

Streszczenie

Wprowadzenie: Liszaj płaski (łac. lichen planus – LP) jest przewlekłą dermatozą zapalną, która może zajmować skórę gładką, błony śluzowe, włosy i/lub paznokcie. Zwraca uwagę duża różnorodność manifestacji klinicznych i odmian choroby. Wielu pacjentów skarży się na nasilony świąd, który może być przyczyną znacznego obniżenia jakości życia. Pomimo intensywnego leczenia nie u wszystkich pacjentów udaje się uzyskać remisję świądu i zmian chorobowych. Stąd też wynika potrzeba znalezienia nowych opcji terapeutycznych. Dokładne poznanie patogenezы LP mogłoby umożliwić leczenie celowane choroby. Większość dostępnych w literaturze doniesień dotyczy jednak liszaja płaskiego błon śluzowych (ang. oral lichen planus – OLP), który przez wielu badaczy uznawany jest za odrębną jednostkę o odmiennej immunopatogenezie. Skórny liszaj płaski (ang. cutaneous lichen planus – CLP) uważany jest za schorzenie mediowane immunologicznie będące wynikiem opóźnionej reakcji nadwrażliwości. Limfocyty T stanowią dominującą populację komórkową tworzącą naciek zapalny w CLP. Komórki cytotoksyczne CD8+ zlokalizowane są w przeważającej części w bezpośrednim sąsiedztwie błony podstawnej. Z kolei komórki CD4+, przeważające ilościowo nad komórkami CD8+, dominują w dolnej części nacieku, sięgającego do skóry właściwej. W literaturze dostępne są jedynie pojedyncze doniesienia, w których oceniano obecność pozostałych komórek układu immunologicznego w nacieku zapalnym. Wskazują one na obecność komórek CD68+, CD56+, CD20+, Foxp3+ oraz mastocytów. Dokładne znaczenie poszczególnych populacji komórkowych w etiopatogenezie CLP pozostaje jednak nieokreślone. Ponadto u pacjentów z CLP stwierdzano zwiększone stężenie w surowicy lub ekspresję w zmianach chorobowych: IL-1, IL-6, IL-9, IL-18, IL-23, TNF- α oraz IFN- γ . Rola IL-17 w patogenezы OLP była do tej pory przedmiotem wielu badań. Niewiele wiadomo jednak na temat stężenia w surowicy i ekspresji tkankowej IL-17 u pacjentów chorujących na CLP.

Cel pracy: Celem I części badania była charakterystyka kliniczna pacjentów z CLP, oznaczenie stężenia IL-17 w surowicy chorych oraz próba znalezienia zależności pomiędzy stężeniem IL-17 a cechami klinicznymi: płcią, wiekiem, czasem trwania CLP, wiekiem w momencie zachorowania, obecnością i nasileniem świądu, rozległością zmian skórnych oraz współwystępowaniem zmian w obrębie aparatu paznokciowego lub na błonach śluzowych. Celem II części badania była ocena jakościowa i ilościowa obecności komórek układu immunologicznego oraz oznaczenie ekspresji IL-17 w skórze zmienionej chorobowo w przebiegu CLP.

