Streszczenie pracy doktorskiej lek. Karoliny Englert

Promotor: prof. dr hab. Anna Wojas-Pelc

Temat pracy doktorskiej: *„Ocena ekspresji endosomalnych receptorów Toll-like typu 7, 8, 9 (TLR-7, 8, 9) w biopsjach skórnych u pacjentów ze zmianami skórnymi w przebiegu tocznia rumieniowatego (SCLE/DLE) oraz ich znaczenie w przewidywaniu odpowiedzi klinicznej na leczenie hydroksychlorochiną"* – monografia

Wprowadzenie: Skórne postaci tocznia rumieniowatego (*cutaneous lupus erythematosus; CLE*) to grupa różnorodnych pod względem klinicznym jednostek chorobowych o podłożu autoimmunologicznym, pierwotnie zajmujących skórę oraz błonę śluzową, o złożonych i nie w pełni poznanych mechanizmach patogenetycznych. Wspólną cechą łączącą poszczególne odmiany tych jednostek chorobowych jest obraz histopatologiczny „interface dermatitis" oraz depozyty złożone z autoprzeciwciał oraz składowych komplementu na granicy skórno-naskórkowej. Skórny naciek zapalny jest złożony m.in. z limfocytów Th1 oraz plazmocytoidalnych komórek dendrytycznych produkujących IFN typu I – jedną z głównych cytokin biorących udział w patogenezie rozwoju CLE. Różne czynniki środowiskowe takie jak promieniowanie UV, u podatnych genetycznie osobników, mogą przyczyniać się do rozwoju skórnych postaci tocznia rumieniowatego. Konsekwencją tych procesów są: uszkodzenie tkanek oraz zaburzenia w eliminacji debris komórkowego, co zaburza stan autotolerancji.

Receptory Toll-podobne (*Toll like receptors; TLRs*) należą do głównej klasy receptorów rozpoznających wzorce (*pattern recognition receptors; PRRs*) wrodzonej odpowiedzi immunologicznej i biorą udział w rozpoznawaniu patogennych mikroorganizmów. Ponadto receptory Toll-podobne inicjują wewnątrzkomórkowe kaskady sygnałowe prowadzące m.in. do translokacji jądrowej cząsteczki NF-κB, która stanowi kluczowy czynnik transkrypcyjny promujący ekspresję genów kodujących molekuły odpowiedzi immunologicznej.

Hydroksychlorochina stanowi I-linię leczenia skórnego tocznia rumieniowatego (SCLE i DLE), w przypadku gdy terapia miejscowa jest niewystarczająca. Jednak nie u wszystkich pacjentów udaje się osiągnąć remisję kliniczną zmian skórnych. Jednym z postulowanych mechanizmów działania leków antymalarycznych jest inhibicja szlaków sygnałowych zależnych od endosomalnych receptorów TLR typu 7 i 9. Ponadto aktualne doniesienia naukowe przedstawiają rolę receptorów TLR typu 7, 8, 9 w patogenezie rozwoju tocznia rumieniowatego układowego, a ich funkcja w ewolucji skórnego tocznia rumieniowatego nie jest w pełni wyjaśniona i stanowi obecnie przedmiot badań. Biorąc pod uwagę powyższe doniesienia podjęto temat analizy ekspresji receptorów TLR w biopsjach skórnych u pacjentów z podostrą i dyskoidalną postacią tocznia rumieniowatego.

Cele pracy:

a) Ocena siły ekspresji receptorów TLR typu 7, 8, 9 w naskórku oraz w obrębie limfocytów nacieku zapalnego wyrażona w 3-stopniowej skali.
b) Ocena grubości naskórka oraz grubości części nabłonkowej mieszka włosowego z pozytywnym odczynem immunohistochemicznym na receptory TLR typu 7, 8, 9.
c) Ocena odsetka limfocytów z pozytywnym odczynem immunohistochemicznym na receptory TLR typu 7, 8, 9.
d) Analiza korelacji pomiędzy poziomem ekspresji receptorów typu 7, 8, 9, a odpowiedzią na leczenie hydroksychlorochiną mierzoną procentowym obniżeniem się wskaźnika CLASI.
e) Analiza korelacji pomiędzy stopniem nasilenia choroby ocenianym w skali CLASI, a wybranymi parametrami laboratoryjnymi i klinicznymi.

