratinocytákon, valamint a peribulbáris inflammatorikus sejteken. CD106-os antigén immunfestődését figyeltek meg a szerzők vascularis endothelsejteken ill. peribulbáris reaktív lymphocytákon, csakúgy mint bulbáris endothelsejteken. Ezen megfigyelések szerint a keratinocytákon és az inflammatorikus sejteken történő adhéziós molekulák expressziója fontos szerepet játszik az alopecia areata patogenezisében és az adhéziós molekulák immunmorfológiai detektálása a szövettani metszeten segítséget nyújthat ezen betegség intercelluláris kölcsönhatásainak tanulmányozásában.

**Kulcsszavak:**

alopecia areata - adhéziós molekulák

## Summary

The immunomorphology of adhesion molecules on epidermal and bulbar keratinocytes, as well as on perifollicular endothelial and inflammatory cells in 30 patients with alopecia areata was studied using CD54 (intercellular adhesion molecule, ICAM-1), CD62E (endothelial adhesion molecule, ELAM-1), CD62L (leukocyte adhesion molecule, LAM-1) and CD106 (vascular adhesion molecule, VCAM-1) specific monoclonal antibodies and alkaline phosphatase anti alkaline phosphatase (APAAP) and streptavidin-biotin-peroxidase technique. Normal scalp was used as negative control tissue. The expression of CD54 was increased on both bulbar and epidermal keratinocytes, as well as on reactive cells of peribulbar inflammatory infiltrates in alopecia areata compared with skin of normal scalp. The expression of CD62E and CD62L was strongly increased on bulbar keratinocytes, as well as, peribulbar inflammatory cells were also positive. Immunostaining of CD106 antigen was observed on vascular endothelial cells and also on peribulbar reactive cells and on bulbar keratinocytes. These findings suggest that cellular adhesion molecules expressed by keratinocytes and inflammatory cells play a significant role in the pathogenesis of alopecia areata, and the immunomorphological detection of adhesion molecules in tissue sections may help to study intercellular interactions in this disease.

## Key words

alopecia areata - adhesion molecules

## Bevezetés

Az alopecia areata autoimmun eredetére vonatkozó vizsgálatok számos érvet (6) ill. ellenérvet (32) sorolnak fel. A perifolliculáris infiltráció jelenléte, a szövettani metszeteken gazolt folliculusok lymphocytás beszűrődése és destrukciója, az immunhisztológiai módszerekkel igazolt folliculus sejtek elleni antitestek jelenléte (6), ill.

a kórképnek az autoimmun betegségekkel való, oly gyakori társulása, mind bizonyító erejűek az alopecia areata autoimmun hátterre vonatkozóan (21). Korábbi munkánkban kimutattuk, hogy az infiltrációt elsősorban alkotó lymphocyták arányában az CD4:CD8 viszonya a normálisnak csaknem négyszerese. Ugyanakkor jelentős az MHCII ill. CD3 pozitív sejtek száma (30). Korábbi munkánkban kimutattuk továbbá, hogy a bulbáris keratinocytákon jelentős a gamma interferon expressziója ill. a peribulbáris infiltrációban számottevő az adhéziós molekulák közül az CD54 (ICAM-1) expresszió (1 táblázat). Jelen vizsgálatainkkal további adhéziós molekulák szerepét vizsgáltuk, ugyanis expressziójuk jelentős szerepet kap a gyulladási folyamat kialakulásában további lymphokinek felszabadulásában ill. újabb antigén expressziókat vált ki a epitheliális sejteken, T és B lymphocytákon ill. keratinocytákon ( 1,4,5,11,15,17,19,20,22,28,30 )

#### Beteganyag és módszer

##### Betegek:

30 alopecia areata diagnosztizált betegeknél végeztük el vizsgálatainkat. 20 nő és 10 férfi betegnél. A betegek életkora 13-61 év között volt. A betegeknél autoimmun folyamatokat kizártunk ( autoantitestek jelenlétét a serumban nem tudtuk igazolni ). A fejbőrön az alopeciás göcök jelentkezése 3 hónapnál nem volt régebbi. A vizsgálatok előtt a betegeket sem szisztémás, sem helyi kezelésben nem részesítettük. A kapott eredményeket normál hajas fejbőről nyert biopsziás anyaggal hasonlítottuk össze. Betegenként és antifitezenként átlagosan 30 szörtüszőt vizsgáltunk alopecia areataban, míg normál hajas fejbőrön az 5 kontroll betegnél átlagosan 60 szörtüsző került vizsgálatra.

##### Biopszia:

6 mm-es punch biopsziás anyagot használtunk fel. A mintát a hajas fejbőről a legfinszebb alopeciás göc széli részéből nyertük. A szövettani anyagot folyékony nitrogénben fagyasztottuk le, majd kriosztáttal, -25 °C-fokon 5 µm vastag metszeteket

készítettünk. A metszeteket 10 percig való szobahőmérsékleten való szárítás után - 25 °C fokban acetonnal fixáltuk, majd újabb 30 percig szárítottuk szobahőmérsékleten.

#### Monoklonális antitestek

CD54 (ICAM-1) (clon 84H 10 Immunotech GmbH, Hamburg, Németország) 1:40 koncentrációban, TRIS pufferben oldva (anti-ICAM-1 receptor anti-mouse immunoglobulin)

CD106 (VCAM-1), (clon 1G11), (Immunotech-Dianova GmbH, Hamburg, Németország) 1:10 koncentrációban, Tris pufferben oldva (anti VCAM -1 membránprotein immunoglobulin).

CD62L (LAM-1) (clon DREG 56), (Immunotech-Dianova GmbH, Hamburg, Németország) 1:10 koncentrációban, Tris pufferben oldva, (anti LECAM-1 receptor ellenes lyophilizált immunoglobulin).

CD62E (ELAM-1) (clon 1.2B6), (Immunotech-Dianova GmbH, Hamburg, Németország) 1:25 koncentrációban, Tris pufferben oldva, (anti ELAM-1 glycoprotein ellenes immunoglobulin)

Rabbit anti-mouse immunoglobulin, (DAKO-PATTS, Kopenhagen, Danemark) 1:150 higításban Tris pufferben, albuminos közegben.

APAAP (monoclonalis egér alkalikus foszfatáz clon AP7/6/7), (DAKO-PATTS, Kopenhagen, Danemark) 1:100 higításban Tris pufferben.

#### APPAP immunfestés

A metszeteket 2 perces Tris pufferrel való mosást követően CD54 primer antitestiszobahőmérsékleten inkubáltuk 30 °C nedves kamrában, ill CD62E, CD62L, CD106 antitestekkel egy éjszakán keresztül +4 °C fokon inkubáltuk, nedves kamrában Tris pufferes mosást követően 30 percig a szekunder antitesttel inkubáltuk, majd 25 percig APAAP komplexszel. A reakciót Naphtol AS Mx phosphate és Fast-Red-Substrat oldattal 1:10 higításban, 20 percig festettük.

Streptavidin-biotin komplex peroxidase (ABC) technika



Az immunhisztokémiai festést a rutinszerű háromlépcsős immunperoxidase technikával végeztük Hsu szerint (12)

A metszeteket először normál kecske szérummal kezeltük, majd CD106 elleni monoklonális patkány antitestet adtunk hozzájuk. Ezt követően biotinált kecske anti-patkény IgG-t 1:500-as hígításban majd avidin-biotin-peroxidase komplexet adtunk a rendszerhez 1:220-as hígításban. A reakciót 3,3-diaminobizidíne tetrahydrochloride-dal festettük hidrogén peroxide jelenlétében. Az eljárást szobahőn végeztük

#### Értékelés:

A festett metszeteket fénymikroszkóppal értékeltük. A pozitívan festődő sejtek százalékát adtuk meg. A vizsgált betegek alacsony száma miatt statisztikai szignifikanciaszámítást nem végeztünk.

#### Eredmény

##### Peribulbáris infiltráció

CD54 expressziót a sejtek 25-50 %-ában figyeitünk meg alopecia areata esetében (1. Tábla, 1. ábra), míg normál hajás fejbőr esetében ez az érték csupán 10 %-ra volt tehető, 1-25 % közötti értékhatárban.

CD62E (2. táblázat) és CD62L (3. táblázat) esetében 25-50 %-ban figyeitünk meg pozitív sejteket alopecia areata esetében (2. ábra). Normál hajás fejbőr mindkét antitest esetében negatív volt.

Alopecia areata esetében CD106 (4. táblázat) expressziót mutató pozitív sejteket, reaktív lymphocytákat 50-75 %-ban észleitünk (3. ábra), míg a normál hajás fejbőr ugyanezen sejteit negatívak voltak.

##### Peribulbáris kapilláris endotheisejtek

Alopecia areataban jelentősen emelkedett CD54 pozitívítást észleltünk a peribulbáris kapilláris endotheisejteken, 50-75 %-ban, míg a normál hajas fejbőrön ezen sejtek pozitívítása csupán 1-25 % volt.

CD62E antitesttel szintén erős pozitívítást észleltünk, 50-75 %-án az endotheisejteknek expresszáldott, szemben a normál hajs fejbőr ezen sejteivel, amik negatívnak bizonyultak.

A perifollikuláris kapilláris endotheisejtek szintén magas, 75-100 %-ban mutattak CD106 pozitívítást alopecia areataban, míg normál hajas fejbőrön csupán 1-25 %-ban.

#### Keratinocyták

CD54 expresszió mind a bulbáris, mind az epidermális keratinocytákon a sejtek 1-25 %-ában mutatott pozitívítást alopecia areata esetében (1. Tábla). A normál hajs fejbőr mind a bulbáris, mind az epidermális sejtek esetében negatív volt.

Az CD62E expresszió (2. táblázat) a bulbáris keratinocytákon átlagosan a sejtek 50-75 %-ában volt észlelhető alopecia areataban, míg az epidermális keratinocyták negatívnak bizonyultak. A papilla sejteinél ez az arány 75-100 % volt (2. ábra). Normál hajas fejbőr esetében mind a bulbáris és mind az epidermális keratinocyták voltak.