Material i metody: Do I części badania włączono 52 dorosłych pacjentów z CLP, bez współistniejących istotnych schorzeń zapalnych i autoimmunologicznych, hospitalizowanych w Klinice Dermatologii, Wenerologii i Alergologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu w latach 2014-2017. Grupę kontrolną stanowiło 27 zdrowych ochotników z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa we Wrocławiu, odpowiednio dobranych pod względem płci i wieku. Z uczestnikami I części badania zebrano dokładny wywiad lekarski i przeprowadzono badanie fizykalne. Nasilenie stresu w ciągu roku przed obecnym zaostrzeniem CLP oceniono według kwestionariusza SRRS. Do oceny nasilenia świądu wykorzystano skalę numeryczną (ang. numeric rating scale – NRS) i 4-punktowy kwestionariusz oceny świądu. Od pacjentów z CLP oraz zdrowych ochotników pobrano 9ml krwi żyłnej. W uzyskanej po odwirowaniu surowicy oznaczono stężenie IL-17 metodą reakcji immunoenzymatycznej ELISA (ang. enzyme-linked immunosorbent assay) przy użyciu gotowego zestawu ELISA Quantikine® HS (R&D Systems®, USA) Human IL-17. W II części badania, wykorzystano archiwalne bloczki parafinowe Pracowni Histopatologicznej przy Klinice Dermatologii, Wenerologii i Alergologii we Wrocławiu, pochodzące od 14 pacjentów z potwierdzonym histologicznie rozpoznaniem LP. Ponadto od 11 zdrowych ochotników pobrano wycinki ze zdrowej skóry z miejsc nieekspozowanych na słońce. W biopatach tkankowych wykonano oznaczenia immunohistochemiczne markerów komórkowych: CD4, CD8, CD20, CD56, CD68, c-Kit, Foxp3 oraz cytokiny IL-17. Preparaty oceniono w mikroskopie świetlnym Zeiss Axio Imager A2 z użyciem toru wizyjnego i oprogramowania Zeiss AxioVision. Pozytywnie wybarwione komórki zliczono w 10 polach widzenia dla każdego preparatu przy powiększeniu 200-krotnym i wyliczono wartość średnią. Analizę statystyczną przeprowadzono przy pomocy oprogramowania Statistica®, wersja 12.0 (Statsoft Polska).

Wyniki: Grupę badaną stanowiło 52 pacjentów z CLP (średni wiek $51,6 \pm 15,55$ lat) – 22 mężczyzn i 30 kobiet. Grupę kontrolną stanowiło 27 zdrowych ochotników (średni wiek $45,59 \pm 10,15$ lat) – 15 mężczyzn i 12 kobiet. Średnie BMI pacjentów z CLP wynosiło $26,96 \pm 5,15$ kg/m². 24 (46,15%) pacjentów z CLP paliło papierosy. Średni wiek, w którym zaczęły pojawiać się pierwsze zmiany skórne wynosił $48,5 \pm 15,74$ lat. Czas trwania choroby w grupie badanej wynosił $3,15 \pm 6,87$ lat. Czas trwania zaostrzenia CLP, które było powodem hospitalizacji pacjenta wynosił $8,29 \pm 16,36$ miesięcy. Na świąd w obrębie zmian chorobowych skarżyło się 45 (86,54%) pacjentów. Średnie nasilenie świądu wynosiło $5,25 \pm 3,03$ według skali NRS oraz $7,43 \pm 4,66$ punktów według 4-punktowego kwestionariusza oceny świądu. Średnie nasilenie stresu według kwestionariusza SRRS wynosiło $178,84 \pm 127,97$ punktów. Zajęta powierzchnia

skóry wynosiła $13,23 \pm 15,35\%$. Współwystępowanie zmian na błonach śluzowych jamy ustnej lub narządów płciowych stwierdzono odpowiednio u 28 (53,85%) i 4 (7,69%) pacjentów. Paznokcie były zmienione chorobowo u 14 (26,92%) pacjentów, a zajęcie skóry owłosionej głowy obserwowano w 2 (3,85%) przypadkach. Dominującą odmianą kliniczną była postać wysiewna CLP (96,15% pacjentów). Mężczyźni chorujący na CLP istotnie statystycznie częściej palili papierosy w porównaniu z kobietami chorującymi na CLP ($p=0,03$). Stwierdzono istotnie statystycznie częstsze współwystępowanie zmian na błonach śluzowych jamy ustnej u mężczyzn w porównaniu z grupą kobiet ($p=0,0088$). W grupie pacjentów z CLP stwierdzono istotnie statystycznie wyższe stężenie IL-17 w surowicy w porównaniu z grupą kontrolną ($0,218 \pm 0,221$ ng/ml versus $0,126 \pm 0,058$ ng/ml; $p=0,025$). U mężczyzn wykazano wyższe stężenie IL-17 w surowicy w przypadku braku zmian na płytkach paznokciowych ($p=0,04$). Z kolei u kobiet stwierdzono istotną statystycznie ujemną korelację pomiędzy stężeniem IL-17 w surowicy a czasem trwania choroby ($p=0,02$; $r=-0,41$). W preparatach tkankowych pochodzących od pacjentów z CLP ($n=14$) stwierdzono istotnie statystycznie większą liczbę komórek wykazujących ekspresję CD4 ($p<0,001$), CD8 ($p<0,001$), CD68 ($p<0,001$), Foxp3 ($p<0,001$), CD56 ($p=0,019$) oraz CD20 ($p<0,001$) w porównaniu z preparatami tkankowymi prawidłowej skóry pochodzącymi od zdrowych ochotników. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w ekspresji c-Kit w zmianach chorobowych CLP i zdrowej skórze. Ponadto stwierdzono istotnie statystycznie większą liczbę komórek wykazujących ekspresję IL-17 w skórze zmienionej chorobowo w porównaniu ze skórą zdrową ($p<0,001$). Liczba komórek wykazujących ekspresję IL-17 korelowała z liczbą komórek wykazujących ekspresję CD8 ($p=0,045$; $r=0,54$).

