

Novi molekularni pristup utemeljen na dokazima za dijagnozu i liječenje učestalih kožnih bolesti posredovanih imunološkim sustavom

Vera Plužarić^{1,2}, Stana Tokić², Mihalj Martina^{1,3}, Marija Šola¹, Maja Tolušić Levak^{1,4}, Ivana Krajina^{1,3}, Mario Štefanić⁵, Maja Jirouš⁶

¹ Zavod za dermatologiju i venerologiju, Klinički bolnički centar Osijek, Ul. J. Huttlera 4, 31 000 Osijek, Hrvatska

² Katedra za laboratorijsku medicinu i farmaciju, Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Ul. J. Huttlera 4, 31 000 Osijek, Hrvatska

³ Katedra za fiziologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Ul. J. Huttlera 4, 31 000 Osijek, Hrvatska

⁴ Katedra za histologiju i embriologiju, Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Ul. J. Huttlera 4, 31 000 Osijek, Hrvatska

⁵ Katedra za nuklearnu medicinu i onkologiju, Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Ul. J. Huttlera 4, 31 000 Osijek, Hrvatska

⁶ Katedra za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju, Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Ul. J. Huttlera 4, 31 000 Osijek, Hrvatska

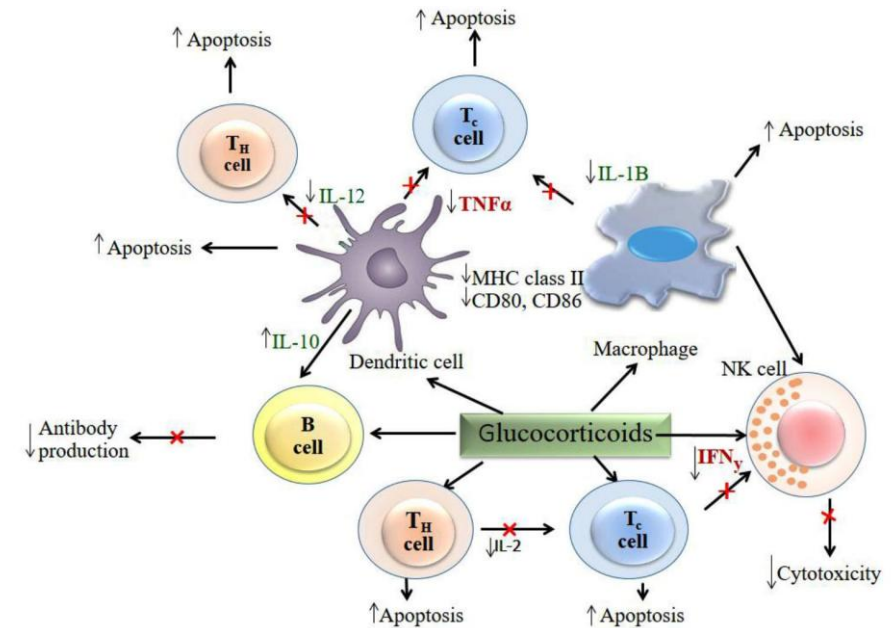
- imunoški posredovane bolesti zahvaćaju 3% Svjetske populacije te predstavljaju veliki javnozdravstveni problem
- najčešće imunološki posredovane bolesti kože su psorijaza i atopijski dermatitis, tu ubrajamo i bulozne dermatoze i alopeciju areatu



- zahvaljujući brojnim studijama, in vitro eksperimentima, studijama na životinjskim modelima te kliničkim ispitivanjama, došlo je do impresivnog napretka u razumijevanju imunoloških mehanizama u podlozi autoimunih te imunološki posredovanih bolesti kože



- rezultat je promjena paradigme od nespecifičnog „utišavanja“ aktivnosti imunološkog sustava glukokortikoidima i tradicionalnim imunosupresivima do selektivnih, ciljanih imunoterapija kao što su monoklonska antitijela usmjerena na patogene citokine i njihove receptore te inhibitore malih molekula citokinske signalizacije



Patogeneza i imuno **psoriasis vulgaris** – trenutni koncept



Okidač?

Genetska podložnost, epigenetički čimbenici, narušena kožna barijera i nekontrolirani imuni odgovor



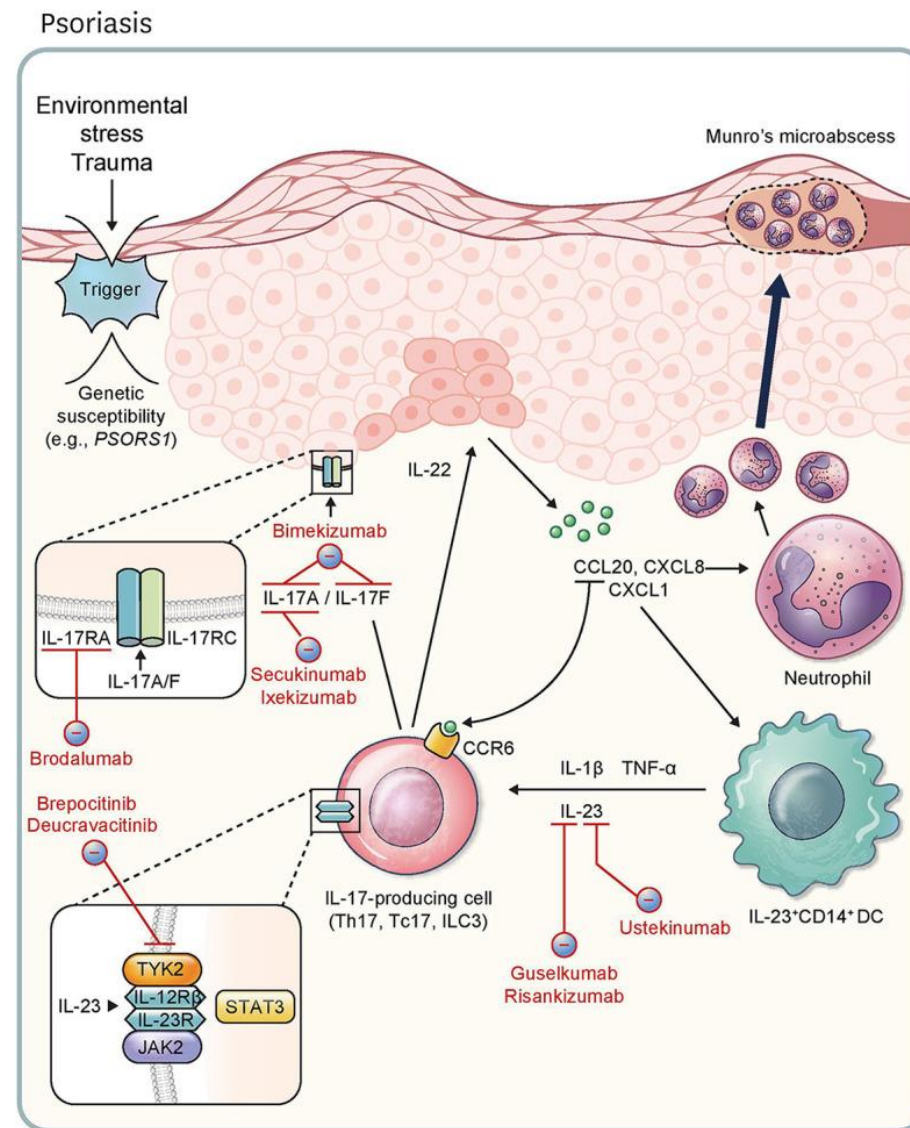
Upalna kaskada strukturirana od strane urođenih imunoloških stanicama i nekonvencionalnih T limfocita



Upalni citokini uzrokuju proliferaciju keratinocita (IL 22), angiogenezu te produkciju kemokina



Daljnjoj eskalaciji upale pridonose i imunološke stanice stečenog imunološkog sustava



Patogeneza i imunoatopijskog deramtitisa— trenutni koncept



Okidač?

Genetska podložnost, epigenetički čimbenici, narušena kožna barijera, abnormalnost mikrobioma i nekontrolirani imuni odgovor



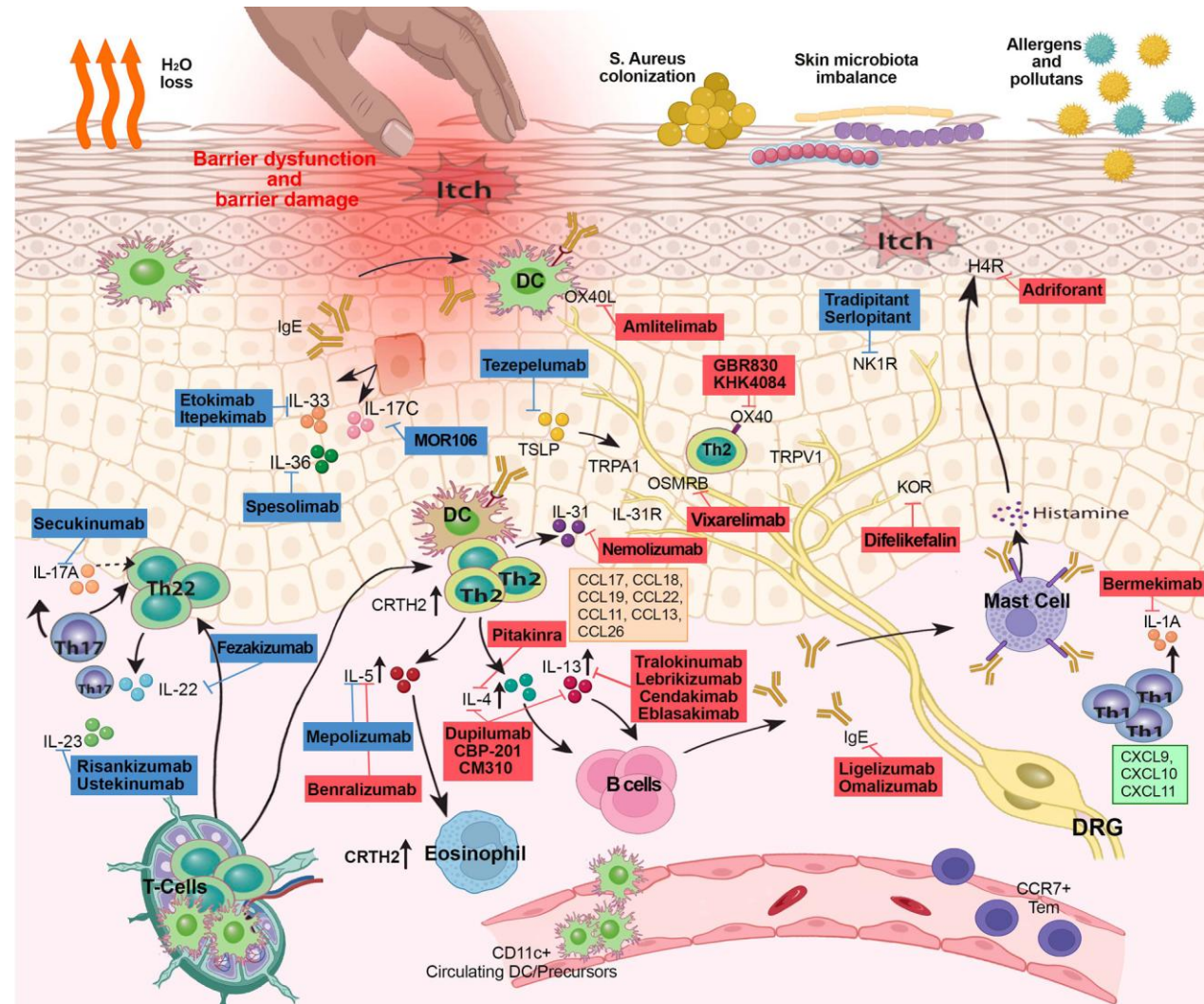
Smanjena ekspresija filagrina i lorikrina, smanjenje lipidnog sloja i povećan transdermalni gubitak tekućine