A CD62L (3. táblázat) expressziója a bulbáris keratinocytákon, alopecia areata esetében a sejtek 25-50 %-ában volt kimutatható, míg a epidermális keratinocytákon 1-2 %-ban. A normál hajas fejbőr vizsgálatok a bulbáris keratinocyták, csakúgy mint a dermisben lévő keratinocyták esetében nem kaptunk pozitív eredményt (7. ábra).

CD106 (4. táblázat, 4. ábra) expressziót sem a bulbáris sem az epidermális keratinocytákon nem észleltünk.

#### Diszkusszió

Az alopecia a lymphocytá mediaalta betegségcsoportba tartozik, autoimmun eredete ma már egyre kevésbé vitatott (21). A haj vesztését egy jelentős gyulladásoos folyamat eredményezi, melyben a lymphocytákon, elsősorban a T lymphocytákon kívül, fontos

szerep jut a bulbáris keratinocytáknak is (2,3). Az azonban még vitatott, hogy a peribulbáris infiltráció ill. a benne résztvevő sejtek káros működése lenne-e az elsődleges a hajhullásban, avagy ez már szekunder, a bulbusok bizonyos sejteit általi triggerelt folyamatnak tekinthető (14,16). Vizsgálatok sora bizonyította, hogy antigén-ingerre a keratinocytákon, lymphocytákon, Langerhans sejteken ill. vascularis endothel sejteken különböző antigének expresszáálódnak, melyek a gyulladásos folyamatok fontos mediátorai (5,16). A különféle antigén expressziók különböző lymphokineket szabadítanak fel, mely további antigén expressziókat és az inflammatórió továbbvitelét eredményezi (1,4,9,10,17,19,20,28,29,34). Leglényegesebb szerepük talán, hogy aktivációjuk révén valósul meg a kapillárisokon át a szövetek sejtis inváziója és így bevonása a gyulladásos folyamatba (18).

Mi az az antigén, ami elsődleges antigénként tekinthető és ami beindítja a cytotoxicus folyamatot a folliculusok ellen még pontosan nem ismert (19). Néhány szerző kimutatott bulbáris antigéneket, melyekhez specifikus antitestek kötődtek alopecia areatában és ezeknek tulajdonítható a szőrtüszők elleni destruáló folyamat (6,14). Más szerzők viszont ugyanilyen antigén-antitest reakciót észleltek normál hajjas fejbőr bizonyos folliculusainál, ők viszont a természetes immunvédekezés részeként értékelik a tapasztaltakat (32).

Egyik kérdésünk az volt, hogy a bulbáris keratinocyták antigén-expressziója primer vagy szekunder jelenség, ami ma még mindig vitatott (2,7,25) ill. hogy milyen sejtek jelölődnek az alkalmazott antitestekkel, amik bizonyítják részvételüket az alopecia patogenezisében. A hajvesztés folyamatában továbbá lényeges szerep jut az időfaktornak is. A legkorábbi megjelenést a CD62E esetében észlelték, mely azonban gyorsan le is cseng. A CD62E továbbá indukálja a CD62L megjelenését, mely így későbbi stádiumban mutatható ki. Szintén rövid ideig, de a CD62E-hez képest valamivel később expresszáódik a CD106 és a legrövidebb ideig kimutatható ez az adhéziós molekula. Az CD54 megjelenése szintén korai stádiumban figyelhető meg de hosszabb ideig mutatható ki a CD106-hoz képest. Az észlelt perifolliculáris endothelsejtek CD54 és CD106 expressziója arra utalhat, hogy a gyulladásos folyamatban a kapillárisoknak

jelentős szerep jut és ezek az alopecia már korai stádiumában kimutathatók (31,33). A jelentős CD4 és CD106 pozitívítás a perifolliculáris infiltrátum lymphocytáin bizonyítékul szolgálhat cytotoxikus T sejtek jelenlétére, amik az alopecia kialakulásában igencsak fontosak (8, 30). A bulbáris keratinocyták és a peribulbáris infiltráció sejteit CD62L és CD106 pozitívítása arra enged következtetni, hogy a peribulbáris lymphocyták interakcióba lépnek a bulbáris keratinocytákkal (23,24,25,26,28). CD106 normál, inflammatorikus folyamatokban az aktiválódott endothelsejteken expresszálódik. Mi kimutattuk a perifolliculáris lymphocytákon és a papilláris sejteken is, amit úgy értékelünk mint a bulbáris régió extrém mértékű lymphocytás inváziójának jelét, ahogy azt eddig tumoroknál figyelték a CD54 antigén expressziójához hasonlóan (13).

A bulbáris-keratinocyták és papilláris endothelsejtek fent részletezett erőteljes antigén-expressziói révén elsősorban az a következtetés vonható le, hogy ezen sejtek valamely ingerre történő antigéntermészetének megváltozása indíthatja be az alopeciát eredményező immunológiai folyamatok, tehát a bulbus triggereli az így szekunderen létejt peribulbáris infiltrációt.

További, részletesebb vizsgálatokat tervezünk a lymphokinek szerepére vonatkozóan az alopecia kiváltásában bulbáris keratinocytá-tenyészeteken.

## 1. Táblázat

CD54 (ICAM-1) expresszió vizsgálata alopecia areatában

	alopecia areata	normál fejbőr
peribulbáris infiltráció	25 - 50 %	1 - 25 %
bulbáris keratinocyta	1 - 25 %	NEGATIV
epidermális keratinocyta	1 - 25 %	NEGATIV
peribulbáris kapilláris endothel	50 - 75 %	1 - 25 %

## 2. Táblázat

CD62E (ELAM-1) expresszió vizsgálata alopecia areatában

	alopecia areata	normál fejbőr
peribulbáris infiltráció	25 - 50 %	NEGATIV
bulbáris keratinocyta	50 - 75%	NEGATIV
epidermális keratinocyta	NEGATIV	NEGATIV
papilláris sejtek	75 - 100 %	NEGATIV
peribulbáris kapilláris endothel	50 - 75 %	NEGATIV

## 3. Táblázat

CD62L (LECAM-1) expresszió vizsgálata alopecia areatában

	alopecia areata	normál fejbőr
peribulbáris infiltráció	25 - 50 %	NEGATIV
bulbáris keratinocyta	1 - 25 %	NEGATIV
epidermális keratinocyta	1 - 2 %	NEGATIV

## 4. Táblázat

CD106 (VCAM-1) expresszió vizsgálata alopecia areatában

	alopecia areata	normál fejbőr
peribulbáris infiltráció	50 - 75 %	NEGATIV
papilláris endothelsejt	50 - 75 %	NEGATIV
epidermális keratinocyta	NEGATIV	NEGATIV
peribulbáris kapilláris endothelsejt	75 - 100 %	1 - 25 %

## Irodalom

1. Albelda S.M., Buck C.A.: The FASEB Journal. 4:2868 (1990)
2. Barker J.N.W.N., Sarma V., Mitra R.S. és mtsai.: J. Clin. Invest. 85:605 (1990)
3. Boehncke W.H., Kellner I., Konter U. és mtsai.: J. Am. Acad. Dermatol. 26:907 (1992)
4. Brod S.A., Purvee M., Benjamin D. és mtsai.: Eur. J. Immunol. 20:2259 (1990)
5. Brooks G., Idson B.: J. Soc. Cosmet. Chem. 41:249 (1989)
6. Calver N.S., Macdonald-Hull S., Parkin S.M. és mtsai.: European Hair Research Society III. Annual Meeting Okt. 2-3. 1992., Berlin
7. Caughman S.W., Lian-Jie L., Degitz K., Cells J. Invest. Dermatol. 94:22S (1990)
8. D'Ovidio R., Vena G.A., Angelini G.: Arch. Dermatol. Res. 271:265 (1981)
9. Gilhar A., Etzioni A., Assy B. és mtsai.: Clin. Immunol. Immunopath. 66:120 (1993)
10. Hamm H., Klemmer S., Kreuzer I. és mtsai.: Arch. Dermatol. Res. 280:179 (1988)
11. Huff J.C.: J. Invest. Dermatol. 94:74S (1990)
12. Hsu S.M., Raine L., Fanger H.: J. Histochem. Cytochem. 29:577 (1981)
13. Johnson J.P., Stade B.G., Holzmann B. és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:641 (1989)
14. Kalish R.S., Johnson K.L., Hordinsky M.K.: Arch. Dermatol. 128:1072 (1992)
15. Kaufmann R., Weber L., Klein C.E.: Hautarzt. 41:256 (1990)
16. Khoury E.L., Price V.H., Greenspan J.S.: J. Invest. Dermatol. 90:193 (1988)
17. Klein C.E.: Hautarzt. 45:263 (1994)
18. Lobb R.R., Chi-Rosso G., Leone D.R. és mtsai.: J. Immunol. 147:124 (1991)
19. Lotti T., Knoepfel B.: Int. J. Dermatol. 31:103 (1992)
20. Luger T.A., Schwarz T.: Epidermal Growth factors and cytokines ed. Markel Dekker, Inc. 1994.
21. Lutz G., Bauer R.: Hautarzt. 39:5 (1988)
22. Matsue H., Cruz P.D., Bergstresser P.R. és mtsai.: J. Invest. Dermatol. 99:42S (1992)
23. Norton J., Sloane J.P., Delia D. és mtsai.: J. of Pathology. 170:173 (1993)
24. Orecchia G., Capelli E., Martinetti M. és mtsai.: Arch. Dermatol. Res. 280:47S (1988)
25. Picker L.J., Kishimoto T.K., Smith C.W. és mtsai.: Nature 349/6312:796 (1991)
26. Pober J.S., Cotral R.S.: Laboratory Investigation 64:301 (1991)

27. Shimizu Y., Shaw S., Graber N. és mtsai: *Nature*. 349:799 (1991)
28. Singer K.H., Le P.T., Denning S.M. és mtsai: *J Invest. Dermatol.* 94:85S (1990)
29. Springer T.A.: *Nature* 346:425 (1990)
30. Telegdy E., Magyarlaki M., Schneider I.: *Bőrgy. és Vener. Szle.* 68:59 (1992)
31. Teunissen M.B.M.: *J. Invest. Dermatol.* 99:77 (1992)
32. Tobin D.J., Bystrin J.C.: *Dermatology* 2000, Bécs, 18.-21. Május, 1993.
33. Van Seventer G.A., Shimizu Y., Horgan K.J. és mtsai: *J. of Immunology.* 144:4579 (1990)
34. Wniski A.P., Foster C.A.: *J. Invest. Dermatol.* 99:48 (1992)



