

# FENOTIPIZACIJA I FUNKCIONALNA ULOGA SLUZNICAMA PRIDRUŽENIH INVARIJANTNIH LIMFOCITA T I GAMA-DELTA T STANICA U NASTANKU I PROGRESIJI VULGARNE PSORIJAZE

---

Plužarić, Vera

Doctoral thesis / Disertacija

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:713477>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Vera Plužarić

**FENOTIPIZACIJA I FUNKCIONALNA ULOGA SLUZNICAMA PRIDRUŽENIH  
INVARIJANTNIH LIMFOCITA T I GAMA-DELTA T STANICA U NASTANKU I  
PROGRESIJI VULGARNE PSORIJAZE**

Doktorska disertacija

Osijek, 2021.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Vera Plužarić

**FENOTIPIZACIJA I FUNKCIONALNA ULOGA SLUZNICAMA PRIDRUŽENIH  
INVARIJANTNIH LIMFOCITA T I GAMA-DELTA T STANICA U NASTANKU I  
PROGRESIJI VULGARNE PSORIJAZE**

Doktorska disertacija

Osijek, 2021.

Rad je ostvaren pri Zavodu za dermatologiju i venerologiju Kliničkog bolničkog centra Osijek, u Laboratoriju za analizu DNA pri Katedri za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju Medicinskog fakulteta Osijek, Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju pri Katedri za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Osijek, Odjelu za imunologiju i biotehnologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Pečuhu te Medicinskom fakultetu Sveučilišta Palacky u Olomoucu, Češka.

Mentor rada: doc. dr. sc. Stana Tokić, mag. mol. biol.

Komentor rada: izv. prof. dr. sc. Martina Mihalj, dr. med.

Rad ima 125 stranica, 15 tablica i 32 slike.

## PREDGOVOR

„Znanstvene misli donose svjetlo u mračne zakutke.“ Jill Tarter

Hvala onima koji su mi pomogli pronaći moje znanstveno svjetlo:

mojoj mentorici doc. dr. sc. Stani Tokić, mag. mol. biol. i komentorici izv. prof. dr. sc. Martini Mihalj, dr. med. koje su me strpljivo i stručno usmjeravale kroz cijeli proces ovog istraživanja, nesebično dijelile svoja znanja i vještine u području laboratorijskog rada i procesu pisanja doktorske disertacije. Hvala im na prenesenoj strasti prema istraživačkom radu te na izdvojenom trudu i vremenu.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Mariju Štefaniću, dr. med. na nesebičnoj pomoći i stručnim savjetima prilikom statističke obrade i grafičke vizualizacije rezultata, te prof. dr. Peteru Baloghu na stručnoj suradnji prilikom optimizacije eksperimenata za sortiranje stanica.

Hvala Ivani Jelavić i Noémi Balázs na savjetima i pomoći u laboratorijskom dijelu izrade ove doktorske disertacije.

Hvala svim djelatnicima Zavoda za dermatologiju i venerologiju KBC Osijek, osobito dr. sc. Ivanki Muršić, dr.med. i Mariji Šola, dr. med., s kojima sam izmjenjivala iskustva i razmišljanja te koji su pripomogli da postanem liječnica kakva danas jesam.

Hvala svim ispitanicima, te mojim prijateljima Ivi Milić Vranješ, Kseniji Andrić, Iris Pintarić, Bibijani Rostohar Bijelić, Ani i Ivanu Koprivčić, Maji Tolušić Levak i Duši Marijanović, čija su me prijateljstva gurala naprijed i koji su bili tu za mene.

Doktorsku disertaciju posvećujem svojoj obitelji – sinovima Pavlu i Petru koji me svojim iskričavim dječjim umovima i neiscrpnom energijom motiviraju za napredak i usavršavanje te suprugu Vedranu, partneru u životu i poslu, čija mi je predanost i strast prema medicini inspiracija, a koji mi je podrška i oslonac.