Wnioski: Obecność w zmianach chorobowych w przebiegu CLP różnorodnych populacji komórkowych może wskazywać na złożony patomechanizm rozwoju choroby. Nie można wykluczyć, że obecne w nacieku zapalnym komórki NK współuczestniczą razem z limfocytami T cytotoksycznymi w uszkodzeniu keratynocytów. Zwiększona liczba limfocytów B może z kolei świadczyć o współdziałaniu odpowiedzi immunologicznej typu humoralnego w rozwoju zmian chorobowych. Wysoka ekspresja IL-17 w zmianach chorobowych oraz podwyższone stężenie w surowicy pozwalają przypuszczać, że odgrywa ona istotną rolę w patogenezie CLP. Obserwacje te mogą stanowić przesłankę do wykorzystania w przyszłości w terapii uporczywych i przewlekających się postaci CLP przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko IL-17.

Abstract

Introduction: Lichen planus (LP) is a chronic inflammatory dermatosis that can affect skin, mucous membranes, hair and/or nails. Numerous clinical manifestations and variants of the disease have been described so far. Many patients suffer from severe pruritus, which may cause a significant reduction in quality of life. Despite intensive treatment, it is not possible for all patients to achieve remission of pruritus and lesions. Hence, there is a need to find new therapeutic options. A thorough understanding of the pathogenesis of LP could enable targeted therapy of the disease. The majority of reports available in the literature concern oral lichen planus (OLP), which is currently considered by many researchers to be a separate entity with different immunopathogenesis. Cutaneous lichen planus (CLP) is considered to be an immune-mediated disease resulting from a delayed hypersensitivity reaction. T lymphocytes are the dominant cell population in the inflammatory infiltrate in CLP. CD8⁺ cytotoxic cells are located predominantly in the vicinity of the basal layer. In contrast, CD4⁺ cells predominate in the lower part of the infiltration. Only single reports are available in the literature, in which the presence of the remaining immune cells was assessed. They indicate, that CD68⁺, CD56⁺, CD20⁺, Foxp3⁺ cells and mast cells are present in the infiltration, as well. However, the role of individual cell populations in the aetiopathogenesis of CLP remains undetermined. In addition, patients with CLP have increased serum levels or tissue expression of IL-1, IL-6, IL-9, IL-18, IL-23, TNF- α and IFN- γ . The role of IL-17 in the pathogenesis of OLP has been the subject of many studies so far. However, little is known about the serum concentration and tissue expression of IL-17 in patients with CLP.

Study design: The aim of the first part of the study was clinical characterization of patients with CLP, determination of serum concentration of IL-17 and finding a relationship between IL-17 levels and clinical features, including gender, age, duration of CLP, age at onset, presence and intensity of pruritus, the extent of skin involvement and the coexistence of nail or mucous membrane involvement. The aim of the second part of the study was the qualitative and quantitative assessment of the presence of immune cells and IL-17 expression in lesional skin.