Upalna kaskada strukturirana od strane urođenih, stečenih imunoloških stanicama i nekonvencionalnih T limfocita. Povećanje broja bakterija roda *Staphylococcus*, osobito *S. aureus*



Upalni citokini Th2 osi (IL-4, IL-5, IL-13, CCL17, CCL18 i CCL22) M TH22 (IL.22); Th1 i Th17 ovisno o endotipu



Facheris, P., Jeffery, J., Del Duca, E. *et al.* The translational revolution in atopic dermatitis: the paradigm shift from pathogenesis to treatment. *Cell Mol Immunol* 20, 448–474 (2023).

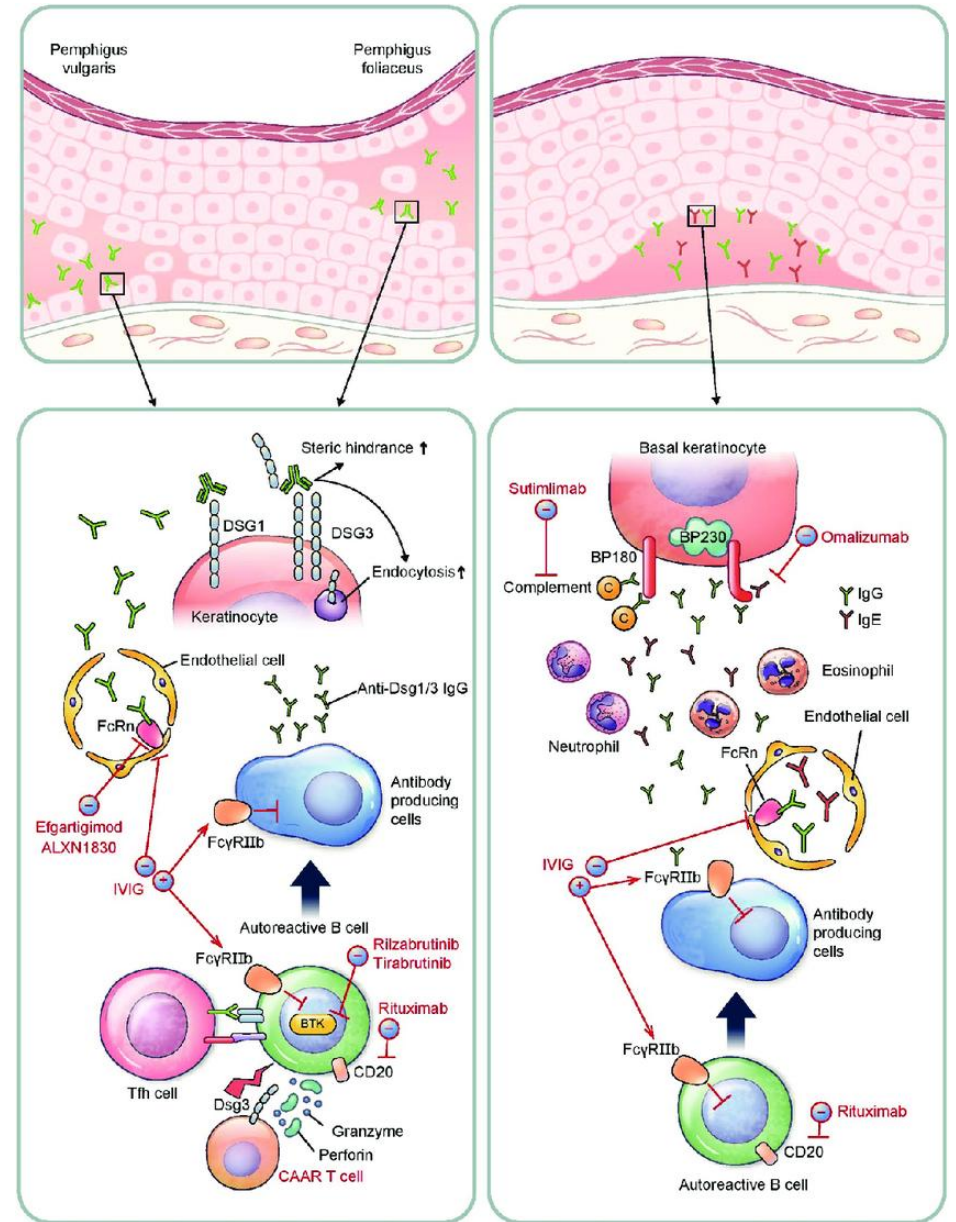
Patogeneza buloznih deramtoza – trenutni koncept

PEMPHIGUS

Th2 i Tfh stanice aktiviraju autoreaktivne B stanice proizvode anti-Dsg1/3 at. Autoantitijela cirkuliraju kroz žile i premještaju se u epidermalni međustanični prostor. FcRn izražen na endotelnim stanicama produljuje poluvrijeme života IgG autoantitijela.

PEMPHIGOID

autoreaktivne B-stanice proizvode anti-BP180/BP230 at koja migriraju u dermo-epidermalni spoj. Autoantitijela IgG i IgE protiv BP180 potiču aktivaciju komplementa što dovodi do infiltracije granulocita kao što su neutrofili i eozinofili u dermis. Oslobođanje različitih proteaza igra važnu ulogu u stvaranju rascjepa i formiranju bula.

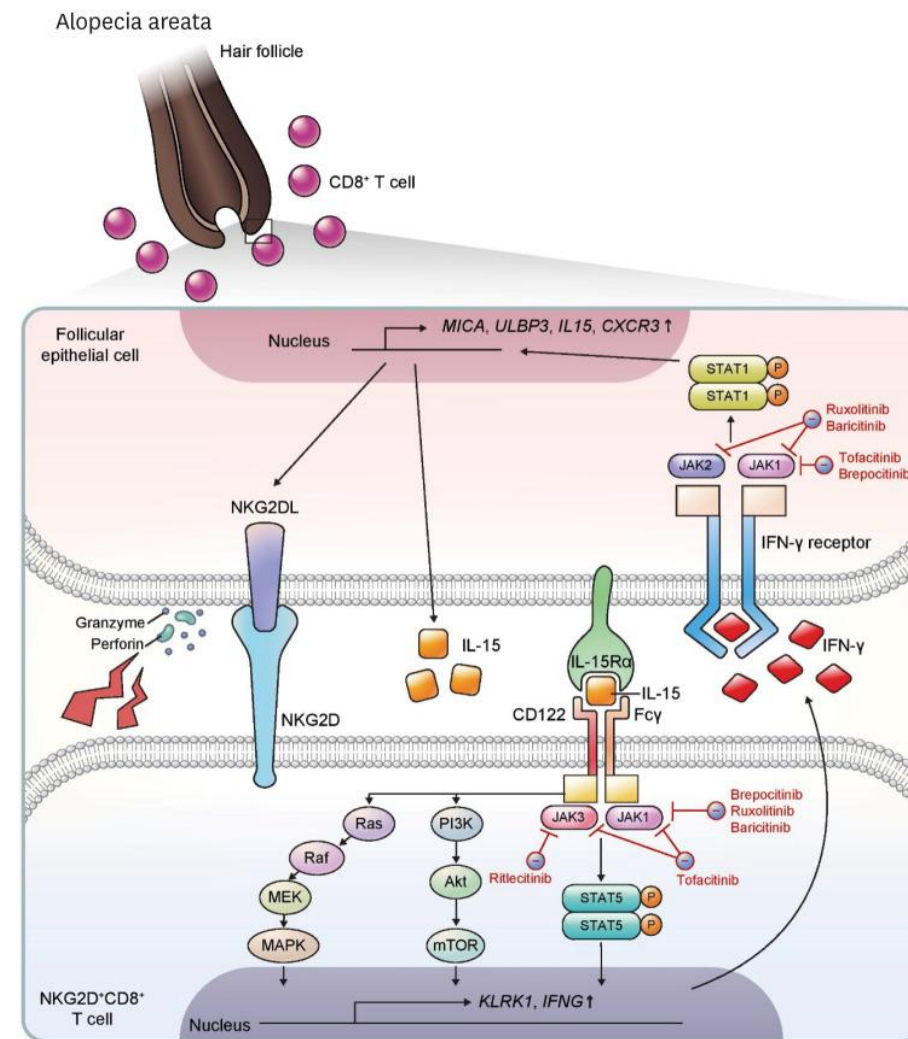


Song, Ahreum & Lee, Sangeun & Kim, Jong. (2022). Immunopathology and Immunotherapy of Inflammatory Skin Diseases. *Immune Network*. 22. 10.4110/in.2022.22.e7.