Materijalni troškovi provedbe istraživanja podmireni su iz sredstava znanstvenih projekata:

1. UNIOS-ZUP 2018-22 „Fenotipizacija i funkcionalna uloga MAIT i  $\gamma\delta$  T limfocita periferne krvi u razvoju i progresiji vulgarne psorijaze (voditelj projekta: doc.dr.sc. Stana Tokić)
2. VIF2018-MEFOS-8 „Uloga microRNA transkriptoma MAIT i  $\gamma\delta$  T limfocita u razvoju i progresiji vulgarne psorijaze“ (voditelj projekta: doc.dr.sc. Stana Tokić)
3. HRZZ UIP-2019-04. „NGS analiza transkriptoma MAIT i  $\gamma\delta$  T limfocita: fenotip, funkcija i raznolikost TCR klonova u pozadini razvoja vulgarne psorijaze“. (voditelj projekta: doc.dr.sc. Stana Tokić)

## SADRŽAJ:

<b>1</b>	<b>UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1	Klinička slika, podjela i dijagnoza psorijaze .....	1
1.2	Epidemiologija psorijaze .....	5
1.3	Etiologija psorijaze .....	6
1.3.1	Uloga genetičkih čimbenika .....	6
1.3.2	Uloga okolišnih čimbenika .....	8
1.4	Komorbiditeti .....	13
1.5	Imunološki sustav i koža .....	14
1.6	Imunopatogeneza psorijaze .....	15
1.6.1	Inicijacija .....	15
1.6.2	Formacija i “održavanje”/perzistiranje psorijatičnog plaka .....	17
1.7	MAIT limfociti .....	19
1.8	Uloga MAIT limfocita u psorijazi .....	21
1.9	$\gamma\delta$ T stanice .....	22
1.10	Uloga $\gamma\delta$ T stanica u psorijazi .....	24
<b>2</b>	<b>HIPOTEZA .....</b>	<b>25</b>
<b>3</b>	<b>CIJEVI ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>26</b>
<b>4</b>	<b>MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>27</b>
4.1	Ustroj studije .....	27
4.2	Materijali .....	27
4.2.1	Ispitanici i ispitivane skupine .....	27
4.2.2	Upotrijebljene kemikalije .....	28
4.3	Metode .....	30
4.3.1	Uzorkovanje krvi .....	30
4.3.2	Izolacija ukupnih perifernih mononuklearnih stanica .....	30
4.3.3	Protočna citometrija .....	33
4.3.4	Sortiranje MAIT i $\gamma\delta$ T stanica .....	42
4.3.5	Izolacija ukupne RNA .....	42
4.3.6	Kvantifikacija genske ekspresije primjenom RT-qPCR metode .....	43

4.3.7	Mjerenje serumskih razina citokina i kemokina .....	47
4.4	Statistički postupci .....	49
<b>5</b>	<b>REZULTATI</b> .....	<b>50</b>
5.1	Demografske, kliničko-antropometrijske, serološke i biokemijske karakteristike ispitanika .....	50
5.2	Periferni udjeli CD3 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> i CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> limfocita T u ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze i kontrolne skupine ispitanika .....	53
5.2.1	Povezanost relativnih udjela perifernih limfocitnih populacija s demografskim, kliničkim i biokemijskim obilježjima ispitanika .....	56
5.3	Razina kemokina i citokina u serumu periferne krvi oboljelih i zdravih ispitanika .....	57
5.4	Utjecaj CMV i BMI statusa te razine citokina i kemokina u serumu na relativne udjele i fenotip perifernih CD3 <sup>+</sup> γδTCR <sup>+</sup> populacija .....	57
5.4.1	Utjecaj CMV i BMI statusa na frekvenciju CD3 <sup>+</sup> γδTCR <sup>+</sup> stanica i TCRδ subpopulacija u perifernoj krvi .....	60
5.4.2	Utjecaj serumske razine ispitivanih citokina i kemokina na frekvenciju CD3 <sup>+</sup> γδTCR <sup>+</sup> stanica i TCRδ podskupina u perifernoj krvi .....	62
5.5	Utjecaj psorijaze na promjene udjela različitih perifernih γδ T subpopulacija .....	66
5.6	Utjecaj promjene staničnih udjela γδ T subpopulacija na transkripcijski profil sortiranih γδ T stanica u oboljelih i zdravih ispitanika .....	69
5.7	Veličina odjeljaka CD4 <sup>+</sup> i DP MAIT stanica u perifernoj krvi muških ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze .....	75
5.8	Udio atipičnih MR1-spregnutih MAIT stanica u perifernoj krvi ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze .....	79
5.9	Transkripcijski profil cirkulirajućih MR1-tet <sup>+</sup> TCRVα7.2 <sup>+</sup> MAIT stanica oboljelih od vulgarne psorijaze .....	81
<b>6</b>	<b>RASPRAVA</b> .....	<b>85</b>
6.1	Osvrt na odabir ispitanika te usklađenost ispitivanih skupina s obzirom na demografske, kliničko-antropometrijske i biokemijske karakteristike .....	85
6.2	Utjecaj spola, CMV statusa i PV statusa ispitanika na udjele cirkulirajućih CD3 <sup>+</sup> , CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> i CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> limfocita T .....	86