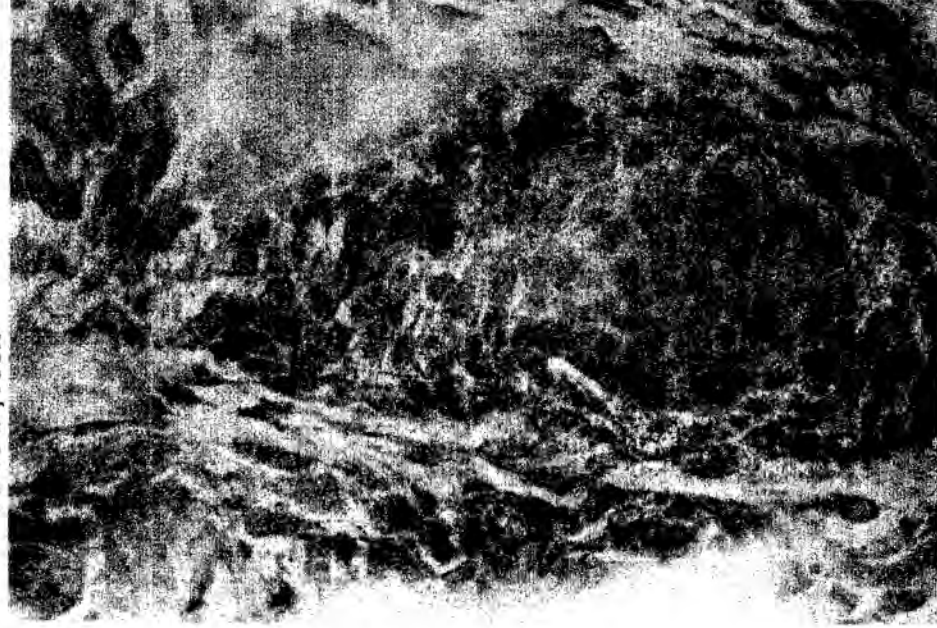
1. Ábr. CD54 (ICAM-1) expresszió  
alopecia areatában  
APAAP, 40x



2. Ábr. CD63E (ELAM-1) expresszió  
alopecia areatában  
APAAP, 40x



4. Ábr. CD106 (VCAM-1) expresszió  
bulbáris keratinocytákon  
alopecia areatában  
APAAP, 100x



3. Ábr. CD106 ( VCAM-1) expresszió  
alopecia areatában  
ABC, 40x



6.

**Telegdy E.,\* Schneider I.\*, Lutz G.,\*\* Kreysel H.W.\*\***

\* Univ. Med. School, Dept. Dermatol. Pécs, Hungary

\*\* Univ. Med. School., Dept. Dermatol., Bonn, Germany

**Examination of CD54 (ICAM-1) and interferon-gamma  
expression in alopecia areata**

megjelenés alatt

Examination of CD54 (ICAM-1) and interferon-gamma expression in alopecia areata  
Telegdy E., \* Schneider I.,

Lutz G., \*\* Kreysel H.W. \*\*

\* Univ. Med. School, Dept. Dermatol., Pécs, Hungary

\*\* Univ. Med. School, Dept. Dermatol., Bonn, Germany

Telegdy Enikő  
Univ. Med. School, Pécs,  
Dept. Dermatol.

Pécs

Kodály Z.u.20.

Hungary - 7624

Tel. 36-72/315 177

Fax. 36-72/315 040

#### ABSTRACT

The expression of intercellular adhesion molecule-1 and the presence of interferon-gamma on epidermal and bulbar keratinocytes and peribulbar lymphocytes in 20 scalp skin specimens of patients with alopecia areata were examined. This was carried out using monoclonal antibodies and alkaline phosphatase anti alkaline phosphatase technique. As controls normal scalp skin was used. An increased peribulbar lymphocyte expression of interferon-gamma was found in alopecia areata compared to normal scalp skin. This observation could help in the studies of the correlation between keratinocytes and lymphocytes in such lymphocyte mediated diseases as alopecia areata.

#### Key words

alopecia areata - keratinocytes - CD54 expression - interferon-gamma

## Introduction

It is known that alopecia areata (AA) is associated with a significant perifollicular infiltrate of lymphocytes in the skin (4). So it belongs to the group of lymphocyte mediated diseases (8). In our previous study we examined the nature and interactions of perifollicular lymphocytes taking part in the pathogenesis of alopecia areata (21). We showed also that the CD4:CD8 ratio of T-lymphocytes is four times greater than the normal value and at the same time the number of MHC-II and CD3 positive cells are significantly increased. During intercellular interactions the expression of the lymphocyte functional antigen (CD 18, LFA-1) as a ligand makes able the intercellular adhesion molecule-1 (CD 54, ICAM-1) -antigen binding on keratinocytes and brings on the mediation of further antigen expression on epithelial cells, T and B lymphocytes (19) and keratinocytes (10, 11, 12). It has been proved in keratinocyte cell cultures that interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) given to the system will result in CD54 expression (16), but how this mechanism works and to what extent is not known.

In our present study we wanted to examine that immunological interactions, interactions between lymphocytes and keratinocytes and wanted to know what cells in alopecia areata scalp express these antigens.

## Patients and methods

### Patients

We examined 20 patients with alopecia areata. They were 15 female and 5 male patients ranging in age from 13 to 61 years. The possibility of autoimmune processes was precluded (we could not identify autoantibodies - as anti smooth muscle, anti parietal, anti-thyroidal, anti-thyreoglobulin antibodies, in the serum). The alopecia foci had been on the scalp for no longer than 3 months. The patients received neither systemic nor local treatment before the examinations. The results were compared to the biopsied material obtained from the scalp. We examined an average of 30 hair follicles

per patient for antibody in cases of alopecia areata. An average of 60 hair follicles were examined from each of 5 control patients with clinically normal scalp.

#### Biopsy

Six mm punch biopsies were removed from the active edge of the most recent alopecia areata scalp lesions. This histological material was frozen in liquid nitrogen and 5  $\mu$ m sections prepared by cryotomy. The sections were fixed in acetone at -25 °C after being dried for 10 minutes at room temperature.

#### Monoclonal antibodies

CD 54 (ICAM-1) (clone 84H 10 Immunotech GmbH, Hamburg Germany) diluted 1:40 in Tris buffer (anti-ICAM-1 receptor anti-mouse immunoglobulin).  
IFN-gamma (clone DC-10 Becton-Dickinson GmbH) diluted 1:5 Tris buffer, (anti-IFN-gamma anti-human lyophilised immunoglobulin).  
Rabbit anti-mouse immunoglobulin DAKO-PATTS, Copenhagen, Denmark ) diluted 1:150 in Tris buffer with albumine medium.  
APAAP ( monoclonal mouse alkaline phosphatase (clon AP7 (6,7) DAKO-PATTS, Copenhagen, Denmark) diluted 1:100 in Tris buffer

#### (APAAP) Alcaline Phosphatase Anti Alcaline Phosphatase technique

The sections were washed with Tris buffer for 2 minutes and then incubated with ICAM-1 primary antibody for 30 minutes or with IFN-gamma for 60 minutes at room temperature in a humidity chamber. After which they were rinsed throughly in Tris buffer before incubating with the secondary antibody for 30 minutes and then incubated with APAAP complex for 25 minutes. To stain we used Naphtol AS-Mx phosphatase and Fast-Red-Substrate solution (Sigma).

Evaluation:

The stained slides were assessed by light microscope. The percentage of positive staining cells were evaluated. Cause of the low patients-number we didnot count any statistical significance.

## Results

### Peribulbar infiltrates

The CD54 expression was observed in about 25-50 % of cells in with cases of alopecia areata (Table 1., Fig.1 ) However in normal scalp the value was lower . A positiv immunostaining of the IFN- $\gamma$  (Table 2.) was observed on 1-2% of cells both in alopecia areata and in normal scalp but was stronger on the perivascular infiltrating cells ( Fig 2.)

### Peribulbar capillar endothel cells

A strong CD54 positivity in 50-75% was observed on these cells, while the reaction with IFN- $\gamma$  receptor antibody was negativ

### Keratinocytes

A weak CD54 expression on both bulbar and epidermal keratinocytes occurred with a frequency of about 10% of cells ( with the range of 1-25%) in cases of alopecia areata (Table 1.). In normal scalp both bulbar and epidermal cells were negative (Table 1.). The presence of IFN- $\gamma$  (Table 2 ) was detected in 1-2% of bulbar keratinocytes in alopecia areata (Fig.3.). The epidermal keratinocytes were negative. Examining the bulbar and epidermal keratinocytes of the normal dermis we didnot get any positive findings.

### Conclusion

The autoimmune origin of alopecia has become less and less controversial recently (15). Though it is still disputed as to whether or not peribulbar infiltration is of primary importance in the loss of hair if it is a secondary process (11,13). It has been proved by several examinations and experiments, that antigen stimuli cause expression of different antigens on keratinocytes, lymphocytes and Langerhans cells, all of which are mediators of inflammatory processes (13,6). Antigen expression releases interleukins and lymphokines through the activation of lymphocytes, which take part in the regulation of the antigen expression in inflammatory mechanisms (1,9,14,19,20). The characteristics of primary antigen stimulus have not yet been elucidated, but there are increasing number of authors presuming that the immune processes are eliminating antigens recognised as foreign, so they giving rise to autoimmune processes (11). Some authors presume that the antigen characteristics of the bulbar cells alter, due to different antigen expression, e.g. CD54 expression. Other authors believe that the disturbed function of lymphocytes produces recognition of these bulbar antigens as foreign (11). Earlier observation and reports give an account of different cytokines (IFN- $\gamma$ , tumour necrosis factor-alpha, interleukine-1) regulating CD54 expression (2,7). Through this cytokine cascade on the surface of lymphocytes activates the lymphocyte functional antigen (LFA-1) as the ligand of CD54 and with that linking these cells also become involved in the inflammatory mechanism which induces further release of cytokines and further inflammatory mechanisms (8,12,16,3,22,17). The presence of interferon-gamma on the bulbar keratinocytes was considerable, we think that IFN- $\gamma$  brings on CD54 expression on the bulbar endothelial cells making them target cells of the cytotoxic reaction. So the peribulbar infiltrating can be considered secunder. In our previous work we detected an intensive CD4 positivity on the reactive lymphocytes of the peribulbar infiltration (21). Now we observed the same with the CD54 antigen. That fact we consider as an evidence of the presence of cytotoxic T cells (18) which play an intensive role in the process of hairloss. We observed also on the peribulbar capillar endothelial cells an intensive expression of CD54 what means that the capillaries play also an essential role in the pathomechanism of alopecia (the lymphocytes migrate from there).