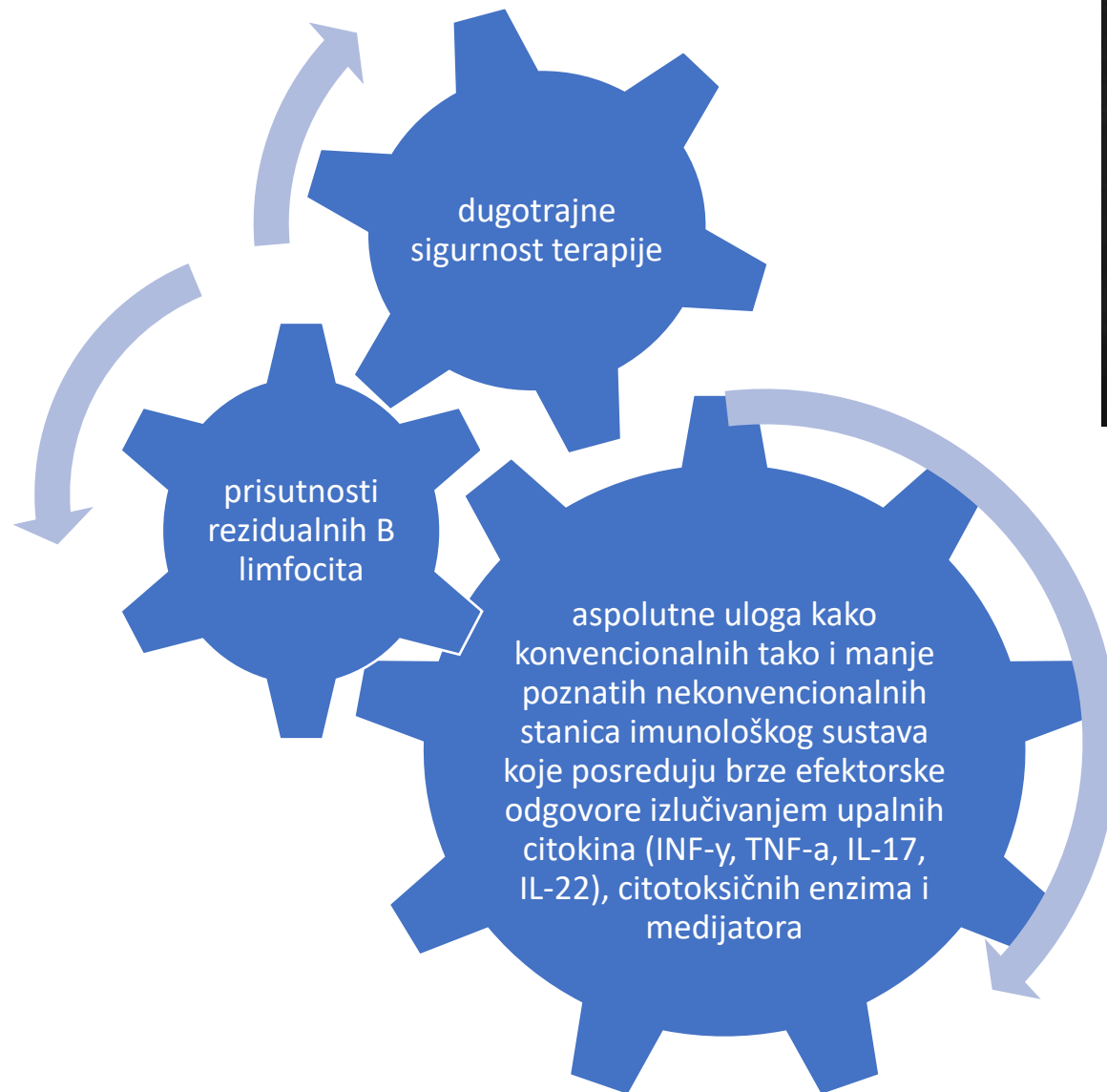
Cioffi C, Sernicola A, Alaibac M. Role of Rituximab in the Treatment of Pemphigus Vulgaris: Patient Selection and Acceptability. *Patient Prefer Adherence*. 2022 Nov 7;16:3035-3043.

Patogeneza alopecia areata– trenutni koncept

- NKG2D + CD8+ T stanice infiltriraju dermis i premještaju u bulbus folikula dlake. **IL-15** je važan citokin za patogenezu ove bolesti aktivacijom i proliferacijom NKG2D + CD8+ T stanica. Kompleks receptora IL-15 sastoji se od IL-15R α izraženog na folikularnim epitelnim stanicama i CD122 i Fc γ na T stanicama, a transaktivira CD8+ T stanice kroz više putova, uključujući Ras-Raf-MEK-MAPK, PI3K-Akt-mTOR i JAK1/3-STAT5 signalizaciju.
- ovi putevi pojačavaju ekspresiju KLRK1, kodiranje NKG2D i IFNG. IFN- γ veže se na IFN- γ receptor na folikularnim epitelnim stanicama i pokreće JAK1/2-STAT1 signalizaciju, čime se umanjuje ekspresija MICA, ULBP3, IL15 i CXCR3



Nažalost i dalje ostaju mnoge nepoznanice....



!

pronalaženje **adekvatnog tkivno specifičnog biomarkera** koji će omogućiti predviđanje početka bolesti u genetički predisponiranih i nepreisponiranih osoba, razvoja, tijeka te praćenja učinkovitosti terapije kako imunološki posredovanih bolesti tako i pridruženih komorbiditeta.

Uvid u podležće mehanizme i pomoć u izboru postojećih terapijskih opcija kao i razvoj novih.

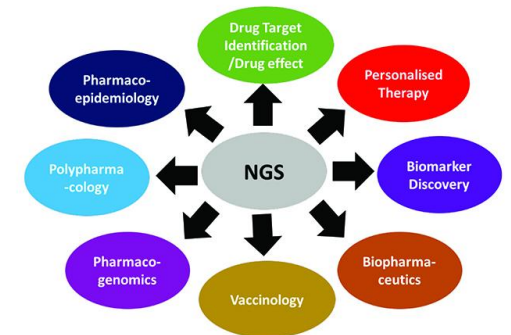
višeparametrijska
protočna citometrija

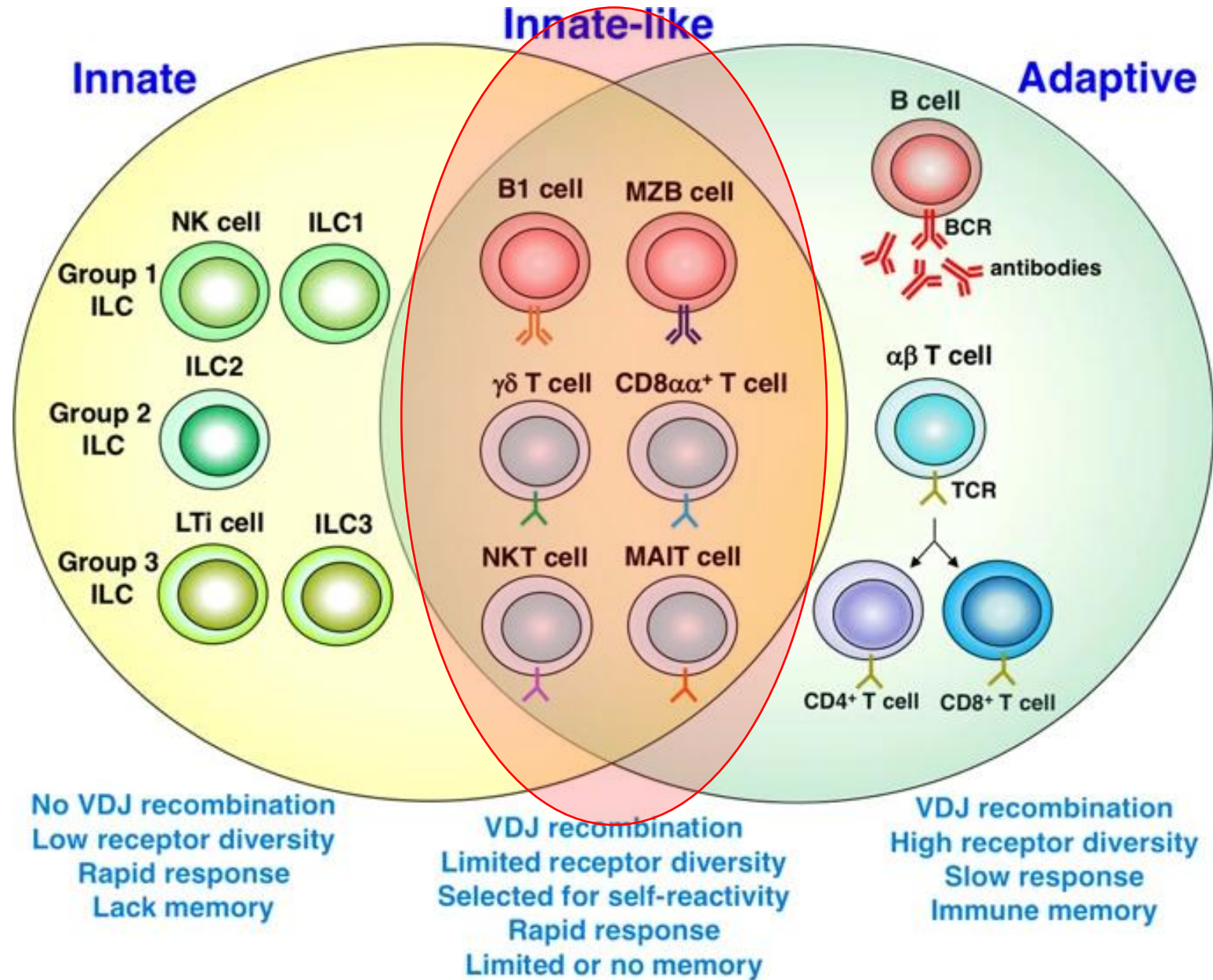
sortiranje specifično
obilježenih limfocita

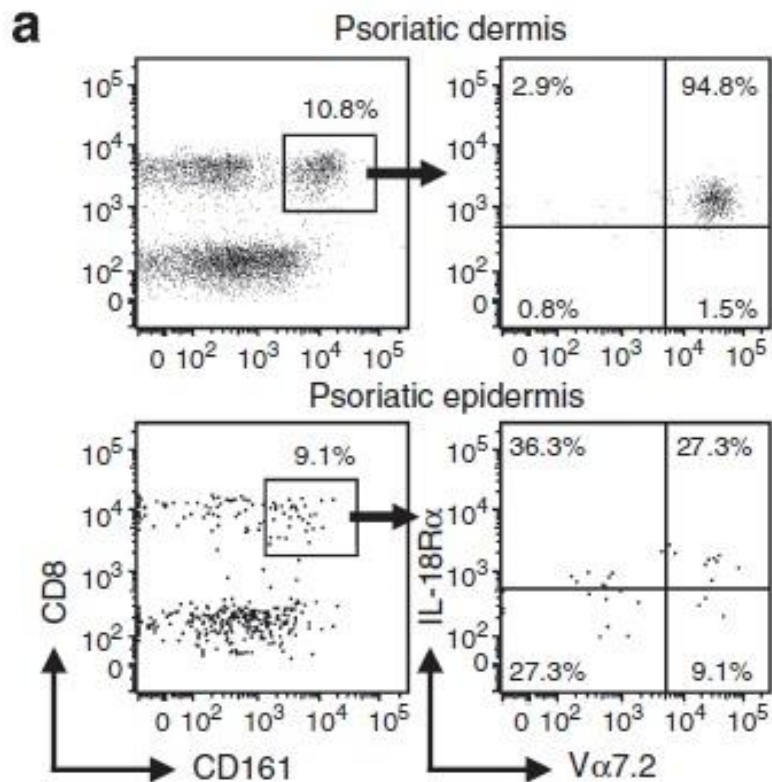
uporaba qRT-PCR u
svrhu analize
transkripcijskih profila
sortiranih perifernih i
tkivnih stanica

imunohistokemija

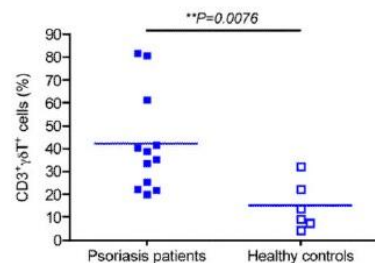
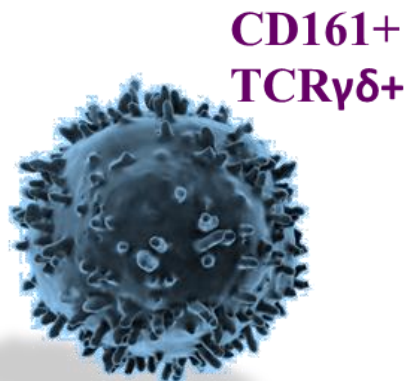
sekvenciranje sljedeće
generacije