Patients and methods: 52 adult patients with CLP, without co-existing inflammatory and autoimmune diseases, hospitalized in the Department of Dermatology, Venereology and Allergology in 2014-2017, were included in the first part of the study. The control group consisted of 27 healthy volunteers from the Regional Blood Donation and Blood Treatment Center in Wrocław, appropriately selected in terms of sex and age. Thorough medical history

was collected and physical examination was performed. The intensity of stress during one year before the exacerbation of CLP was assessed according to the SRRS questionnaire. Numerical rating scale (NRS) and a 4-point pruritus questionnaire were used to assess the severity of pruritus. 9ml venous blood was collected from patients with CLP and healthy volunteers. Serum IL-17 concentration was measured using Quantikine® HS ELISA kit (R & D Systems®, USA) Human IL-17. In the second part of the study, archival paraffin blocks from 14 patients with histologically confirmed diagnosis of LP were used. In addition, healthy skin samples from non-sun-exposed areas were collected from 11 healthy volunteers. The expression of cell markers (CD4, CD8, CD20, CD56, CD68, c-Kit, Foxp3) and IL-17 in the tissue samples was performed using immunohistochemical assays. The expression was evaluated using Zeiss Axio Imager A2 light microscope. Positively stained cells were counted in 10 fields of view for each preparation at 200x magnification and the mean value was calculated. The statistical analysis was carried out using the Statistica® software, version 12.0 (Statsoft Polska).

Results: The study group consisted of 52 patients with CLP (mean age 51.6 ± 15.55 years) - 22 men and 30 women. The control group consisted of 27 healthy volunteers (mean age 45.59 ± 10.15 years) - 15 men and 12 women. The mean BMI of patients with CLP was 26.96 ± 5.15 kg/m². 24 (46.15%) patients with CLP were smokers. The average age at which skin lesions started to appear was 48.5 ± 15.74 years. The duration of the disease in the study group was 3.15 ± 6.87 years. The duration of CLP exacerbation, which was the reason for hospitalization of the patient, was 8.29 ± 16.36 months. 45 (86.54%) patients complained of pruritus. The mean severity of pruritus was 5.25 ± 3.03 according to the NRS scale and 7.43 ± 4.66 points according to the 4-point pruritus evaluation questionnaire. The mean stress intensity according to the SRRS questionnaire was 178.84 ± 127.97 points. The body surface area involved with CLP lesions was $13.23 \pm 15.5\%$. Co-existence of oral mucosa or genital mucosa involvement was found in 28 (53.85%) and 4 (7.69%) patients respectively. The nails were altered in 14 (26.92%) patients, and hair involvement was observed in 2 (3.85%) cases. The dominant clinical form was the disseminated papular variant of CLP (96.15% of patients). Men with CLP significantly more often smoked cigarettes compared to women with CLP ($p = 0.03$). There was significantly more frequent co-existence of lesions on oral mucous membranes in men compared to the group of women ($p = 0.0088$). In the CLP group, significantly higher serum IL-17 concentration was found compared to the control group (0.218 ± 0.221 ng / ml versus 0.126 ± 0.058 ng / ml, $p = 0.025$). In men, higher levels of IL-17 in the serum were found in the absence of changes on the nail plates ($p = 0.04$). In women, there was a significant negative correlation between IL-17

concentration in the serum and duration of the disease ($p = 0.02$, $r = -0.41$). In tissue samples from patients with CLP ($n = 14$) significantly higher numbers of cells expressing CD4 ($p < 0.001$), CD8 ($p < 0.001$), CD68 ($p < 0.001$), Foxp3 ($p < 0.001$), CD56 ($p = 0.019$) and CD20 ($p < 0.001$) were found. There was no statistically significant difference in c-Kit expression in CLP and healthy skin. In addition, there were significantly more cells expressing IL-17 in diseased skin when compared to healthy skin ($p < 0.001$). The number of cells expressing IL-17 correlated with the number of CD8 expressing cells ($p = 0.045$, $r = 0.54$).

Conclusions: The presence of various cell populations in CLP lesions may indicate a complex pathomechanism of disease development. It cannot be ruled out that the NK cells present in inflammatory infiltration participate together with cytotoxic T lymphocytes in keratinocyte damage. Increased number of B lymphocytes in the inflammatory infiltration may in turn indicate the involvement of humoral response in the development of lesions. High expression of IL-17 in lesional skin and increased serum concentration suggest that it plays an important role in the pathogenesis of CLP. These observations may be a reason for future use in the therapy of persistent and chronic forms of CLP monoclonal antibodies directed against IL-17.