Metodyka: Do badania włączono 66 pacjentów ze skórną postacią tocznia rumieniowatego (SCLE i DLE) będących pacjentami Poradni Dermatologicznej Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie. Grupę kontrolną stanowiło 4 zdrowych osobników, u których pobrano biopsję skóry zdrowej, nieeksponowanej na promieniowanie UV z okolicy pośladka. U każdego pacjenta włączonego do badania wykonano biopsję skórną przed włączeniem systemowego leczenia immunomodulującego i immunosupresyjnego, w tym terapii hydroksychlorochiną. Następnie, za pomocą metod immonuhistochemii, oznaczono ekspresję receptorów TLR typu 7, 8, 9 w biopsjach skórnych w grupie badanej i kontrolnej. Ponadto w grupie badanej została także przeprowadzona ocena nasilenia zmian skórnych z użyciem skali CLASI przed włączeniem systemowego leczenia immunomodulującego i immunosupresyjnego oraz po 3-6 miesięcznym okresie terapii. Dokonano analizy korelacji pomiędzy poziomem ekspresji receptorów typu 7, 8, 9, a odpowiedzią na leczenie hydroksychlorochiną mierzoną procentowym obniżeniem się wskaźnika CLASI po 3-6 miesięcznym okresie leczenia. Ewaluacji została także poddana korelacja pomiędzy stopniem nasilenia choroby mierzonym przy pomocy wskaźnika CLASI przed włączeniem systemowego leczenia immunomodulującego i immunosupresyjnego, a wybranymi parametrami w grupie badanej.

Wyniki: Pacjenci z wyższym wskaźnikiem CLASI istotnie częściej prezentowali objawy w postaci: artralgii stawów rąk i stóp i/lub kolan i/lub łokci, limfopenii i niedokrwistości chorób przewlekłych. Zależność pomiędzy wskaźnikiem nasilenia choroby ocenianym w skali CLASI, a obecnością małopłytkowości u pacjentów z CLE była na granicy istotności statystycznej.
Nie wykazano ekspresji TLR typu 7 w obrębie naskórka u pacjentów z CLE, jak i w grupie kontrolnej. Biopsje skórne zarówno skóry zdrowej jak i zmian o typie CLE charakteryzowały

się ekspresją TLR 8 i 9 w obrębie naskórka, części nabłonkowej mieszka włosowego oraz ekspresją TLR 7, 8, 9 w obrębie nacieku limfocytarnego w skórze właściwej. Pacjenci z CLE wykazywali istotnie statystycznie niższą siłę ekspresji TLR typu 9 w naskórku, mniejszą grubość naskórka z pozytywną ekspresją receptorów TLR typu 8, 9 oraz niższy średni odsetek limfocytów z pozytywną ekspresją receptorów TLR typu 8, 9 w stosunku do grupy kontrolnej. Ekspresja receptora TLR typu 9 w obrębie części nabłonkowej mieszka włosowego była istotnie statystycznie niższa w biopsjach pacjentów zarówno z SCLE jak i DLE w porównaniu do grupy kontrolnej. Ponadto pacjenci z SCLE charakteryzowali się istotnie wyższą ekspresją TLR typu 8 w obrębie naskórka w porównaniu do pacjentów z DLE. Z kolei u pacjentów z DLE zaobserwowano istotnie wyższą ekspresję TLR typu 9 w obrębie naskórka oraz części nabłonkowej mieszka włosowego w porównaniu do pacjentów z SCLE.
Siła ekspresji TLR typu 9 w obrębie limfocytów u pacjentów podostrą i dyskoidalną postacią tocznia rumieniowatego korelowała z odpowiedzią na leczenie hydroksychlorochiną i procentowym obniżeniem się wskaźnika CLASI po leczeniu. Chorzy z najlepszą odpowiedzią na leczenie hydroksychlorochiną (obniżenie się wskaźnika CLASI po leczeniu powyżej 80%) prezentowali najwyższą silę ekspresji TLR typu 9 w obrębie limfocytów nacieku zapalnego (3 stopień w skali 0-3). Pacjenci, u których ze względu na niedostateczną odpowiedz na leczenie hydroksychlorochiną w dawce 200 mg zwiększono dawkowanie hydroksychlorochiny do 400 mg prezentowali istotnie niższą ekspresję receptorów TLR typu 9 w obrębie naskórka (charakteryzowali się mniejszą grubością naskórka z pozytywną ekspresją TLR typu 9) oraz niższy średni odsetek limfocytów z pozytywną ekspresją TLR9 w porównaniu do pozostałych pacjentów leczonych hydroksychlorochiną w dawce 200 mg.