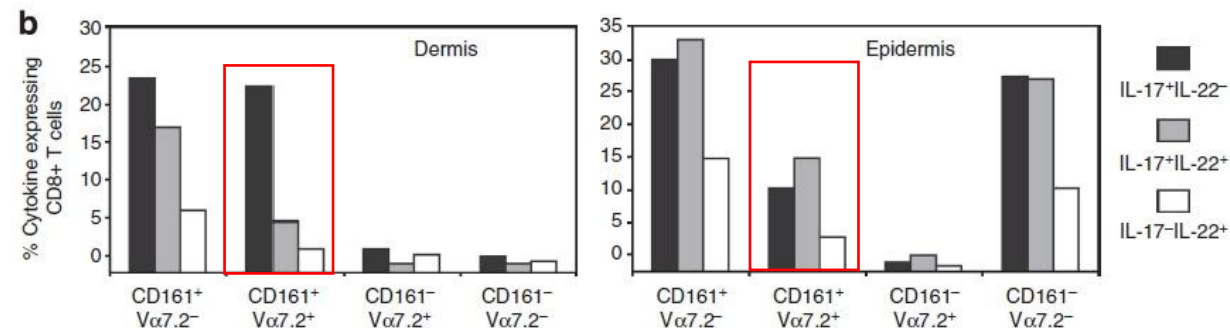




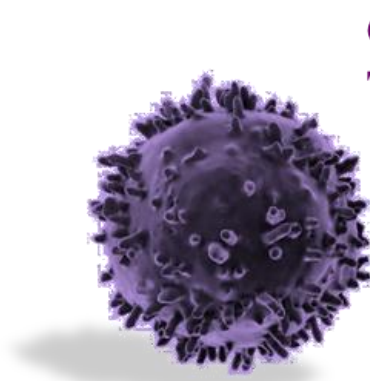
Teunissen MBM. *J Invest Dermatol.* 2014; 134(12):2898-2907



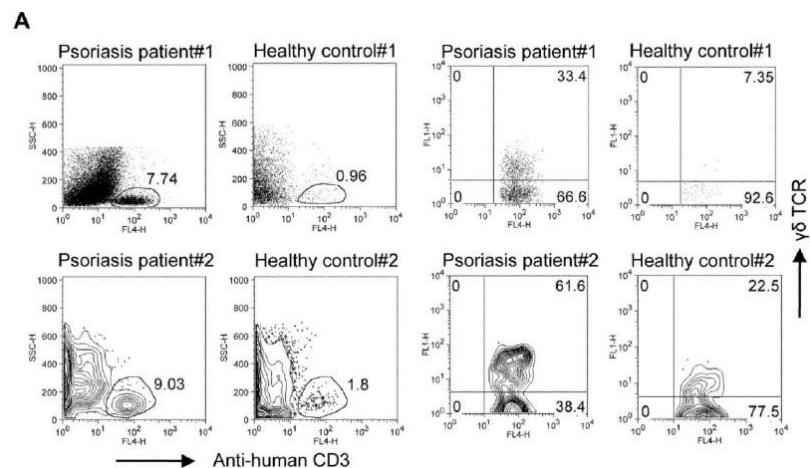
Cai Y. *Immunity.* 2011; 28;35(4):596-610



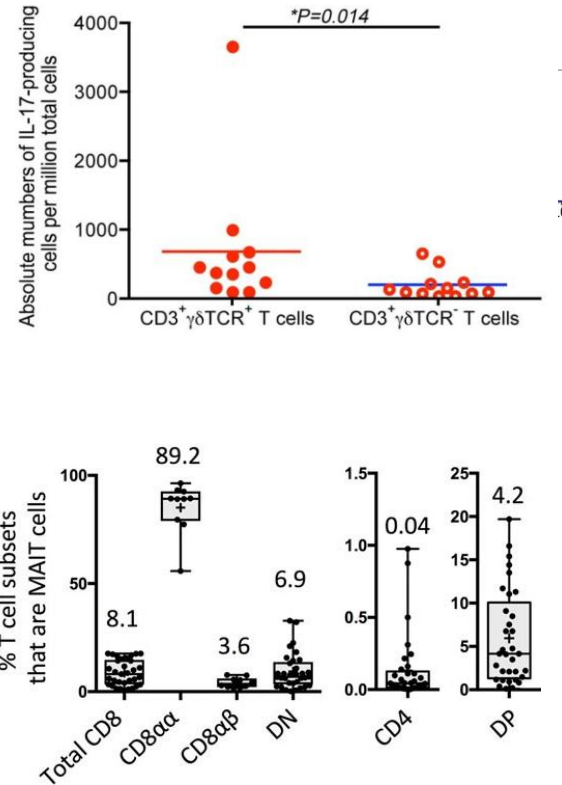
Teunissen MBM. *J Invest Dermatol.* 2014; 134(12):2898-2907



**Centralna uloga
prirodnih
limfoidnih linija u
psorijazi**



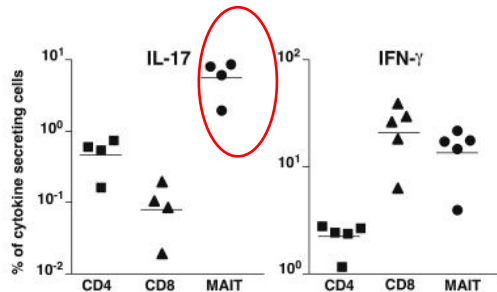
CD161++
TCRV α 7.2+
IL-18R α +
MR1-5-OP-RU+



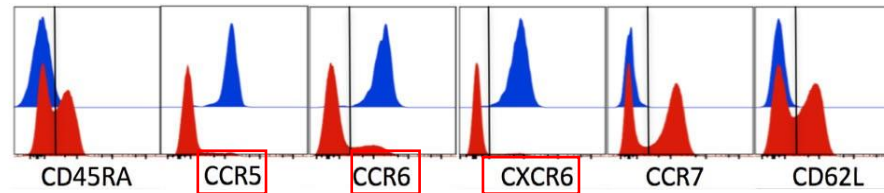
Gherardin NA. Et al. Immunol Cell Biol. 2018; 96(5):507-525.

MAIT stanice

- od engl. *mucosa-associated invariant T cells*
- ponajviše prisutne u jetri, perifernoj krvi, sluznicama probavnog i genitalnog sustava, plućima, masnom tkivu
- čine do 1-10% ukupne populacije perifernih limfocita T i gotovo 90% svih CD8⁺IL-17⁺ T limfocita u krvi
- izražavaju transkripcijske čimbenike i kemokinske receptore odgovorne za stalnu infiltraciju upalnih područja
- Izlučuju upalne citokine (IL-17, IL-22, INF- γ) i topljive upalne medijatore poput perforina i granzima
- **BROJNOST, FENOTIP I FUNKCIJA U KRV I KOŽI – NEPOZNATI!**

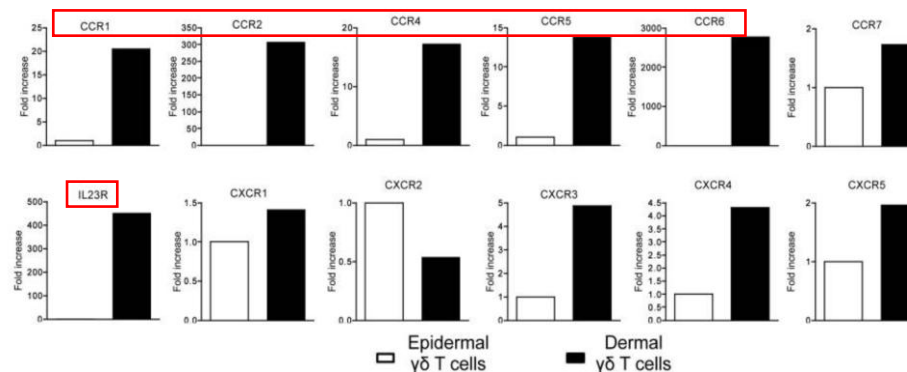
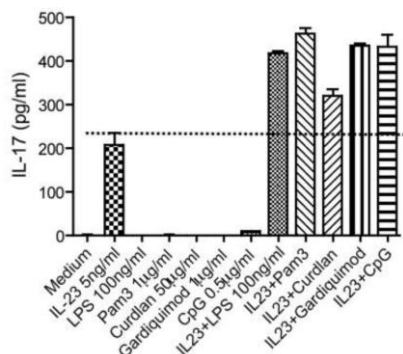
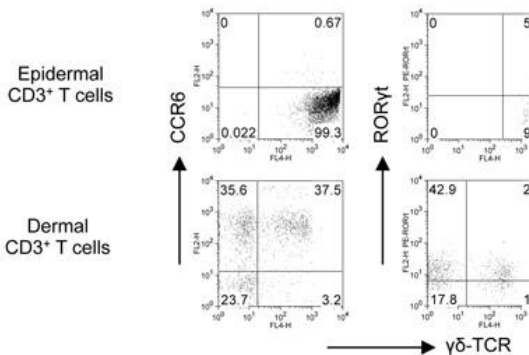
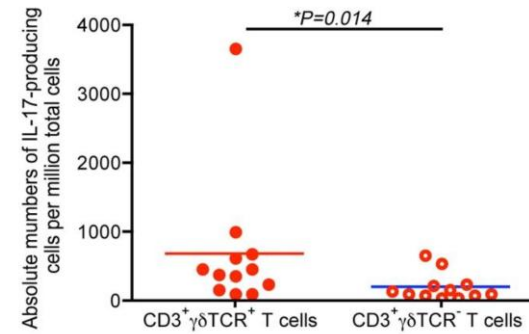