6.3	Citokinska i kemokinska „mreža“ .....	87
6.4	Relativni udjeli, fenotipska raznolikost i čimbenici koji oblikuju odjeljak $\gamma\delta$ T stanica u krvi oboljelih od vulgarne psorijaze .....	87
6.5	Relativni udjeli, fenotipska raznolikost i čimbenici koji oblikuju odjeljak MAIT stanica kod oboljelih od vulgarne psorijaze.....	90
6.6	Korelacija citokina i kemokina sa subpopulacijama $\gamma\delta$ i MAIT staničnih odjeljaka PV ispitanika.....	92
6.7	Ekspresijski profili transkripcijskih čimbenika i površinskih receptora sortitanih $\gamma\delta$ T i MAIT staničnih linija koreliraju s biokemijskim, demografskim i kliničkim obilježjima oboljelih ispitanika.....	93
6.8	Ograničenja istraživanja .....	96
7	ZAKLJUČAK.....	97
8	SAŽETAK .....	98
9	SUMMARY.....	99
10	LITERATURA .....	100
11	ŽIVOTOPIS.....	120



## POPIS KRATICA:

ACE	inhibitori angiotenzin-konvertirajućeg enzima (engl. <i>Angiotensin Converting Enzyme</i> )
ADAMTSL5	od engl. <i>disintegrin-like and metalloprotease domain containing thrombospondin type 1 motif-like 5</i>
ALT	alanin aminotransferaza
AST	aspartat aminotransferaza
APC	fluorescentni protein porijeklom iz crvenih algi (engl. <i>allophycocyanin</i> )
BMI	indeks tjelesne mase (engl. <i>body mass index</i> )
BTN3A1	od engl. <i>butyrophilin subfamily 3 member A1</i>
cAMP	ciklički adenzin monofosfat (engl. <i>cyclic adenosine monophosphate</i> )
CAMP/LL-37	kationski antimikrobn protein katelicidini
CCHR1	alfa-spiralni štapićasti protein sa spiralnom zavojnicom 1 (engl. <i>coiled-coil alpha-helical rod protein 1</i> )
CCL	kemokinski ligand s C-C motivom (engl. <i>C-C motif chemokine ligand</i> )
CD	klaster diferencijacije (engl. <i>cluster of differentiation</i> )
cDNA	komplementarna DNA (engl. <i>complementary DNA</i> )
CLA	kutani limfocitni antigen (engl. <i>cutaneous lymphocyte-associated antigen</i> )
CMV	citomegalovirus
CRH	kortikotropin oslobađajući hormon (engl. <i>corticotropin releasing hormone</i> )
Ct/C <sub>q</sub>	vrijednost graničnog ciklusa (engl. <i>threshold cycle / quantification cycle</i> )
CTRL skupina	kontrolna skupina zdravih, po dobi i spolu podudarnih/uparenih ispitanika
CXCL	kemokinski ligand s C-X-C motivom (engl. <i>C-X-C motif chemokine ligand</i> )
CXCR	receptor s C-X-C motivom (engl. <i>C-X-C motif chemokine receptor</i> )
DAMPs	molekularni obrasci povezan s oštećenjem tkiva (od engl. <i>Damage-Associated Molecular Patterns</i> )
DC	dendritička stanica (engl. <i>dendritic cell</i> )
DDC	dermalne dendritičke stanice
DKS	diferencijalna krvna slika