For some time being these findings have been sufficient for us to comment on the question of the role of the hair bulb in the mechanism as to whether it is primary or secondary. Nevertheless, it is presumable that the correlation between lymphocytes and keratinocytes is extremely complex. Further examination are needed to support our presumptions, using bulbar cell culture.

Table 1.

CD54 expression on different cells in cases of alopecia areata (%)

	alopecia areata (%)	normal scalp (%)
peribulbar infiltration	25 - 50 %	1 - 25 %
bulbar keratinocytes	1 - 25 %	neg
epidermal keratinocytes	1 - 25 %	neg

Table 2.

Interferon-gamma receptor expression on different cells in cases of alopecia areata (%)

	alopecia areata (%)	normal scalp (%)
peribulbar infiltration	1 - 2 %	1 - 2 %
bulbar keratinocytes	1 - 2 %	neg
epidermal keratinocytes	neg	neg

## References

1. Albeida SM, Buck CA: Integrins and other Cell Adhesion Molecules. *The FASEB Journal* 4:2868-2880, 1990
2. Barker JNWN, Sarma V, Mitra RS, Dixit VM, Nickoloff BJ: Marked Synergism between Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Interferon- $\gamma$  in Regulation of Keratinocyte-derived Adhesion Molecules and Chemotactic Factor. *J Clin Invest* 85:605-608, 1990
3. Boehncke WH, Kellner J, Konter U, Stern W: Differential Expression of Adhesion Molecules on Infiltrating Cells in Inflammatory Dermatoses. *J Am Acad Dermatol* 26:907-913, 1992
4. Braun-Falco O., Plewig G., Wolff H.H., Winkelmann R.K.: *Dermatology Ed.* Springer-Verlag 1991.
5. Brooks G, Idson B: Immunology-Concepts and Skin Relationship. *J Soc Cosmet Chem* 41:249-257, 1989
6. Caughman SW, Lian-Jie L, Degitz K: Characterization and Functional Analysis of Interferon- $\gamma$ -induced Intercellular Adhesion Molecule-1 Expression in Human Keratinocytes and A.431 Cells. *J Invest Dermatol* 94:22S-26S, 1990
7. Gilhar A, Elzioni A, Assy B, Eidelman S: Response of Grafts from Patients with Alopecia areata Transplanted onto Nude Mice, with Administration of Interferon- $\gamma$ . *Clin Immunol Immunopath* 66:120-126, 1993
8. Hamm H, Klemmer S, Kreuzer J, Steijnen PM, Happle R, Bröcker EB: HLA-DR and HLA-DQ Expression of anagen and telogen Hair Bulbs in Long-standing Alopecia areata. *Arch Dermatol Res* 280:179-181, 1988
9. Huff JC: Epithelial Polymeric Immunglobulin Receptor. *J Invest Dermatol* 94:74S-78S, 1990
10. Kalish RS, Johnson KL, Hordinsky MK: Alopecia areata. *Arch Dermatol* 128:1072-1077, 1992
11. Kaufmann R, Weber L, Klein CE.: Integrine-neue Rezeptormoleküle: ihre Bedeutung für die Differenzierung, Regeneration und Immunantwort der Haut. *Hautarzt* 41:256-261, 1990.
12. Khoury EL, Price VH, Greenspan JS: HLA-DR Expression by Hair Follicle Keratinocytes in Alopecia Areata: Evidence That it is Secondary to the Lymphoid Infiltration. *J Invest Dermatol* 90:193-200, 1988
13. Lotti T, Knoepfel B: Expression of T6 Antigen on Keratinocytes in Alopecia areata. *Int J Dermatol* 31:103-109, 1992
14. Lutz G, Bauer R: Die Autoimmunität der Alopecia areata. *Hautarzt* 39:5-11, 1988
15. Matsue H, Cruz PD, Bergstresser PR, Takashima A: Cytokine Expression by Epidermal Cell Subpopulation. *J Invest Dermatol* 99:42S-45S, 1992
16. Orecchia G, Capelli E, Martinetti M, Belvedere MC, Rabbiosi G: Decreased in vitro Lymphocyte Stimulation and Reduced Sensitivity to IL-2 in Patients with Alopecia areata. *Arch Dermatol Res* 280S:47S-50S, 1988
17. D'Ovidio R., Vena GA, Angelini G.: Cell-mediated Immunity in Alopecia Areata. *Arch Dermatol Res* Vol. 271, 1981: 265-273.

19. Singer KH, Le PT, Denning SM, Whichard LP, Haynes BF: The role of Adhesion Molecules in Epithelial-T-Cell Interactions in Thymus and Skin. *J Invest Dermatol* 94:85S-88S, 1990
- Nature 346:425-434, 1990
20. Springer TA: Adhesion Receptors of the Immune System.
21. Telegdy E, Magyarlaci M, Schneider I: Alopecia areataban és alopecia totalisban szenvedő betegek immunperoxidase vizsgálattal követett diphencyprone külső és Isoprinosine belső kezelése. *Bőrgy és Vener Szle* 68:59-64, 1992
22. Teunissen MBM: Functional Role of Adhesion Molecules LFA-3 and ICAM- 1 on Cultured Human Epidermal Langerhans Cells in Antigen-Specific T-cell Activation. *J Invest Dermatol* 99:77S-79S, 1992

Fig. 1. CD54 (ICAM-1) expression  
in alopecia areata  
APAAP , 10x



Fig. 3. Interferon- $\gamma$  expression  
on bulbar keratinocytes  
in alopecia areata APAAP, 40x

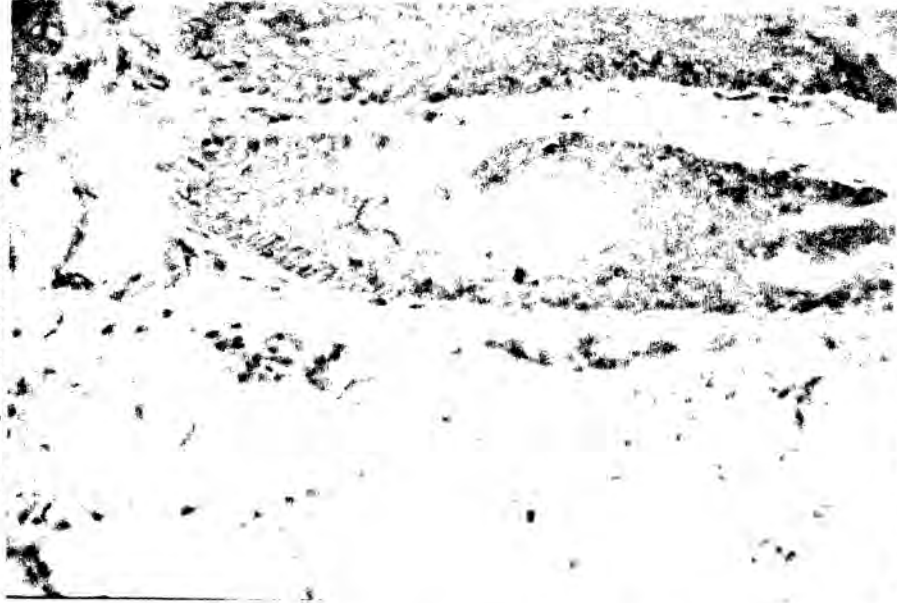


Fig. 2. Interferon-gamma expression  
in alopecia areata APAAP , 40x

7.

**Telegdy E.,\* Lutz G.,\*\* Kreysel H.W.,\*\* Schneider I.**

\* Pécsi Bőrgyógyászati Klinika

\*\* Bonni Bőrgyógyászati Klinika, Németország

**CD54 és gamma-interferon expresszió immunhisztológiai  
vizsgálata alopecia areataban**

megjelenés alatt

Pécsi Orvostudományi Egyetem, Bőrgyógyászati Klinika (ig. Prof. Dr. Farkas Beatrix)  
Bonni Orvostudományi Egyetem, Bőrgyógyászati Klinika (ig. Prof. Dr. H.W. Kreysel)  
közleménye

CD54 és gamma-interferon expresszió immunhisztológiai vizsgálata alopecia areataban

Telegdy E.,\* Lutz G.,\*\* Kreysel H.W.,\*\* Schneider I.\*

\* Pécsi Bőrgyógyászati Klinika

\*\* Bonni Bőrgyógyászati Klinika

### Összefoglalás

Az alopecia areata autoimmun eredetére vonatkozó vizsgálatok újabb és újabb kérdéseket vetnek fel. A perifolliculáris infiltráció jelenléte azt feltételezi, hogy a patomechanizmusban elsősorban a lymphocyták játszanak szerepet. Korábbi munkánkban kimutattuk, hogy az infiltrációban a lymphocyták CD4-CD8 rációja csaknem négyszerese a normálisnak (9). Ugyanakkor jelentős az MHCII ill. CD3 pozitív sejtek száma. A szerzők jelen közleményükben 20 alopecia areata diagnózisú betegnél, monoklonális antitestekkel, APAAP technikával vizsgálták az epidermális ill. folliculáris keratinocyták CD54 expresszióját ill. gamma-interferon jelenlétét, összehasonlítva a normál hajas fejbőr ezen sejtszámjával.

### Kulcsszavak

alopecia areata - keratinocyták - CD54 expresszió - gamma-interferon

### Summary

The expression of intercellular adhesion molecule-1 and the presence of interferon-gamma on epidermal and bulbar keratinocytes and peribulbar lymphocytes in 20 scalp skin specimens of patients with alopecia areata were examined. This was carried out using monoclonal antibodies and alkaline phosphatase anti alkaline phosphatase technique. As controls normal scalp skin was used. An increased peribulbar lymphocyte expression of interferon-gamma was found in alopecia areata compared to normal scalp skin. This observation could help in the studies of the correlation between keratinocytes and lymphocytes in such lymphocyte mediated diseases as alopecia areata.