Dusseaux M. et al. Blood. 2011;117(4):1250-9

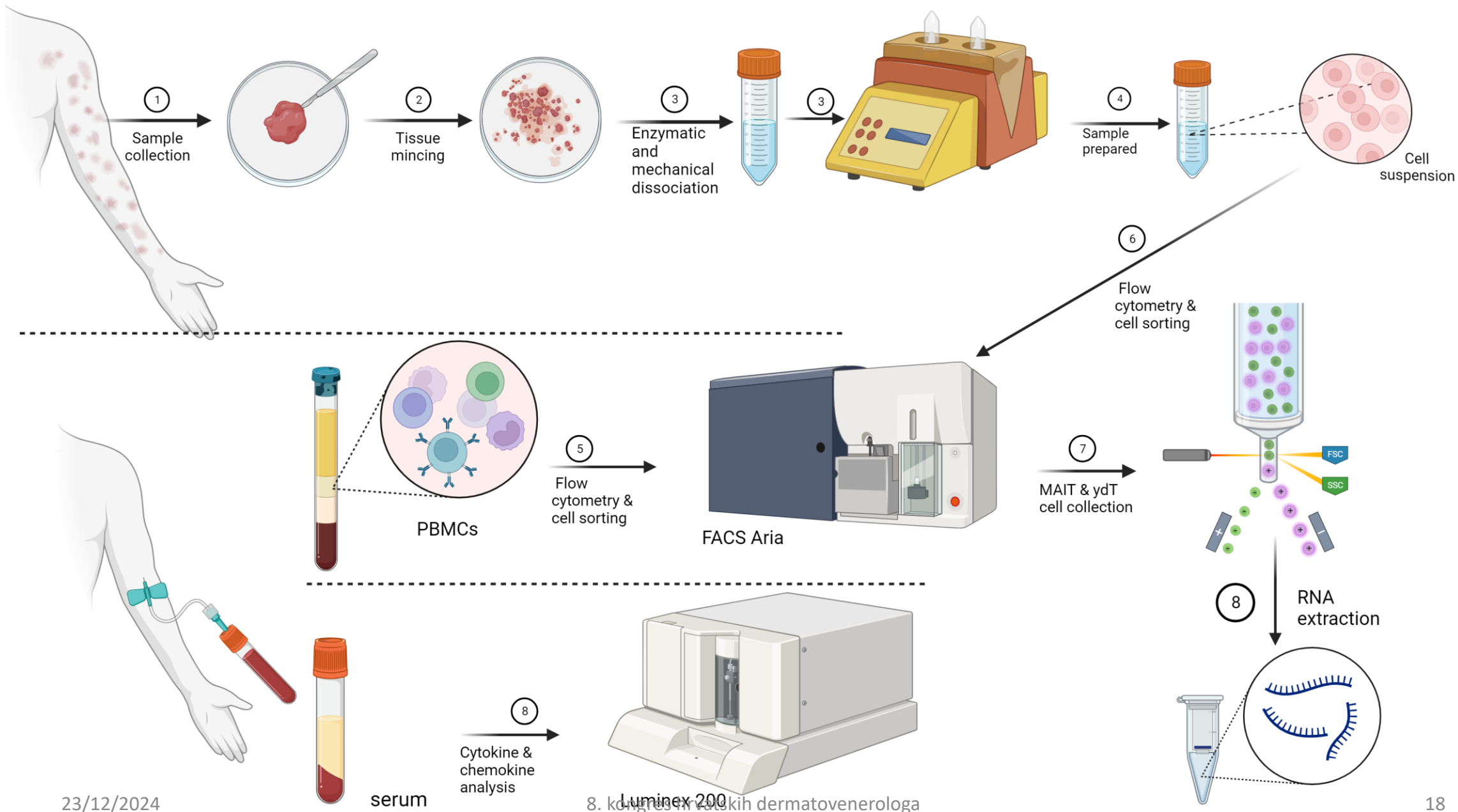


$\gamma\delta$ T stanice

- u čovjeka pronalazimo TRI osnovne subpopulacije $\gamma\delta$ T stanica:
 - V δ 1 - prisutne u tkivima i timusu
 - V δ 2 - čine većinu krvne $\gamma\delta$ T populacije
 - V δ 3 – poglavito u epitelnim regijama
- dermalne $\gamma\delta$ T stanice čine glavninu IL-17⁺ limfocita u koži oboljelih
- dijele dio razvojnog i transkripcijskog programa s MAIT stanicama
- prepoznaju široki spektar nepeptidnih mikrobnih antigena, te posreduju izravne citotoksične učinke
- **UDJELI I MIGRACIJSKI OBRASCI U KRVI I KOŽI – NERAZJAŠNjeni!**



Kako se periferni i tkivni udjeli MAIT i $\gamma\delta$ T limfocita mijenjaju u psorijazi?



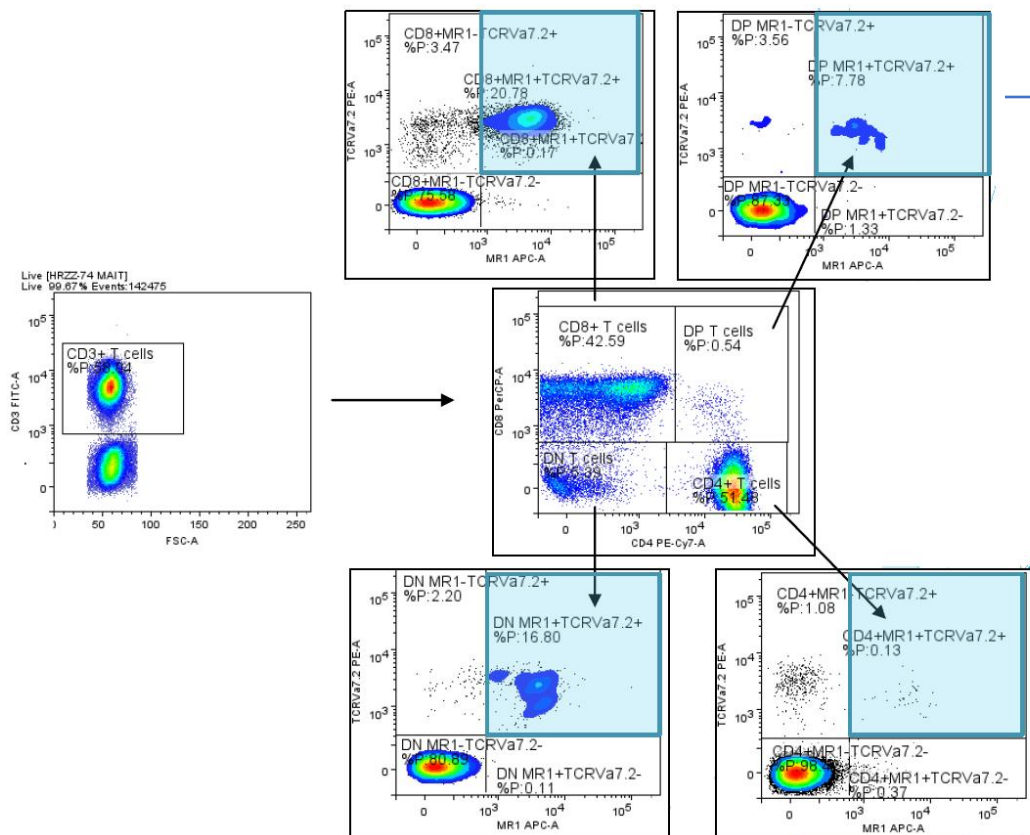


MAIT stanice – frekvencija u krvi oboljelih od PV?

Differential Skewing of Circulating MR1-Restricted and $\gamma\delta$ T Cells in Human Psoriasis Vulgaris

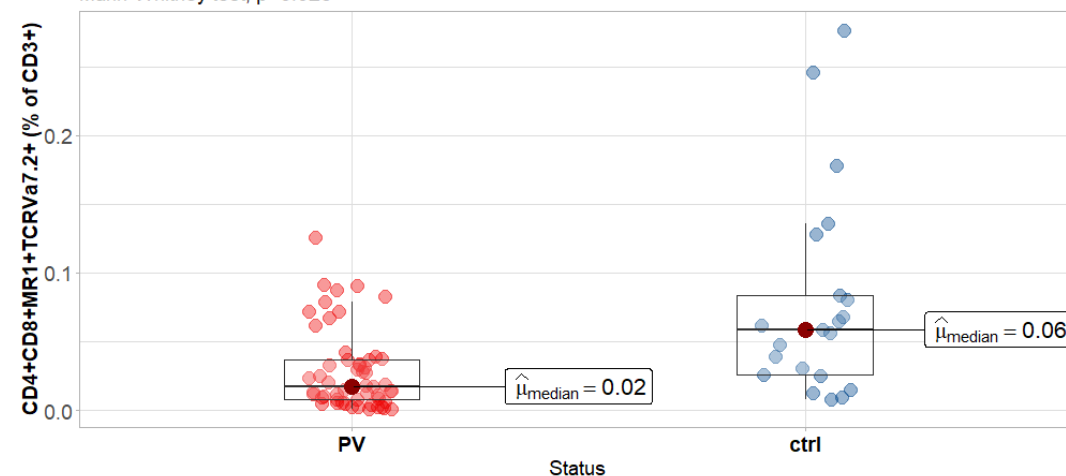
Vera Plužarić^{1,2†}, Mario Štefanić^{3†}, Martina Mihalj^{2,4}, Maja Tolušić Levak^{2,5}, Ivanka Muršić², Ljubica Glavaš-Obrovac¹, Martin Petrek⁶, Peter Balogh⁷ and Stana Tokić^{1*}

OPEN ACCESS



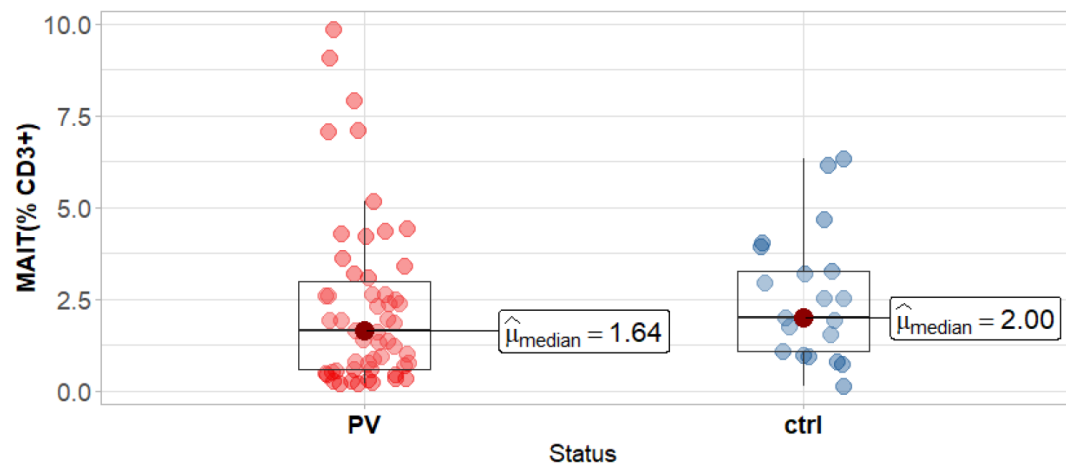
CD4+CD8+MR1+TCR Va7.2+ MAIT cells frequencies in the blood