DLQI	dermatološki indeks kvalitete života (engl. <i>Dermatology Life Quality Index</i> )
DMSO	dimetil sulfoksid (engl. <i>dimethyl sulfoxide</i> )
DN	dvostruko negativne CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> T stanice (engl. <i>double-negative</i> )
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
DP	dvostruko pozitivne CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T stanice (engl. <i>double positive</i> )
EOMES	transkripcijski čimbenik (od engl. <i>Eomesodermin</i> )
E	eritrociti
eo	eozinofili
FBS	fetalni goveđi serum (engl. <i>Fetal bovine serum</i> )
FcR	receptore za Fc segment imunoglobulina
FITC	fluoresceinski izotiocijanat (engl. <i>fluorescein isothiocyanate</i> )
FMO kontrole	fluorescencija minus jedan (engl. <i>fluorescence minus one</i> )
Foxp3 <sup>+</sup>	od engl. <i>Forkhead box p3</i>
FVD	fiksabilna boja za vijabilnost (engl. <i>fixable viability dye</i> )
GGT	gama glutamil transferaza
GWAS	cjelogenomska studija povezanosti (engl. <i>genome wide association study</i> )
GZMB	granzim B
Hb	hemoglobin
HbsAg	hepatitis B površinski antigen (engl. <i>Hepatitis B surface antigen</i> )
HBV	hepatitis B virus
HCV	hepatitis C virus
HLA	humani leukocitni antigen (engl. <i>human leukocyte antigen</i> )
HPA	hipotalamičko-hipofizno-nadbubrežna osovina (engl. <i>hypothalamic–pituitary–adrenal axis</i> )
hsCRP	visoko osjetljivi C reaktivni protein (engl. <i>high-sensitivity C reactive protein</i> )
Htc	hematokrit
ICAM-1	međustanična adhezijska molekula 1 (engl. <i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i> )
IGF-1	inzulinu sličan čimbenik rasta (engl. <i>insulin like growth factor</i> )
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M

IL	interleukin (engl. <i>interleukin</i> )
ILCs	urođene limfoidne stanice (engl. <i>innate lymphoid cells</i> )
INF- $\gamma$	interferona gama (engl. <i>interferon gamma</i> )
iNKT	invarijantne prirodnoubilačke T stanice (engl. <i>invariant natural killer T cells</i> )
iNOS	inducibilna dušik-oxid sintaza (engl. <i>inducible nitric-oxide synthase</i> )
IQR	interkvartilni raspon (engl. <i>interquartile range</i> ).
KKS	cjelovita/kompletna krvna slika
KOPBP	kronične obstruktivne bolesti pluća
L	leukociti
l	limfociti
MAIT	sluznicama pridruženi invarijantni T (od engl. <i>Mucosal-associated invariant T</i> ) limfociti
MCP-1	protein 1 kemoatraktant monocita (engl. <i>monocyte chemoattractant protein 1</i> )
MCH	prosječni sadržaj hemoglobina u eritrocitu (engl. <i>mean corpuscular hemoglobin</i> )
MCV	prosječni volumen eritrocita (engl. <i>mean corpuscular volume</i> )
MCHC	prosječna koncentracija hemoglobina (Hb) u jednoj litri (1L) eritrocita (engl. <i>mean corpuscular hemoglobin concentration</i> ),
MIG	monokin induciran gama interferonom (engl. <i>monokine induced by gamma interferon</i> )
MHC	sustav tkivne snošljivosti/podudarnosti ili histokompatibilnosti (od engl. <i>major histocompatibility kompleks</i> )
mo	monociti
MPV	prosječni volumen trombocita (engl. <i>mean platelet volumen</i> )
MR1	molekula povezana s MHC I (engl. <i>Major Histocompatibility Complex I-related gene protein</i> )
mRNA	glasnička RNA (engl. <i>messenger RNA</i> )
NETs	neutrofilne izvanstanične/ekstracelularne zamke (eng. <i>neutrophil extracellular traps</i> )
NF- $\kappa$ B	nuklearni čimbenik kapa B (engl. <i>nuclear factor kappa B</i> )
NFW	voda bez primjesa DNA i RNA nukleaza (engl. <i>nuclease free water</i> )