Wnioski: Nasze badanie uzasadnia rekomendację do stosowania w szerokiej praktyce klinicznej skali CLASI w celu oceny nasilenia zmian skórnych, gdyż przy wysokim wskaźniku CLASI możliwa jest wstępna identyfikacja chorych, u których spodziewamy się także objawów pozaskórnych CLE.
W powyższej pracy nie wykazano ekspresji TLR typu 7 w obrębie naskórka, zarówno w skórze zdrowej, jak i w obrębie zmian skórnych o typie CLE, co może wskazywać, że receptory TLR typu 7 nie odgrywają istotnej roli w powstawaniu zmian skórnych w przebiegu CLE. Rozwój zmian skórnych o typie CLE może być z kolei zależny od niższej, w stosunku do skóry zdrowej, ekspresji TLR typu 8 i 9 w obrębie naskórka oraz nacieku limfocytarnego w skórze właściwej oraz niższej ekspresji TLR typu 9 w obrębie części nabłonkowej mieszka włosowego. Nasze wyniki są zgodne z badaniami na modelach zwierzęcych oraz modelu in vitro SLE, w których wysoka ekspresja TLR typu 8 i 9 odgrywała rolę protekcyjną w rozwoju choroby.

Stwierdzenie u chorych z CLE niższej ekspresji TLR typu 8 i 9 w obrębie naskórka oraz niższego odsetka limfocytów w skórze właściwej z pozytywną ekspresją TLR typu 8 i 9 może być niekorzystnym czynnikiem świadczącym o aktywności procesu chorobowego.
Skuteczność leczenia hydroksychlorochiną może zależeć od ekspresji receptora TLR typu 9 w skórze chorych z CLE. Wykazano, że wyższa siła ekspresji TLR typu 9 w obrębie nacieku limfocytarnego w biopsjach skórnych pacjentów z CLE wiązała się z lepszą odpowiedzią na leczenie hydroksychlochiną mierzoną procentowym obniżeniem wskaźnika CLASI. Wyższa ekspresja TLR typu 9 w obrębie naskórka i wyższy odsetek limfocytów w skórze właściwej z pozytywną ekspresją TLR9 wiązały się z możliwością zastosowania niższych dawek hydroksychlorochiny koniecznych do uzyskania remisji klinicznej.

Summary

Introduction: Cutaneous lupus erythematosus (CLE) is a group of clinically diverse autoimmune diseases, primarily affecting the skin and mucosa, with complex and not fully understood pathogenetic mechanisms. The common feature that connects various types of these diseases is the histopathological image of "interface dermatitis" and deposits of autoantibodies and complement components at the dermaoepidermal junction. Cutaneous inflammatory infiltrate contains multiple components, including Th1 lymphocytes and plasmacytoid dendritic cells producing IFN type I - one of the main cytokines involved in the pathogenesis of CLE. Various environmental factors, such as UV radiation, may contribute to the development of cutaneous forms of lupus erythematosus in genetically susceptible individuals. Consequences of these processes are: tissue damage and dysfunction in elimination of cellular debris, which disturbs the state of self-tolerance.

Toll-like receptors (TLRs) belong to the main class of pattern recognition receptors (PRRs) of the innate immune response. They are involved in recognition of pathogenic microorganisms. In addition, Toll-like receptors initiate intracellular signaling cascades leading, inter alia, to translocation of the nuclear NF-κB molecule, which is a key transcription factor promoting the expression of genes encoding immune response molecules.

Hydroxychloroquine is the first line of treatment for cutaneous lupus erythematosus (SCLE and DLE) when topical therapy is insufficient. However, not all patients achieve clinical remission of skin lesions. One of the postulated mechanisms of action of antimalarial drugs is inhibition of signaling pathways dependent on type 7 and 9 endosomal TLRs. Moreover, current scientific reports show the role of type 7, 8 and 9 TLRs in the pathogenesis of systemic

lupus erythematosus. Their function in the development of cutaneous lupus erythematosus is not fully explained and is currently under investigation. Taking into account the above reports, the analysis of TLR receptor expression in skin biopsies in patients with subacute and discoid forms of lupus erythematosus was undertaken.

Aims:

a. Assessment of strength of type 7, 8 and 9 TLRs expression in the epidermis and within lymphocytes of the inflammatory infiltrate, expressed on a 3-point scale.

b. Assessment of thickness of the epidermis and thickness of the epithelial part of hair follicles with a positive immunohistochemical reaction for type 7, 8, 9 TLRs.

c. Assessment of the percentage of lymphocytes with a positive immunohistochemical reaction for TLRs 7, 8, 9.

d. Analysis of a correlation between the level of expression of type 7, 8, 9 Toll-like receptors and the response to treatment with hydroxychloroquine, measured by the percentage reduction in CLASI index.

e. Analysis of a correlation between the degree of disease severity assessed in the CLASI scale and selected laboratory and clinical parameters.