Mann-Whitney test; $p=0.025$



Peripheral MAIT frequencies

$W_{\text{Mann-Whitney}} = 674.00$, $p = 0.21$, $\hat{r}_{\text{biserial}}^{\text{rank}} = 0.19$, $CI_{95\%} [-0.10, 0.45]$, $n_{\text{obs}} = 75$



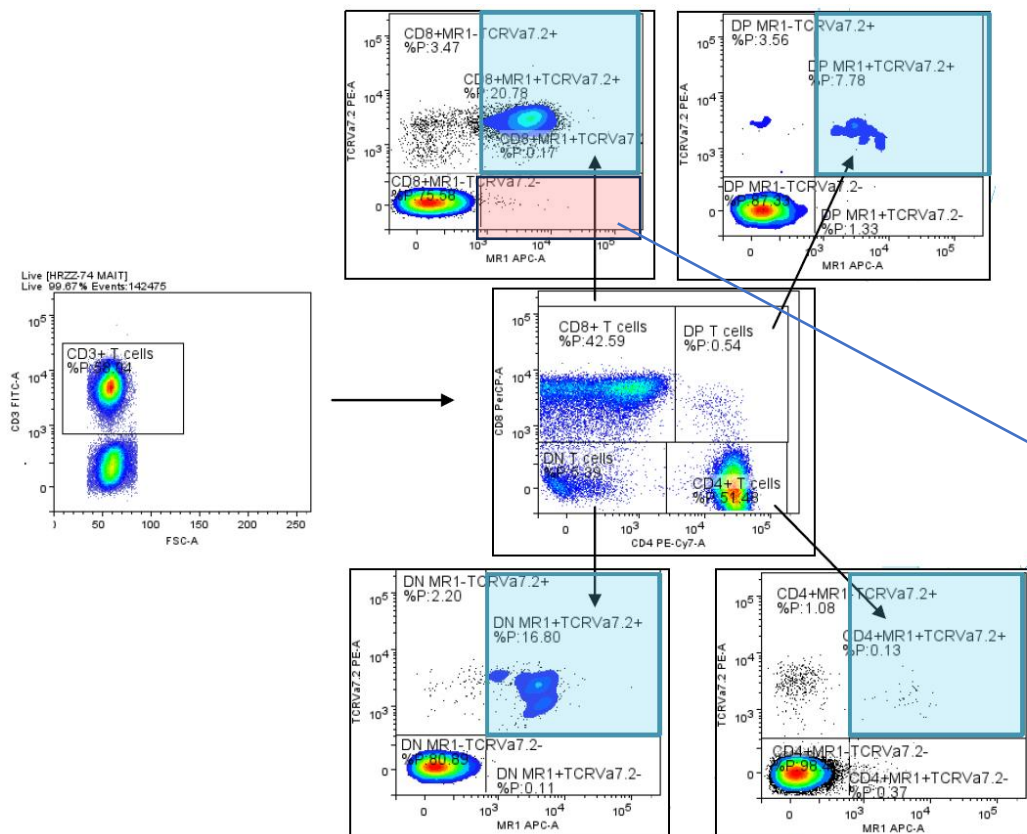


MAIT stanice – frekvencije u koži oboljelih od PV?

Differential Skewing of Circulating MR1-Restricted and $\gamma\delta$ T Cells in Human Psoriasis Vulgaris

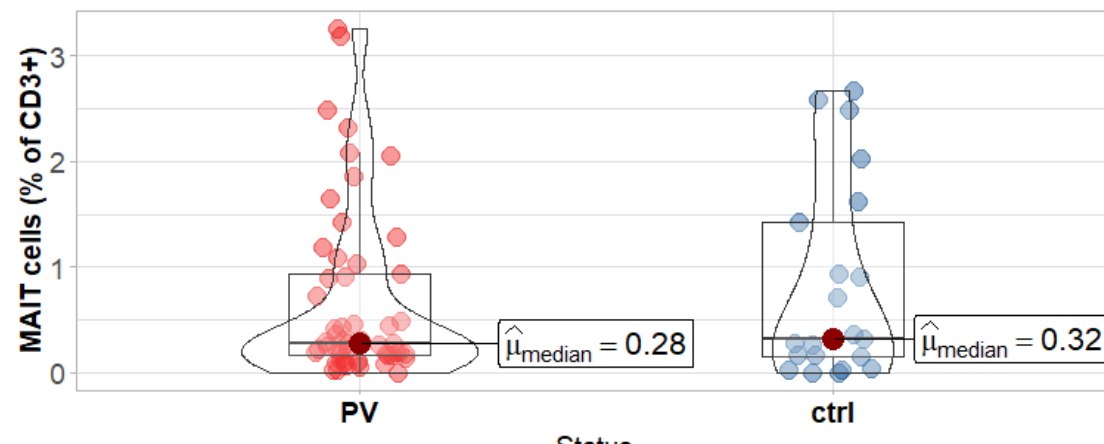
Vera Plužarić^{1,2†}, Mario Štefanić^{3†}, Martina Mihalj^{2,4}, Maja Tolušić Levak^{2,5}, Ivanka Muršić², Ljubica Glavaš-Obrovac¹, Martin Petrek⁶, Peter Balogh⁷ and Stana Tokić^{1*}

OPEN ACCESS



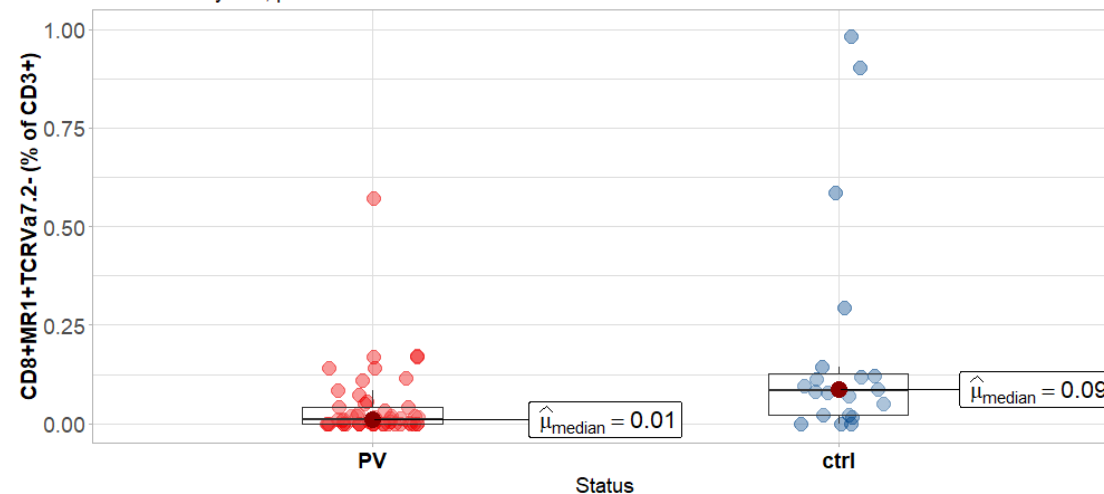
MAIT cells frequencies in the skin of PV patients and healthy controls

$W_{\text{Mann-Whitney}} = 574.50$, $p = 0.93$, $\hat{r}_{\text{rank biserial}}^{\text{rank}} = 0.01$, $CI_{95\%} [-0.27, 0.30]$, $n_{\text{obs}} = 75$



CD8+MR1+TCRVa7.2- atypical MAIT cells frequencies in the skin

Mann-Whitney test; $p = 0.001$

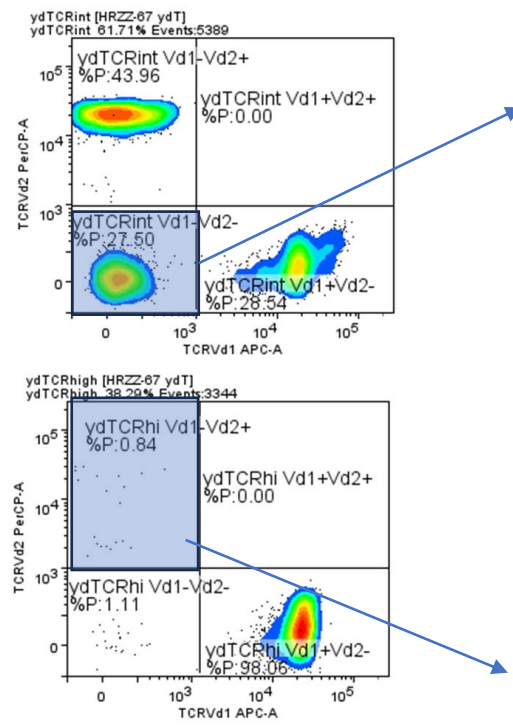
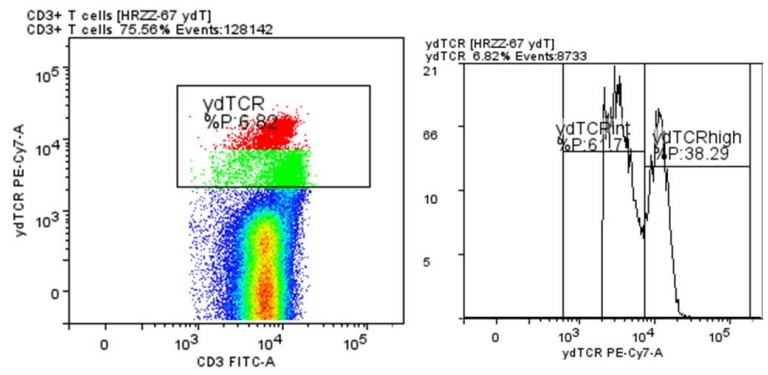