NK	prirodno ubilačke stanice (engl. <i>natural killer</i> )
NKG2D	aktivirajući receptor izražen na NK stanicama (od engl. <i>natural killer group 2, membrane D</i> )
NSAID	nesteroidni protuupalni lijekovi (engl. <i>nonsteroidal anti-inflammatory drugs</i> )
PAPMPs	molekularni obrazci povezan s patogenim mikroorganizmima (engl. <i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i> )
PASI	indeks zahvaćenosti kože i težine kliničke slike (engl. <i>Psoriasis Area and Severity Index</i> )
PBMC	periferne mononuklearne stanice (engl. <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> )
PBS	fosfatni pufer (engl. <i>Phosphate-buffered saline</i> )
PCA	analiza glavnih komponenti (engl. <i>principal component analysis</i> )
pDCs	plazmacitoidne dendritičke stanice (engl. <i>plasmacytoid dendritic cells</i> )
PE	fluorescentni protein porijeklom iz crvenih algi (engl. <i>phycoerythrin</i> )
PE-Cy7	od engl. <i>phycoerythrin coupled with cyanine dye (Cy7)</i>
PerCP	od engl. <i>peridinin chlorophyll protein</i>
PerCP-Cy5.5	od engl. <i>peridinin chlorophyll protein coupled with cyanine dye (Cy5.5)</i>
PLA2G4D	od engl. <i>phospholipase A2 group IVD</i>
PLZF	transkripcijski čimbenik (engl. <i>promyelocytic leukemia zinc finger</i> )
PMT	fotomultiplicirajuće tubice (engl. <i>photomultiplier tube</i> )
PRRs	receptori za prepoznavanje molekularnih obrazaca (engl. <i>pattern recognition receptors</i> )
PSORS	rizične genske varijante/lokusi podložnosti za psorijazu (engl. <i>psoriasis susceptibility regions</i> )
PV	vulgarna psorijaza (lat. <i>psoriasis vulgaris</i> )
PV skupina	skupina ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze
qPCR	kvantitativna lančana reakcija polimerazom (engl. <i>quantitative polymerase chain reaction</i> )
RAR	receptor za retinoičnu kiselinu (engl. <i>retinoic acid receptor</i> )
RDW	raspodjela eritrocita po volumenu (engl. <i>red cell distribution width</i> )
RORC	gen za RAR srodni orfan receptor C (engl. <i>RAR-related Orphan Receptor C</i> )
ROS	reaktivni metaboliti kisika (engl. <i>reactive oxygen species</i> )

RT	enzim reverzne transkriptaze
RUNX3	transkripcijski čimbenik povezan RUNT 3 (engl. <i>runt-related transcription factor 3</i> ),
SE	sedimentacije eritrocita
seg. gr.	segmentirani granulociti
SS kontrole	jednoboje kontrole (engl. <i>single stain control</i> )
T-bet	transkripcijski čimbenik T box izražen u T stanicama (engl. <i>T-box expressed in T cells</i> )
TCR	T stanični receptor (engl. <i>T cell receptor</i> )
TF	transkripcijski čimbenik (engl. <i>transcriptional factor</i> )
Th	pomoćnički limfociti (engl. <i>helper T cell</i> )
TLRs	receptori nalik Toll proteinu (engl. <i>toll- like receptors</i> )
TNF- $\alpha$	tumor nekrotizirajući faktor-alfa (engl. <i>tumor necrosis factor alpha</i> )
TRAIL	ligand koji inducira apoptozu povezan s TNF (engl. <i>TNF-released apoptosis induced ligand</i> )
Trc	trombociti
Treg	regulatorni limfocit (engl. <i>Regulatory T cells</i> )
Trm	memorijske T stanice koje obitavaju u tkivu (engl. <i>tissue-resident memory T cells</i> )
UV	ultraljubičasto (engl. <i>ultraviolet</i> )
VCAM-1	vaskularna stanična adhezijska molekula 1 (engl. <i>Vascular Cell Adhesion Molecule 1</i> )
VEGF	vaskularni endotelni faktora rasta (engl. <i>vascular endothelial growth factor</i> )
V $\beta$	varijabilna regija beta lanca
$\gamma\delta$ T stanice	gama-delta T stanice