### Key words

alopecia areata - keratinocytes - ICAM-1 expression - interferon-gamma

### Bevezetés

Ismert, hogy alopecia areatában jelentős a perifolliculáris, elsősorban lymphocytákból álló lobosodás. Ez alapján sorolható az alopecia areata a lymphocytamedált betegségcsoportba /8/. Korábbi munkánkban a patomechanizmusban szerepet játszó, perifolliculáris lymphocyták természetét ill. kölcsönhatását vizsgáltuk /22/ jelen munkánkban a lymphocyták és keratinocyták közötti immunológiai kölcsönhatásokat tanulmányoztuk. A sejt közötti interakciók során a lymphocyt funkcionális antigén ( CD 18, LFA-1) ill. egyéb, így CD54 (ICAM-1) antigének keratinocytákon történő expressziója váltja ki a további limfokinek mediációját ill. további antigén expressziókat epithelialis sejteken, T és B lymphocytákon ill. keratinocytákon /1,9,13,18,20,22/



Keratinocyta sejt kultúrákon igazolt, hogy a rendszerhez adott gamma-interferon többek között CD54 expressziót eredményez /2,6/. Vizsgálataink során arra kerestünk választ, hogy ezen mechanizmusok hol és milyen mértékben játszódnak le.

#### Beteganyag és módszer

##### Betegek:

20 alopecia areata diagnózisú betegeknél végeztük el vizsgálatainkat 15 nő és 5 férfi betegnél. A betegek életkora 13-61 év között volt. A betegeknél autoimmun folyamatokat kizártunk ( autoantitestek jelenlétét a szérumban nem tudtuk igazolni ) A fejbőrön az alopeciás göcök jelentkezése 3 hónapnál nem volt régebbi. A vizsgálatok előtt a betegeket sem szisztémás, sem helyi kezelésben nem részesítettük. A kapott eredményeket normál hajas fejbőről nyert biopsziás anyaggal hasonlítottuk össze. Betegenként és antitestenként átlagosan alopecia areatában 30 szörtüszőt vizsgáltunk, míg normál hajas fejbőrénél az 5 kontroll betegnél átlagosan 60 szörtüsző került vizsgálatra.

##### Biopszia:

6 mm- es punch biopsziás anyagot használtunk fel. A mintát a hajas fejbőről, a legfrissebb alopeciás göc széli részéből nyertük. A szövettani anyagot folyékony nitrogénben fagyasztottuk le, majd kriosztáttal, - 25 °C fokon 5 µm vastag metszeteket készítettünk. A metszeteket 10 percig szobahőmérsékleten szárítottuk és utána - 25 °°C fokos acetonban fixáltuk, majd újabb 30 percig szárítottuk szobahőmérsékleten.

##### Monoklonális antitestek

CD 54 (ICAM-1), (clon 84H10), (Immunotech- Dianova GmbH, Hamburg, Németország) 1:40 koncentrációban, Tris pufferben oldva ( anti-ICAM-1 receptor ellenes egér immunoglobulin).

Gamma-interferon (clon DC-10/, (Becton-Dickinson GmbH, ) 1:5 koncentrációban Tris pufferben oldva; (anti human gamma interferon ellenes lyophilizált immunglobulin)

Rabbit anti mouse immunglobulin, (DAKO-PATTS, Kopenhága, Dánia), 1:150 hígításban Tris pufferben, albuminos közegben.

APAAP (monoclonalis egér alkalikus foszfatáz, clon AP7/6/7), (DAKO-PATTS, Kopenhága, Dánia), 1:100 hígításban Tris pufferben

#### APAAP immunreakció

A metszeteket 2 perces Tris pufferrel való mosást követően CD54 receptor primer antitesttel 30 percig, gamma interferon primer antitesttel 60 percig inkubáltak szobahőmérsékleten, nedves kamrában Tris pufferes mosást követően 30 percig a szekunder antitesttel inkubáltak majd, 25 percig APAAP komplexszel. A reakciót Naphtol AS-Mx phosphatase és Fast-Red-Substrat oldattal (Sigma) festettük.

#### Értékelés:

A metszeteket fénymikroszkóppal értékeltük. A pozitív sejtek százalékos arányát adtuk meg. Az alacsony betegség szám miatt statisztikai szignifikanciaszámítást nem alkalmaztunk.

#### Eredmények

##### Peribulbaris infiltráció

Alopecia areata esetében CD54 expressziót 25-50 %-ában észleltük a sejteknek. (Ábr. 1. Tábl. 1.), míg normál hajás fejbőr esetén ez az arány lényegesen alacsonyabb volt.

Gamma-interferon expresszió vizsgálata (Tábl.2.) alopecia areata esetében csakúgy mint a normál hajás fejbőr esetében 1-2% volt, míg a perivascularis infiltráció erősebben jelölődött (Ábr. 2.).

##### Peribulbaris kapillaris endotheiselet

Ezen sejtek intenzív CD54 pozitivitást / 50-75 %-ban / mutattak, míg gamma-interferon receptor ellenes antitest nem adott reakciót.

### Keratinocyták

A bulbaris keratinocytákon mind az epidermális keratinocytákon gyenge CD54 pozitivitást mutattunk ki alopecia areata esetében (Tábl.1.). Normál hajás fejbőr esetén mind a bulbus mind az epiderma ezen sejtsíjjei negatívak voltak.

A gamma-interferon jelenléte (Tábl.2.) a bulbaris keratinocytákon 1-2 %-ban volt kimutatható (Ábr.3.), míg az epidermális keratinocyták negatívak voltak. A normál hajás fejbőr bulbaris keratinocytái vizsgálatával nem kaptunk pozitív eredményt.

### Megbeszélés

Az alopecia autoimmun eredete ma már egyre kevésbé vitatott (16). Az azonban még heves vita tárgyát képezi, hogy a peribulbaris infiltráció az elsődleges a hajhullásban, avagy ez már szekunder, a bulbusok bizonyos sejtsíjjei által triggerelt folyamatnak tekinthető (12,14). Számos vizsgálat ill. kísérlet bizonyította, hogy antigén ingerre a keratinocytákon, lymphocytákon, Langerhans sejteken különböző antigének expresszáódnak, melyek a gyulladásos folyamatok fontos mediátorai (5,14). Az antigén expresszió interleukinokat, majd a lymphocyták aktiválódásán keresztül limfocitákat szabadít fel, mely további antigén expressziókat indukál (1,10,15,20,21,25). Az elsődleges antigéninger antigén természete egyelőre nem ismert pontosan, de egyre több feltételezés irányul arra, hogy az immunfolyamatok, melyek az idegenként felismert antigén eliminálására irányulnak, mint autológ antigénre, autoimmun folyamatot indítanak be (12). Irodalmi közlések beszámolnak arról, hogy különböző citokinek ( gamma-interferon, tumor nekrozis faktor-alfa, interleukin-1) regulálják az CD54 expresszióját (2,6). A lymphocyták aktiválódása során felszínükön expresszáódnak a

lymphocyta funkcionális antigén (LFA1) ami ligandja a CD54 molekulának, így az kötődni tud a lymphocytákhoz és be tudja őket vonni a gyulladásos kaszkádba, további citokineket felszabadulását indukálva (3,8,13,18,19,23,24,).

Mivel a bulbáris keratinocytákon kimutattunk gamma-interferon pozitivitást és mivel a gamma-interferon képes CD54 expressziót indukálni, amit a peribulbáris lymphocytákon mutattunk ki, arra a következtetésre jutottunk, hogy a gamma-interferon expressziója következtében indul be a bulbáris sejtek, mint target sejtek elleni cytotoxicus reakció (7,17) ami végül hajhullást eredményez. Így a peribulbáris infiltráció szekunder folyamatnak tekinthető

Korábbi munkánkban kimutattunk intenzív CD4 pozitivitást a peribulbáris infiltráció reaktív lymphocytáin (22). Jelen vizsgálatainkkal ugyanezt találtuk CD 54 esetében. Véleményünk szerint ez a két megfigyelés bizonyítékuul szolgál a cytotoxicus sejtek részvételének az alopecia patomechanizmusában (7,17). Ugyancsak intenzív pozitivitást észleltünk CD54 expressziót vizsgálva a peribulbáris kapillárisok endothelsejtejein, tehát szerepük szintén kimutatott az immunológiai kaszkádban, hiszen aktiválódásuk révén képesek gyulladásos sejtek / lymphocyták, leukocyták / bevándorolni az érintett szövetrészekbe (9).

A patomechanizmus pontosabb tisztázására a továbbiakban bulbáris keratinocytá-tenyészetek vizsgálatát tervezzük.