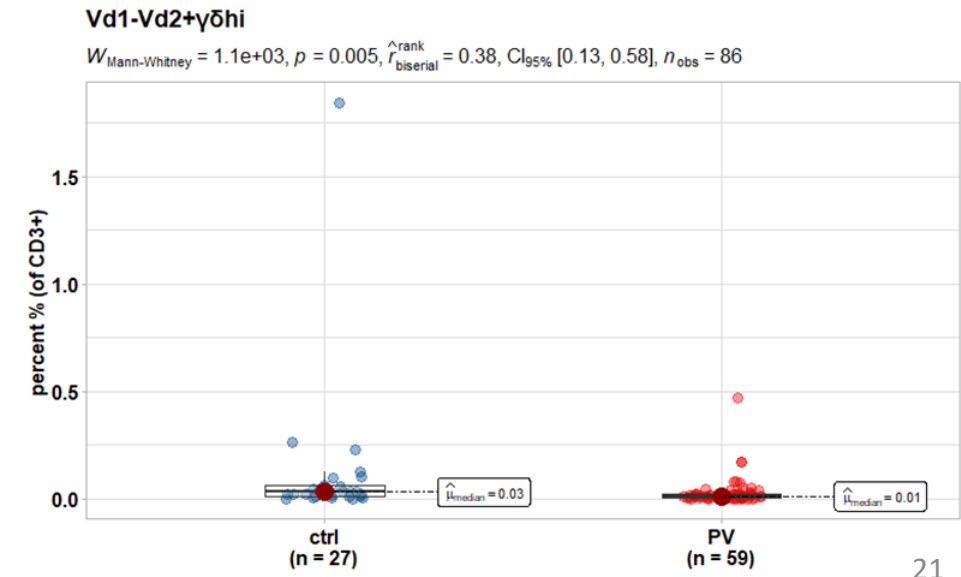
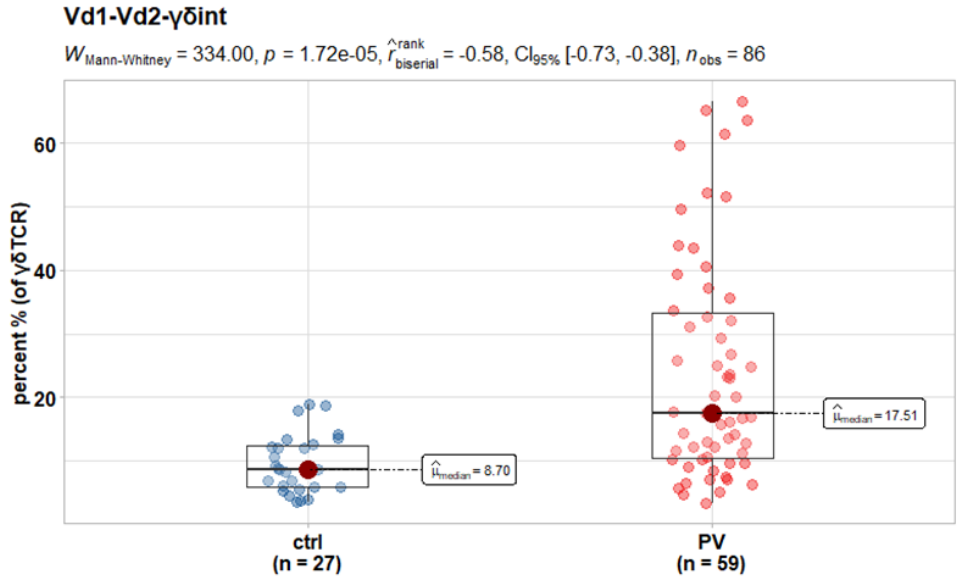
Differential Skewing of Circulating MR1-Restricted and $\gamma\delta$ T Cells in Human Psoriasis Vulgaris

Vera Plužarić^{1,2†}, Mario Štefanić^{3††}, Martina Mihalj^{2,4}, Maja Tolušić Levak^{2,5}, Ivanka Muršić², Ljubica Glavaš-Obrovac¹, Martin Petrek⁶, Peter Balogh⁷ and Stana Tokić^{1*}

OPEN ACCESS



$\gamma\delta$ T cells – frekvencije u krvi oboljelih od PV?



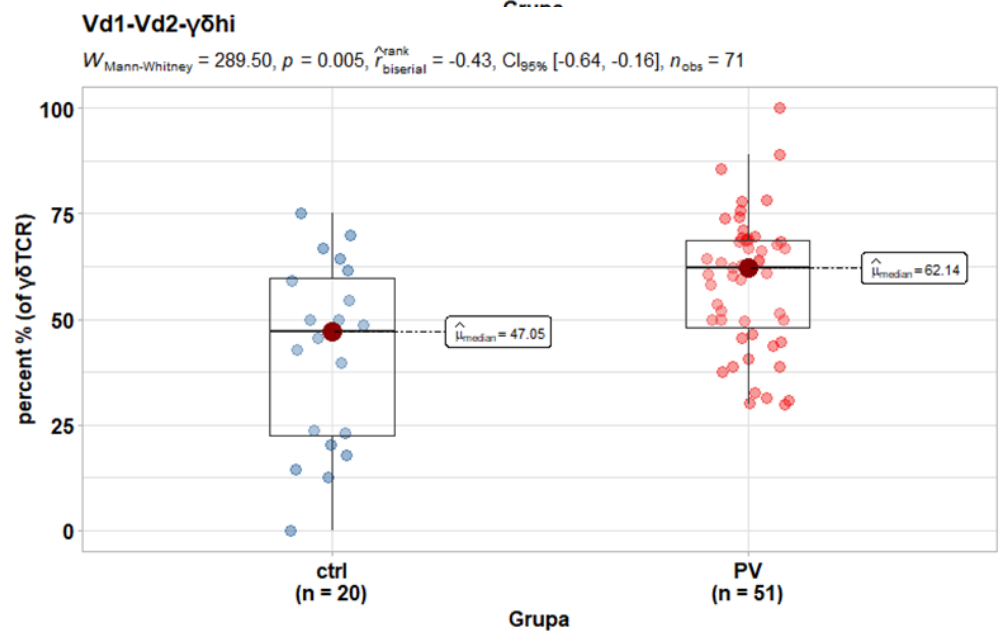
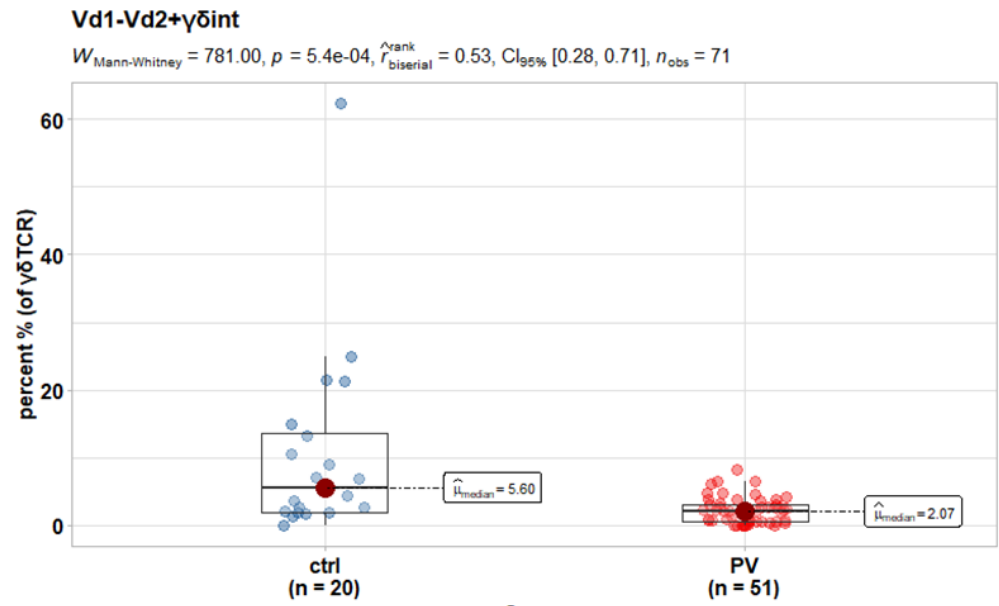
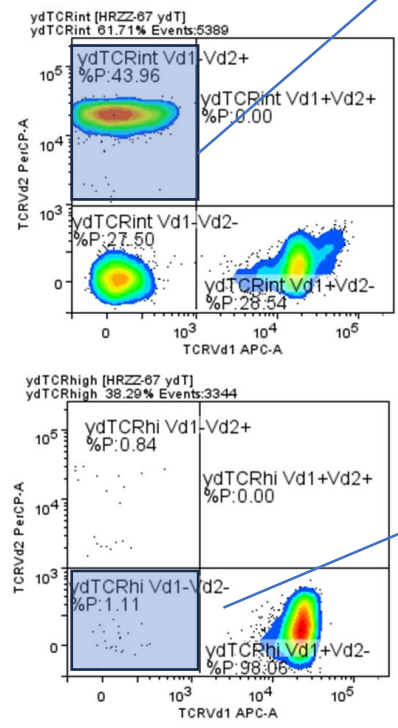
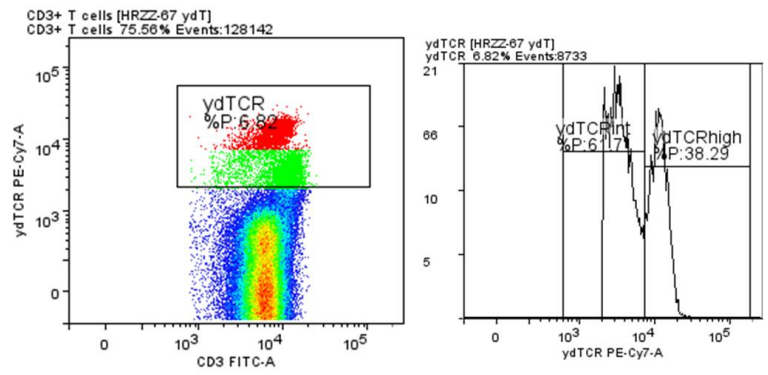


$\gamma\delta$ T cells – frekvencije u koži oboljelih od PV?