Methods: Sixty-six patients with cutaneous lupus erythematosus (SCLE and DLE) who are patients of the Dermatology Clinic of the University Hospital in Krakow were enrolled. The control group was consisted of 4 healthy individuals from whom a biopsy of healthy skin, not exposed to UV radiation, was collected from the buttock area. Each patient enrolled in the study had a skin biopsy prior to the initiation of systemic immunomodulatory and immunosuppressive therapy, including hydroxychloroquine therapy. Then, expression of type 7, 8, 9 TLRs in skin biopsies in the study and control group was determined using immunohistochemical methods. In addition, severity of skin lesions was also assessed using the CLASI scale in the study group, before the initiation of systemic immunomodulating and immunosuppressive therapy and after the 3-6-month treatment period. The analysis of correlation between the expression level of type 7, 8, 9 Toll-like receptors and the response to hydroxychloroquine treatment, measured by a percentage decrease in the CLASI index after 3-6 months of treatment, was performed. Correlation between severity of the disease, measured with the CLASI index before the initiation of systemic immunomodulating and immunosuppressive treatment, and selected parameters in the study group were also evaluated.

Results: Patients with a higher CLASI index significantly more often presented symptoms in the form of: arthralgia in the hands and feet and/or knees and/or elbows, lymphopenia and anemia of chronic diseases. A relationship between the disease severity index assessed on the CLASI scale and the presence of thrombocytopenia in patients with CLE was at the border of statistical significance.

There was no evidence of type 7 TLR expression in the epidermis in patients with CLE and in the control group. Skin biopsies of both healthy skin and CLE lesions were characterized by expression of type 8 and 9 TLRs in the epidermis, epithelial part of hair follicles and expression of type 7, 8 and 9 TLRs in the lymphocytic infiltrate in the dermis. Patients with CLE showed statistically significantly lower strength of expression of type 9 TLR in the epidermis, lesser thickness of the epidermis with positive expression of type 8, 9 TLRs, and a lower average percentage of lymphocytes with positive expression of type 8, 9 TLRs compared to the control group. Type 9 TLRs expression in epithelial part of hair follicles was lower in SCLE as well as DLE patients compared to the control group. Moreover, patients with SCLE showed significantly higher expression of type 8 TLR in the epidermis compared to patients with DLE. On the other hand, in patients with DLE, a significantly higher expression of type 9 TLR in the epidermis and epithelial part of hair follicles was observed compared to patients with SCLE.

The strength of type 9 TLR expression in lymphocytes in patients with subacute and discoid lupus erythematosus correlated with the response to treatment with hydroxychloroquine and the percentage reduction in CLASI index after treatment. Patients with the best response to treatment (decrease in CLASI after treatment above 80%) showed the highest level of type 9 TLR expression in lymphocytes (grade 3 on a 0-3 scale). Moreover, patients whose dose of hydroxychloroquine was up-titrated to 400 mg, due to an insufficient response to treatment with hydroxychloroquine at the dose of 200 mg, presented significantly lower expression of type 9 TLRs in the epidermis (characterized by a smaller thickness of the epidermis with positive expression of type 9 TLRs) and a lower average percentage of lymphocytes with positive TLR9 expression compared to other patients treated with 200 mg hydroxychloroquine.

Conclusions: Our investigation justifies the recommendation for evaluating skin lesions in CLE patients using CLASI index in wide clinical practice. In case of a high CLASI score we can preliminarily identify patients with possible extracutaneous involvement.

In our research work, the expression of type 7 TLR in the epidermis of CLE patients, as well as in healthy skin, was not determined. This may indicate that type 7 TLR may not play an important role in CLE development. In turn, lower expression of type 8 and 9 TLR

in the epidermis, in the lymphocytic infiltrate in the dermis and lower expression of type 9 TLR in epithelial part of hair follicles in CLE patients, compared to healthy skin, positively affect the development of this disease. Our results are consistent with the SLE studies on animal and in vitro models, in which high expressions of type 8 and 9 TLR play a protective role in the development of this disease.

Lower expression of type 8 and 9 TLRs in the epidermis and a lower percentage of lymphocytes in the dermis with positive expression of type 8 and 9 TLRs in skin biopsies in CLE patients may constitute an unfavorable factor in terms of disease activity.

The effectiveness of hydroxychloroquine treatment depends on expression of type 9 TLR. Higher strength of expression of type 9 TLRs in the lymphocytic infiltrate in skin biopsies of CLE patients is associated with a better response to hydroxychloroquine treatment, as measured by a percentage reduction in CLASI index. Higher type 9 TLR expression in the epidermis and a higher percentage of lymphocytes with positive type 9 TLR expression in the dermis are associated with a lower dose of hydroxychloroquine necessary for clinical remission.