## 1. Táblázat

CD54 expresszió különböző sejteknél alopecia areataban (%)

	alopecia areata	normál fejbőr
peribulbáris infiltráció	25 - 50 %	1 - 25 %
bulbáris keratinocyta	1 - 25 %	negatív
epidermális keratinocyta	1 - 25 %	negatív
peribulbáris kapilláris endothelsejt	50 - 75 %	1 - 25 %

## 2. Táblázat

Gamma-interferon receptor expressziójának vizsgálata különböző sejteken alopecia areataban (%)

	alopecia areata	normál hajas fejbőr
peribulbáris infiltráció	1 - 2 %	1 - 2 %
bulbáris keratinocyták	1 - 2 %	negatív
epidermális keratinocyták	negatív	negatív

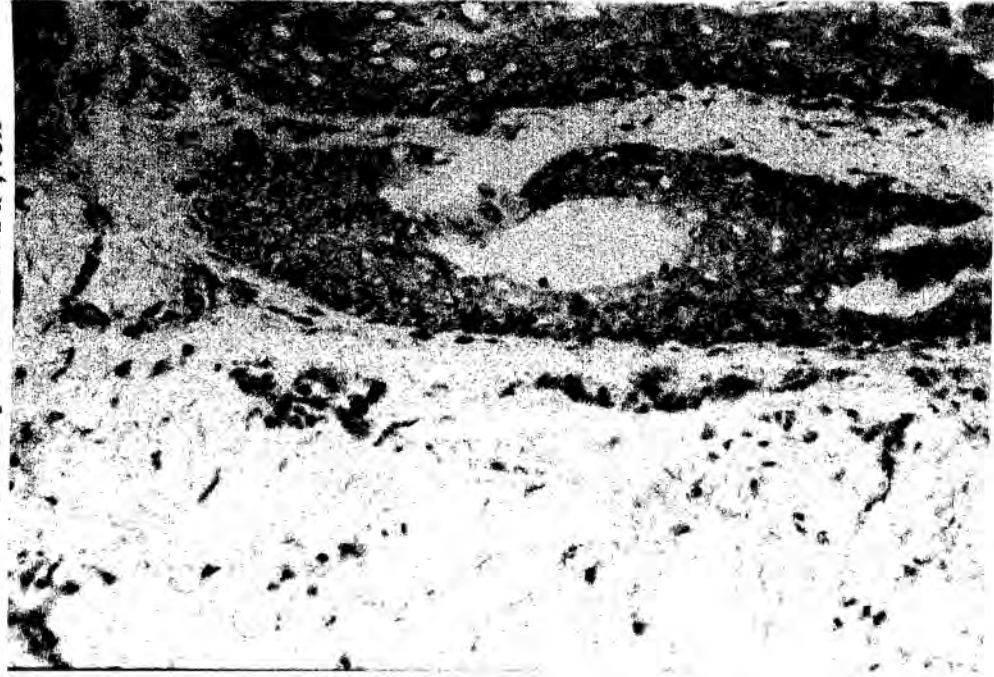
## Irodalom

1. Albelda S. M., Buck C. A.: The FASEB Journal. 4:2868 (1990)
2. Barker J.N.W.N., Samra V., Mitra R.S. és mtsai.: J. Clin. Invest. 85:605 (1990)
3. Boehncke W.H., Kellner I., Konter U. és mtsai.: J. Am. Acad. Dermatol. 26:907 (1992)
4. Brod S. A., Purvee M., Benjamin D. és mtsai.: Eur. J. Immunol. 20:2259 (1990)
5. Brooks G., Idson B.: J. Soc. Cosmet. Chem. 41:249 (1989)
6. Caugham S.W., Lian-Jie L., Degitz K. J. Invest. Dermatol. 94:22S (1990)
7. D'Ovidio R., Vena G.A., Angelini G. Arch. Dermatol. Res. 271:265 (1981)
8. Gilhar A., Etzioni A., Assyu B. és mtsai.: Clin. Immunol. Immunopath. 66:120 (1993)
9. Goldsmith L.A.: J. of Invest. Dermatol. 96:98S (1991)
10. Hamm H., Klemmer S., Kreuzer I. és mtsai.: Arch. Dermatol. Res. 280:179 (1988)
11. Huff J.C.: J. Invest. Dermatol. 94:74S (1990)
12. Kalish R.S., Johnson K.L., Hordinsky M.K.: Arch. Dermatol. 128:1072 (1992)
13. Kaufmann R., Weber L., Klein C.E.: Hautarzt. 41:256 (1990)
14. Khoury E.L., Price V.H., Greenspan J.S.: J. Invest. Dermatol. 90:193 (1988)
15. Lotti T., Knoepfel B.: Int. J. of Dermatol. 31:103 (1992)
16. Lutz G., Bauer R.: Hautarzt. 39:5 (1988)
17. Makgoba M.W., Sanders M.E., Ginther Luce G.E. és mtsai.: Eur. J. Immunol. 18:637 (1988)
18. Matsue H., Cruz P.D., Bergstresser P.R. és mtsai.: J. Invest. Dermatol. 99:42 (1992)
19. Orecchia G., Capelli E., Martinetti M. és mtsai.: Arch. Dermatol. Res. 280S:47S (1988)
20. Singer K.H., Le P.T., Denning S.M. és mtsai.: J. Invest. Dermatol. 94:85S (1990)
21. Springer T.A.: Nature. 346:425 (1990)
22. Telegdy E., Magyarilaki M., Schneider I., Börgy. és Vener. Szle. 11:59 (1992)
23. Teunissen M.B.M.: Invest. Dermatol. 99:77S (1992)
24. Van Severter G.A., Shimizu Y., Horgan K.J. és mtsai.: J. of Immunology. 144:4579 (1990)
25. Winiski A.P., Foster C.A.: J. Invest. Dermatol. 99:48 (1992)

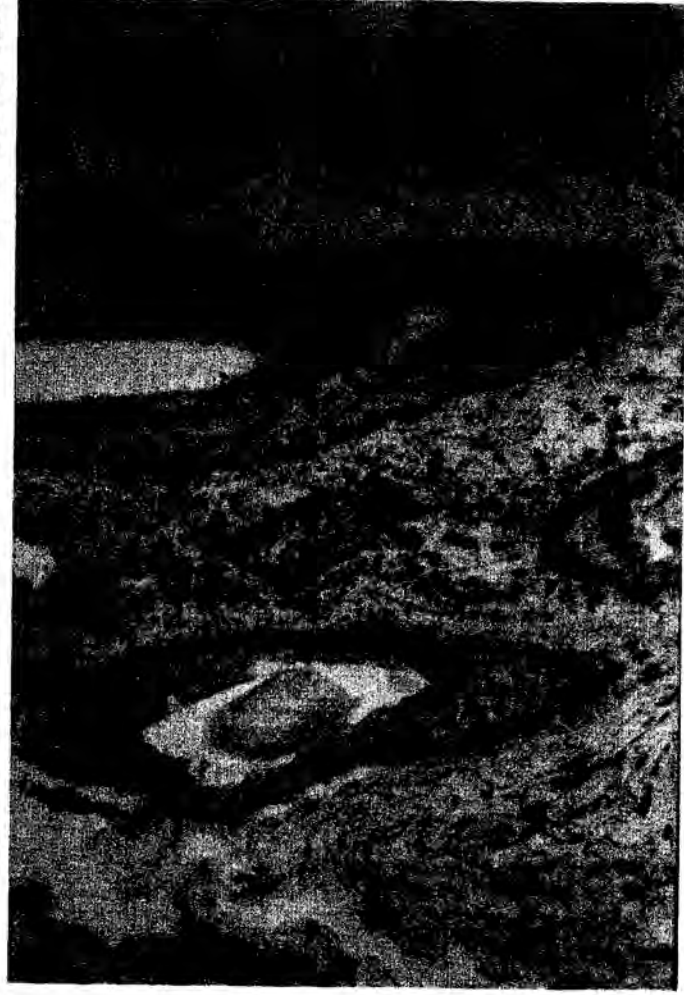
1. Ábr. CD54 expresszió  
alopecia areataban  
APAAP, 10x



3. Ábr.  $\gamma$ -interferon expresszió  
alopecia areataban, bulbáris  
keratinocytákon APAAP, 40x



2. Ábr. Gamma-interferon expresszió  
alopecia areataban APAAP, 40x



8.

**Telegdy E., \* Mojzes J., \* Schneider I., \*  
Sáfrány B., \*\* Kerekes E. \*\***

\* Dept. of Dermatology, University of Medical School Pécs

\*\* County Blood Transfusion Centre, Pécs

**HLA determination in patients with alopecia**

megjelenés alatt



## HLA determination in patients with alopecia

Enikő Telegdy MD \*, Jenő Mojzes MD \*, Imre Schneider MD \*,  
Beatrix Sáfrány MD \*\*, Endre Kerekes MD \*\*,  
\* Dept. Dermatology, University of Medical School Pécs  
\*\* County Blood Transfusion Centre, Pécs

### Correspondence:

Enikő Telegdy MD  
Department of Dermatology,  
University of Medical School Pécs  
Pécs  
Kodály Z. u. 20.  
7624 - Hungary

### Reprints:

Enikő Telegdy MD  
Clinic of Dermatology,  
University of Medical School Pécs  
Pécs  
Kodály Z. u. 20.  
7624 - Hungary

### running head:

HLA in alopecia ...

### Abstract

78 Caucasian patients were examined ( 51 with alopecia areata, 27 with alopecia totalis ). With the examinations ( different serum autoantibody determination ) they had no other autoimmune disease. On the basis of their examinations the authors think that the presence of HLA A2 may predisponate to alopecia and by patients with HLA B 16 may develop alopecia totalis. The association between alopecia and HLA system is disputable even now, the authors think their results are not a coincidence. In the treatment of alopecia the HLA phenotype should also be considered.

### Key words

HLA - alopecia - coincidence ?

## Introduction

Association between alopecia and HLA-system are disputable at present. Some authors are against such an associations because of the complex nature of the aetiology of the disease (11). Other authors refer to autoimmune pathogenesis and mention HLA-phenotypes that can be associated with autoimmune disease (2,5).

In our studies we performed HLA typing of 51 patients with alopecia areata (AA) and 27 patients with alopecia totalis (AT). Our results are summarised in table 1., 2.

## Methods

The patients examined by the above method were all Caucasian. The results of a gypsy patient were not used. There were 51 patients with alopecia areata- 35 female and 16 male. Out of these, 5 patients had endured the symptoms for 10 years, 10 patients for 5-10 years, 36 patients for less than 4 years. With alopecia totalis 27 patients were examined - 17 female and 10 male - The disease had been present for 10 years in 5 patients, for 5-10 years in 7 patients, for less than 4 years in 15 patients. The patients ranged in age from 14 to 42 years. Focal positivity was found in 18 patients with alopecia areata and in 3 patient with alopecia totalis. Low trace element level (the SeFe level was under 14  $\mu\text{mol/l}$  and the SeZn level was 15  $\mu\text{mol/l}$ ) was found in 12 patients with AA and in 4 patients with AT.

Autoantibody determination (gastric parietal cell, antinuclear factor, antimicrosomal factor, smooth and striated muscle, thyroid microsome and antiWBC autoantibody) were found to be positive in 3 patients with alopecia areata ( antithyroid microsome antibody in 2 cases and anti-antinuclear factor antibody in 1 case ) and in 4 patients with alopecia totalis ( gastric parietal in 1 case, antismooth muscle in 1 case, anti-thyroid microsome in 1 case and anti-antinuclear factor in 1 patient ).