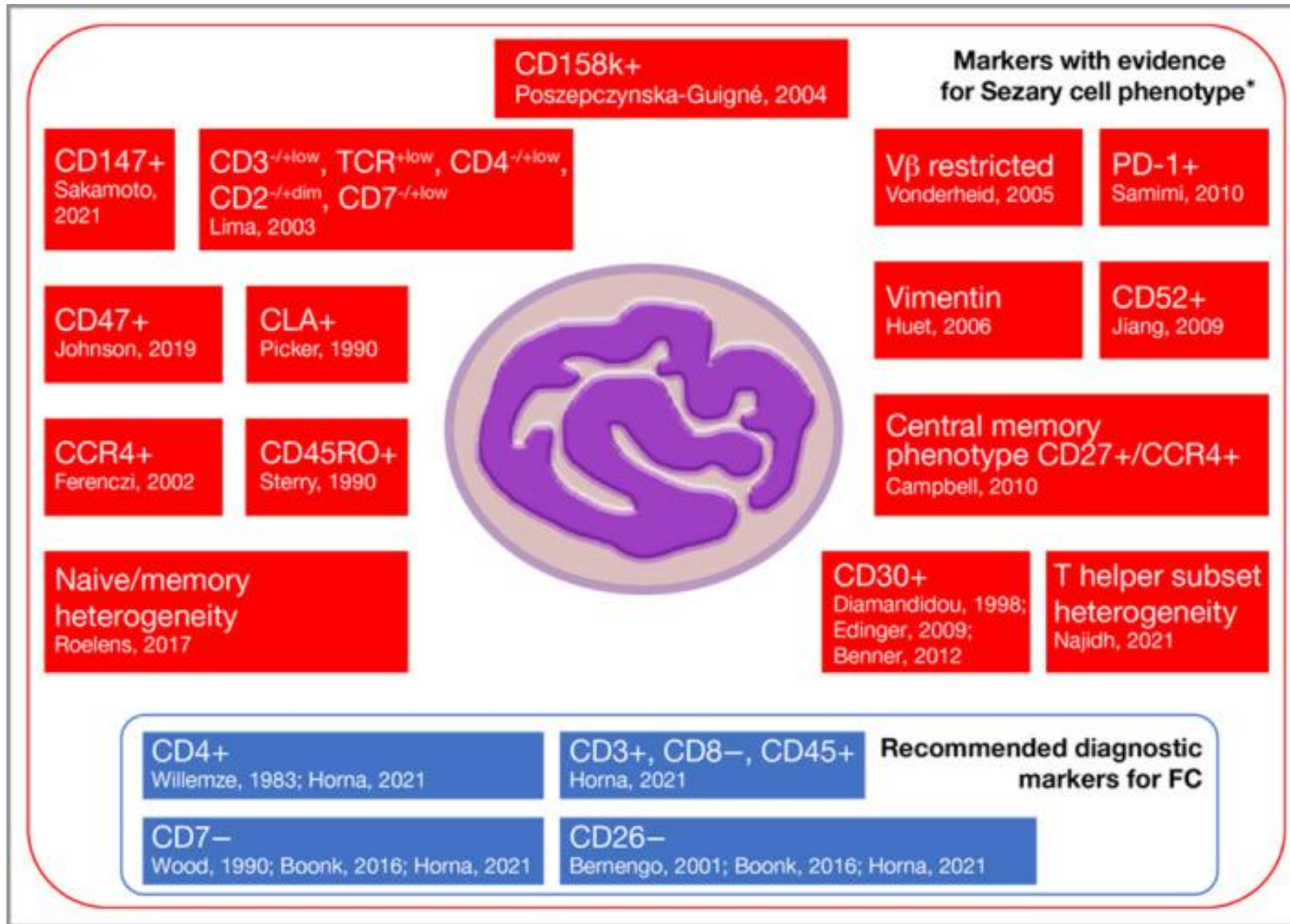
Differential Skewing of Circulating MR1-Restricted and $\gamma\delta$ T Cells in Human Psoriasis Vulgaris

Vera Plužarić^{1,2†}, Mario Štefanić^{3,4†}, Martina Mihalj^{2,4}, Maja Tolušić Levak^{2,5}, Ivanka Muršić², Ljubica Glavaš-Obrovac¹, Martin Petrek⁶, Peter Balogh⁷ and Stana Tokić^{1*}

OPEN ACCESS

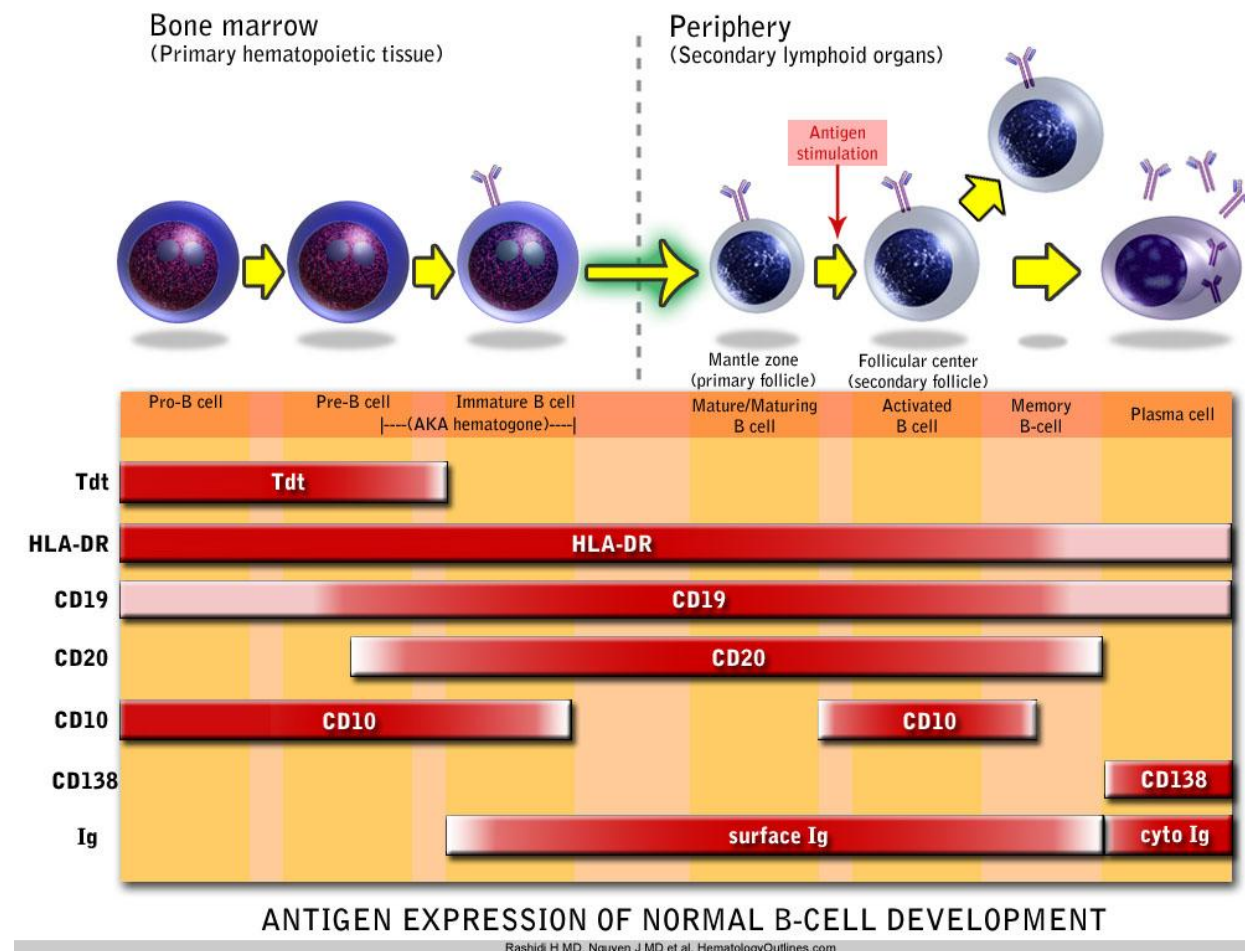


KLINIČKA PRAKSA



Vermeer MH, Moins-Teisserenc H, Bagot M, Quaglino P, Whittaker S. Flow cytometry for the assessment of blood tumour burden in cutaneous T-cell lymphoma: towards a standardized approach. Br J Dermatol. 2022 Jul;187(1):21-28. doi: 10.1111/bjd.21053. Epub 2022 May 3. PMID: 35157307; PMCID: PMC9541328.

- FC se koristiti za **praćenje iscrpljivanja B-stanica tijekom terapije rituximabom** procjenom postotka i apsolutnog broja CD19⁺ B-stanica i/ili CD20⁺ B-stanica, ali ne postoje posebne smjernice koji su markeri potrebni
- FC obično uključuje **CD19, CD20 i druge T/NK markere** kako bi se procjenile B-stanice od interesa. Postoci i apsolutni brojevi CD19, CD20 i drugih uključeni su u izvješće
- FC B limfocita je korisno za **razlikovanje osoba kod koji nastup klinički odgovor na primjenu rituximabom od onih kod kojih isti nije postignut**



Rituximab- FDA https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/103705s5299lbl.pdf

Trouvin AP, et al. Usefulness of monitoring of B cell depletion in rituximab-treated rheumatoid arthritis patients in order to predict clinical relapse: a prospective observational study. Clin Exp Immunol 2015, 180:11-8.

3Jilani I, et al. Transient down-modulation of CD20 by rituximab in patients with chronic lymphocytic leukemia. Blood 2003, 102:3514-20.

Pescovitz MD. Rituximab, an anti-cd20 monoclonal antibody: history and mechanism of action. Am J Transplant. 2006;6(5 Pt 1):859-866.

http://hematologyoutlines.com/atlas_topics/150.html

Table 1 Panel of biomarkers for monitoring rituximab effect

Cytofluorimetric markers	Monitoring rituximab therapy
CD38 ⁺⁺ CD24 ⁺⁺ IgD ^{+/-} immature B cells	- Rapid depletion after therapy - First cells to be restored after interruption of therapy in Responder patients.
CD19 ⁺⁺ CD20 ⁺ CD27 ⁻ IgD ⁺ CD38 ⁻ naïve B cells	- Rapid depletion after therapy - Fast restoration after interruption of therapy.
CD19 ⁺⁺ CD20 ⁺ CD27 ⁺ IgD ⁻ CD38 ^{lo/-} memory B cells	- Rapid depletion after therapy - Restoration of these cells only after 2 years of interruption of therapy.
CD19 ^{+/-} CD20 ⁻ CD27 ⁺⁺ CD38 ⁺⁺ plasma cells	- Indirect depletion after administration of drugs - Predictor of response
CD19 ⁺ CD20 ⁻ CD24 ^{high} CD38 ^{high} Breg cells	- Depletion after therapy - Restoration of tolerance with normalization of these cells.

- kod osoba s odgovorom na primjenu rituximabom Th1/Th2 ravnoteža i broj Treg se obnovi kao i CD19⁺ CD24^{hi}CD38^{hi} Breg stanica
- u tih bolesnika kao prediktor odgovora može se predložiti neizravna deplecija CD19^{+/-} CD27⁺⁺CD38⁺⁺ preplazma stanica i ova stanična populacija zahtijeva daljnje proučavanje
- učinak rituksimaba očituje se i na T staničnoj populaciji
- abnormalna aktivacija T stanica ili perzistiranje plazma stanica u slezeni utječe na odgovor na th
- prisutnost CD19⁺ B stanica, repopulacija CD⁺ 20 B stanica, smanjen udio CD 4⁺ T limfocita, Dsg1 (>20 IU/ml) i Dsg3 (>48 IU/ml)
- redovita FC te ELISA



PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM
UNIVERSITY OF PÉCS



Palacký University
Olomouc

HVALA NA PAŽNJI