As controls we used the data from 588 healthy blood donors examined at the County Blood Transfusion Centre. The significance was set up by using the relative risk-statistical method.

The typing of the HLA-A,B locus antigens was carried out using the lymphocyte toxicity micromethod at the County Blood Transfusion Centre. Isolated lymphocytes were incubated with specific HLA test serum, then a complement was added to the system following the antigen-antibody linkage. This antigen-antibody linkage damaged the cell membrane by means of the complement system. Afterwards indicator stain was added and this diffused through the damaged cell membrane resulting in a positive reaction, whereas a negative reaction was identified by intact cell membranes as the stain was unable to cross the membrane (13).

## Results

It is shown in Table 2, that HLA A2 and B16 are significantly more frequent in patients with alopecia totalis than in either patients with alopecia areata / Table 1 / or control subjects. It can also be stated that in patients with AA the frequency of HLA B8 is observed but not significant - which is regarded to be characteristic in autoimmune disease (6,8). Furthermore, it must be emphasised that in both alopecia types the presence of HLA B16 phenotypes is more frequently found than in normal controls.

## Discussion

Although some studies have already dealt with clearing up the alopecia and the HLA-type connection (1,3,9), they have not succeeded in proving it unanimously (11). According to some authors a familiar correlation (4) or a correlation in a ethnic group (7,12) can be observed between HLA phenotype and alopecia areata. Though

we cannot take sides either due to the relative low number of our cases, on the basis of our examinations we presume that the presence of HLA A2 may lead to a predisposition to alopecia, which in itself cannot predict susceptibility to alopecia areata or alopecia totalis. In the cases of alopecia areata we did not find any significant relevation between the HLA phenotype and the areata form of alopecia. Those patients who attend our clinic with alopecia HLA B16 phenotype are more susceptible to developing alopecia totalis, and patients with HLA A2 and B35 phenotype are also more likely to develop that type of alopecia. An increased incidence of HLA B 35 antigen has already been demonstrated in atopic dermatitis (10).

In patients with autoantibody the relative risk calculations did not show significant association with their HLA types, we noted B8 antigen which is regarded to be an autoimmune character only in 1 patient; so we think that the autoimmune background of the disease cannot be proved on the basis the HLA type.

On the basis of these results we can say that there is no significant association between the HLA phenotype and the alopecia areata, but the association is significant between HLA A 2, B 16 and B 35 and alopecia totalis. The other conclusion is that we have come to, that besides other examinations HLA determination is also essential in producing information for the prognosis of the disease, thereby in selecting milder or more drastic methods of treatment

## References

1. Averbakh EV, Pospelov LE. HLA-antigens in patients with alopecia areata. *J Am Acad Dermatol*. 1986;14: 129-130.
2. Cleland LG, Bell DA, Wilson M, Saurino BC. Familial lupus. Family studies of HLA and serological findings. *Arth Rheum* 1978;21(2): 183-191.
3. Duvic M, Hordinsky M, Fiedler V, O'Brien W, Young R, Reveille JD. HLA-D Locus Association in alopecia areata. *Arch Dermatol* 1991;127: 64-8.
4. Duvic M., Welsh E.A., Jackow C., Papadopoulos E., Reveille J.D., Amos Ch.: Analysis of HLA-D Locus Alleles in Alopecia Areata Patients and Families. *J Invest Dermatol* 1995;104: 5S-6S.
5. Gebhard RL, Katz SI, Marks J, Schuster S, Trapani RJ, Rogetine GN, Strober W. HLA antigen type and small intestinal disease in dermatitis herpetiformis. *Lancet* 1973;2: 760-2.
6. Gebhard RL, Falchuck ZM, Katz SI, Sessoms C, Rogentine GN, Strober W. Dermatitis herpetiformis, immunologic concomitants of small intestinal disease and relationship to histocompatibility antigen HLA- B8. *J Clin Invest* 1974;54 (1): 98-103.
7. Hacham-Zadeh S, Bratbar C, Cohen T. HLA and alopecia areata in Jerusalem. *Tissue Antigens* 1981;18: 71-4.
8. Katz SI, Falchuck ZM, Dahl MV, Rogentine GN, Strober W. HLA-B8 a genetic link between dermatitis herpetiformis and gluten sensitive enteropathy. *J Clin Invest* 1972;51(11): 2977-2980.
9. Kianto U, Reunala T, Karvonen J, Lassus A, Tiilikainen A. HLA - b 12 in alopecia areata. *Arch Dermatol* 1977;113: 1716.
10. Krain L.S., Terasaki P.: HLA antigens in atopic dermatitis. *Lancet* 1973;2:1059.
11. Kuntz BM, Seizle D, Braun-Falco O. HLA antigens in alopecia areata. *Arch Dermatol* 1977;113: 1717.
12. Orecchia G, Belvedere MD, Martinetti M, Capelli E, Rabbiosi G. Human leukocyte antigen region involvement in genetic predisposition to alopecia areata. *Dermatologica* 1987;175: 10-4.
13. Terasaki, P.I. ed. *Histocompatibility Testing 1980*: UCLA Tissue Typing Lab, Los Angeles: Berlin:Springer-Verlag. 1980. 18-20.

Table 1.

## HLA DETERMINATION IN AA

HLA antigens	AA n = 51	AA %	Control n = 588	Control %	Relative Risk
A 1	13	25,5	168	28,57	0,85
A 2	33	64,7	312	53,0	1,62
A 3	13	25,5	116	19,73	1,39
A 9	3	5,9	146	24,83	0,19
A 10	3	5,9	80	13,6	0,39
A 11	8	15,7	53	9,0	1,88
A 19	4	7,8	105	17,86	0,39
A 28	3	5,9	38	6,46	0,9
B 5	8	15,7	94	15,98	0,97
B 7	11	21,57	102	17,35	1,3
B 8	14	27,45	98	16,66	1,89
B 12	3	5,9	136	23,13	0,85
B 13	3	5,9	40	6,8	0,85
B 14	2	3,92	24	4,08	0,96
B 15	1	1,96	74	12,58	0,14
B 16	6	11,76	60	10,2	1,17
B 18	5	9,8	87	14,79	0,62
B 22	2	3,92	28	4,76	0,81
B 27	1	1,96	64	10,88	0,16
B 35	10	19,6	108	18,36	1,08
B 40	6	11,76	67	11,39	1,03

Table 2.

## HLA DETERMINATION IN AT

HLA antigens	AT n = 27	AT %	Control n = 588	Control %	Relative Risk
A 1	3	11,1	168	28,57	0,31
A 2	23	85,2	312	53,0	*5,0
A 3	3	11,1	116	19,73	0,5
A 10	3	11,1	80	13,6	0,79
A 11	2	7,4	53	9,0	0,8
A 19	3	11,1	105	17,86	0,57
A 28	2	7,4	38	6,46	1,15

B 5	7	25,9	94	15,98	1,84
B 7	2	7,4	102	17,35	0,38
B 8	1	3,7	98	16,66	0,19
B 12	6	22,2	136	23,13	0,95
B 13	1	3,7	40	6,8	0,52
B 15	2	7,4	74	12,58	0,55
B 16	9	33,3	60	10,2	*4,4
B 17	1	3,7	44	7,48	0,47
B 18	4	14,8	87	14,79	1,0
B 21	1	3,7	34	5,78	0,62
B 27	5	18,5	64	10,88	1,86
B 35	9	33,3	108	18,36	*2,22
B 40	1	3,7	67	11,39	0,29

**Telegdy E., \* Mojzes J., \* Schneider I., \*  
Sáfrány B., \*\* Kerekes E. \*\***

\* Pécsi Bőrgyógyászati Klinika

\*\* Baranya Megyei Vértranszfúziós Állomás, Pécs

**HLA meghatározások összefüggésének vizsgálata alopeciás  
kórképekben**

megjelenés alatt



Pécsi Orvostudományi Egyetem, Bőrgyógyászati Klinika / ig. Farkas Beatrix Dr. /  
Baranya Megyei Vértanszfúziós Állomás / ig.: Kerekes Endre Dr. / közleménye

HLA meghatározások összefüggésének vizsgálata alopeciás kórképekben

Telegdy Enikő\*, Mojzes Jenő\*, Schneider Imre\*,  
Sáfrány Beatrix\*\*, Kerekes Endre\*\*

\* POTE, Bőrgyógyászati Klinika

\*\* Baranya Megyei Vértanszfúziós Állomás, Pécs

### Összefoglalás

A szerzők 78 kaukázusi típusú beteget vizsgáltak, 51 beteget alopecia areata  
diagnózissal és 27 beteget alopecia totalis diagnózissal. Autoantitest jelenlétét néhány  
esetben sikerült kimutatniuk / alopecia areataban 3 esetben, míg alopecia totalisban 4  
esetben / Megfigyeléseik alapján a szerzők a HLA A2 antigén jelenlétét alopeciára  
predisponáló tényezőnek tartják. A HLA B 16 fenotípus előfordulását pedig alopecia  
totalis kialakulására hajlamosítónak tartják. A megfigyelések alapján a szerzők úgy vélik,  
a HLA rendszer vizsgálata fontos lehet a prognózis és a terápia megválasztása  
szempontjából.

Kulcsszavak:

HLA - alopecia - összefüggés ?

### Summary

78 Caucasian patients were examined / 51 with alopecia areata, 27 with alopecia totalis /. With the examinations in some cases autoantibodies was detected / by 3 patients in alopecia areata and by 4 patients in alopecia totalis /. On the basis of their examinations the authors think that the presence of HLA A2 antigen may predisponate to alopecia and by patients with HLA B16 may develop alopecia totalis. The association between alopecia and HLA system is disputable even now, the authors think their results are not a coincidence. In the prognosis and in the treatment of alopecia the HLA phenotype should also be considered.

### Key words

HLA - alopecia -coincidence ?

### Bevezetés

Az alopeciás körkép és a HLA rendszer közötti összefüggés egyelőre vitatott. Egyes szerzők nem tulajdonítanak összefüggést az aetiologia complex volta miatt /11 /, más szerzők az autoimmun eredetre hivatkozva, autoimmun betegségekkel összefüggésbe hozható HLA-fenotípust említenek /2, 5/

Vizsgálataink keretében 51 alopecia areata (AA) és 15 alopecia totalis (AT) diagnózissal bíró betegnél végeztünk HLA tipizálást. Eredményeinket táblázatban foglaltuk össze / 1., 2. táblázat/

Beteganyag és módszer

A HLA - A, B locus antigéneinek tipizálása a Terasaki-féle lymphocytotoxicitás mikromódszer alapján történt, a Megyei Vértadó Állomáson. Izolált humán lymphocytákat inkubáltak specifikus HLA antiszérumokkal, majd az antigén - antitest kötődés után komplementet adtak a rendszerhez. Ahol létrejött az antigén - antitest kötődés után komplementet adtak a rendszerhez. Ahol létrejött az antigén-antitest kötődés, a komplement károsította a sejtmembránt és az indikátor festék bediffundált a sejtbe /pozitív reakció/, míg az ép sejtmembránon keresztül nem jutott be a festék a sejtbe (negatív reakció) /13/.

A fenti módszerrel vizsgált, kiválasztott beteganyagunk valamennyi kaukázusi típusú volt. Egy alopecia totalis diagnózissal kezelt cigány betegünk eredményeit nem használtuk fel munkánkban. A 51 alopecia areata diagnózissal kezelt betegünk közül 35 nő - és 16 férfibeteg volt. Közülük 5 betegnél több mint 10 éve, 10 betegnél 5 - 10 év között, 7 betegnél 4 éven belül és 29 betegnél 1 éven belül jelentkeztek a tünetek. Alopecia totalis diagnózissal 27 betegnél végeztük el a HLA tipizálást, 17 nő - és 10 férfibetegnél. Közülük 5 betegnél 10 évnél régebb óta, 7 beteg esetében 5-10 év között, 10 betegnél 4 éven belül és 5 betegnél 1 éven belül léptek fel a tünetek. Betegeink életkora 14-42 év volt. Góc pozitivitást AA esetében 18 betegnél, míg AT esetében 3 betegnél észleltünk. Alacsony nyomelem szintet / 14  $\mu\text{mol/l}$  alatti seFe szintet ill. 15  $\mu\text{mol/l}$  seZn szintet / AA esetében 12 betegnél, AT esetében 4 betegnél észleltünk.

A betegeinknél elvégzett autoantitest vizsgálatainkkal /gasztrikus parietális sejt, antinukleáris faktor, antimitokondriális faktor, síma - ill. harántcsikoltizom, pajzsmirigy mikroszóma, valamint fehérvérsejt ellenes autoantitest / AA diagnózisú betegeinknél 3 esetben ( 2 pajzsmirigy mikroszóma ellenes ill. 1 ízben antinukleáris faktor ellenes antitesttel), míg AT esetében 4 betegnél kaptunk pozitív eredményt (1 ízben gasztrikus parietális, 1 ízben símaizom ellenes, 1 esetben pajzsmirigy mikroszóma ellenes ill. 1 betegnél antinukleáris faktor ellenes antitesttel)

A HLA vizsgálatok kontroll csoportjaként a Megyei Vértadó Állomás által megadott kontrollcsoport - értéket használtuk fel, melyet 588 egészséges veredőnél állítottak fel.

A szignifikanciát a relatív rizikó statisztikai módszerrel állítottuk fel.

#### Eredmények

Táblázatainkból látható, hogy alopecia totalis / 2. táblázat / esetében a HLA A2 B 16, valamint a B 35 antigének előfordulása szignifikánsan gyakoribb mind a kontrollcsoporthoz képest, mind az alopecia areata diagnózisú betegekhez képest. Ugyancsak megállapítható, hogy az alopecia areata diagnózissal vizsgált betegeinknél / 1. táblázat / a HLA B8 fordul elő leggyakrabban, bár az előfordulás nem szignifikáns - amit autoimmun betegségekre jellemzőnek tartanak / 6,8 / Kihangsúlyozandó továbbá, hogy mindkét alopecia fajtánál a HLA A 16 fenotípus jelenléte számottevő, az egészséges kontrollcsoporthoz képest.

#### Diskusszió

Bár néhány közlemény már foglalkozott az alopecia és a HLA típus közötti összefüggés felderítésével /1,3/, egyértelmű bizonyítékot még nem sikerült felmutatni /11/. Egyes szerzők a HLA fenotípusokat genetikailag meghatározónak tekintik /8,12/ alopecia areatában, mások csupán családon /4/ ill. népcsoporton /7,9/ belüli előfordulását hozzák összefüggésbe az AA kialakulásával /4/. Vizsgálatainkkal, bár a relatíve kis esetszám miatt egyértelmű állásfoglalást mi sem tehetünk, azt feltételezzük, hogy a HLA A 2 jelenléte predisponálhat alopecia kifejedéséhez, ami azonban önmagában nem jósolhatja meg az alopecia areatara ill. alopecia totalisra való hajlamot. Alopecia areata esetében szignifikánsan gyakrabban előforduló HLA fenotípust kimutatni nem tudtunk. Ezzel szemben a hozzánk forduló alopeciás betegek HLA B 16 - os antigénfenotípussal hajlamosabbnak bizonyultak az alopecia totalis kórforma kialakulására, ill. ugyancsak gyakrabban alakult ki ez az alopecia kórforma a HLA A 2, B 35 fenotípusú betegeknél. A HLA B 35-ös fenotípust eddig atópiás dermatitisben tartották jellemzőnek /10 /.

Az autoantitesttel rendelkező betegeinknél nem találtunk a relatív rizikószámítás alapján szignifikáns összefüggést a HLA típusokra vonatkozóan, mindössze 1 betegnél észleltünk az autoimmun karakternek tartott B 8 - as antigén és autoantitest együttes előfordulását; így úgy gondoljuk, hogy HLA fenotípus alapján nem bizonyítható a kórkép autoimmun háttere.

Ezen eredmények alapján, melyek során részben összefüggés mutatható fel a HLA fenotípus és az alopecia között azt a következtetést vonjuk le, hogy a HLA meghatározás, az egyéb vizsgálatok mellett szintén lényeges a betegség prognózisára való felvilágosítást illetően és így a kezelés enyhébb, avagy drasztikusabb módjának megválasztása szempontjából is.

## Irodalom

1. Averbakh E. V., Pospelo L.E.: J Am Acad Dermatol. 14:129 (1986)
2. Cleland L.G., Bell D.A., Wilson M. és mtsai: Arth Rheum 21:183 (1978)
3. Duvic M., Hordinsky M., Fiedler V. és mtsai: Arch Dermatol 127:64 (1991)
4. Duvic M., Welsh E.A., Jackow C. és mtsai: J Invest Dermatol 104:5S (1995)
5. Gebhard R.L., Katz S.I., Marks J. és mtsai: Lancet 1:760 (1973)
6. Gebhard R.L., Falchuck Z.M., Katz S.I. és mtsai: J Clin Invest 54:1:98 (1974)
7. Hacham-Zadeh S., Bratbar C., Cohen T.: Tissue Antigens 18:71 (1981)
8. Katz S.I., Falchuck Z.M., Dahl M.V. és mtsai: J Clin Invest 51:11:2977 (1972)
9. Kianto U., Reunala T., Karvonen J. és mtsai: Arch Dermatol 113:1716 (1977)
10. Krain L.S., Terasaki P.: Lancet 2:1059 (1973)
11. Kuntz B.M., Selzle D., Braun-Falco O.: Arch Dermatol 113:1717 (1977)
12. Orecchia G., Belvedere M.D., Martinelli M. és mtsai: Dermatologica 175:10 (1987)
13. Terasaki P.I.: Histocompatibility Testing, Ed. UCLA Tissue Typing Lab, Los Angeles. Springer-Verlag Publisher, Berlin 18-20 (1980)

## 1. TÁBLÁZAT

HLA meghatározások alopecia areataban

HLA antigének	AA n=51	AA %	Kontroll n=588	%	Kontroll	Relatív rizikó
A 1	13	25,5	168	28,57	0,85	
A 2	33	64,7	312	53,0	1,62	
A 3	13	25,5	116	19,73	1,39	
A 9	3	5,9	146	24,83	0,19	
A 10	3	5,9	80	13,6	0,39	
A 11	8	15,7	53	9,0	1,88	
A 19	4	7,8	105	17,86	0,39	
A 28	3	5,9	38	6,46	0,9	
B 5	8	15,7	94	15,98	0,97	
B 7	11	21,57	102	17,35	1,3	
B 8	14	27,57	98	16,66	1,89	
B 12	3	5,9	13	23,13	0,85	
B 13	3	5,9	40	6,8	0,85	
B 14	2	3,92	24	4,08	0,96	
B 15	1	1,96	74	12,58	0,14	
B 16	6	11,76	60	10,2	1,17	
B 18	5	9,8	87	14,79	0,62	
B 22	2	3,92	28	4,76	0,81	
B 27	1	1,96	64	10,88	0,16	
B 35	10	19,6	108	18,36	1,08	
B 40	6	11,76	67	11,39	1,03	

## 2. TÁBLÁZAT

HLA meghatározások alopecia totalisban

HLA antigének	AT n=27	AT %	KONTROLL n=588	KONTROLL %	Relatív rizikó
A1	3	11,1	168	28,57	0,31
A2	23	85,2	31	53,0	5,0*
A3	3	11,1	116	19,73	0,5
A10	3	11,1	80	13,6	0,79
A11	2	7,4	53	9,0	0,8
A19	3	11,1	10	17,86	0,57
A28	2	7,4	38	6,46	1,15
B5	7	25,9	94	15,98	1,84
B7	2	7,4	102	17,35	0,38
B8	1	3,7	98	16,66	0,19
B12	6	22,2	136	23,13	0,95
B13	1	3,7	40	6,8	0,52
B15	2	7,4	74	12,58	0,55
B16	9	33,3	60	10,2	4,4*
B17	1	3,7	44	7,48	0,47
B18	4	14,8	87	14,79	1,0
B21	1	3,7	34	5,78	0,62
B27	5	18,5	64	10,88	1,86
B35	9	33,3	108	18,36	2,22*
B40	1	3,7	67	11,39	0,29