## POPIS TABLICA:

<b>Tablica 4.1.</b> Popis TaqMan proba i veličina umnoženih DNA odsječaka .....	29
<b>Tablica 4.2.</b> Program za qRT-PCR .....	46
<b>Tablica 5.1.</b> Demografske, kliničko-antropometrijske i serološke karakteristike skupine ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze i kontrolne skupine ispitanika.....	51
<b>Tablica 5.2.</b> Biokemijske karakteristike skupine ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze i kontrolne skupine ispitanika .....	52
<b>Tablica 5.3.</b> Udjeli CD3 <sup>+</sup> , CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> , CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> i CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> limfocita T u perifernoj krvi ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze i kontrolne skupine ispitanika.....	54
<b>Tablica 5.4.</b> Usporedna analiza perifernih CD3 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> i CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> limfocita T kod muških ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze i kontrolne skupine muških ispitanika.....	55
<b>Tablica 5.5.</b> Usporedna analiza perifernih CD3 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> i CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> limfocita T nakon raspodjele po spolu u združenom uzorku ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze i kontrolne skupine ispitanika.....	55
<b>Tablica 5.6.</b> Udio CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> limfocita T kod citomegalovirus seropozitivnih i citomegalovirus seronegativnih ispitanika.....	56
<b>Tablica 5.7.</b> Utjecaj citomegalovirus serološkog statusa na relativne udjele CD3 <sup>+</sup> γδTCR <sup>high</sup> i CD3 <sup>+</sup> γδTCR <sup>int</sup> stanica periferne krvi u združenom uzorku ispitanika.....	60
<b>Tablica 5.8.</b> Periferni udjeli CD3 <sup>+</sup> TCRγδ <sup>+</sup> T limfocita u skupini ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze i kontrolnoj skupini ispitanika.....	66
<b>Tablica 5.9.</b> Zastupljenost Vδ1 <sup>+</sup> , Vδ2 <sup>+</sup> i Vδ1 <sup>-</sup> Vδ2 <sup>-</sup> subpopulacija limfocita u populacijama perifernih γδTCR <sup>high</sup> i γδTCR <sup>int</sup> T stanica kod muških ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze i kontrolne skupine muških ispitanika.....	67
<b>Tablica 5.10.</b> Zastupljenost Vδ1 <sup>+</sup> , Vδ2 <sup>+</sup> i Vδ1 <sup>-</sup> Vδ2 <sup>-</sup> subpopulacija limfocita u populacijama perifernih γδTCR <sup>high</sup> i γδTCR <sup>int</sup> T stanica kod oboljelih od vulgarne psorijaze i kontrolne skupine ispitanika .....	67
<b>Tablica 5.11.</b> Zastupljenost kanonskih i atipičnih perifernih T stanica spregnutih s MR1 u perifernoj krvi ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze i kontrolnoj skupini ispitanika.....	77
<b>Tablica 5.12.</b> Udio MR1-tet <sup>+</sup> TCRVα7.2 <sup>+</sup> stanica unutar CD8 <sup>+</sup> frakcije perifernih MAIT stanica nakon raspodjele po spolu u združenom uzorku ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze i kontrolne skupine ispitanika.....	78

**Tablica 5.13.** Promjene relativnih udjela MR1- tet  $^{+}TCRV\alpha7.2^{+}$  stanica u perifernoj krvi muških ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze i kontrolne skupine muških ispitanika .....79

## POPIS SLIKA:

<b>Slika 1.1.</b> Različiti klinički oblici vulgarne psorijaze.....	3
<b>Slika 1.2.</b> Klinička slika pustulozne psorijaze.....	4
<b>Slika 1.3.</b> Okolišni čimbenici koji sudjeluju u nastanku i razvoju psorijaze.....	8
<b>Slika 1.4.</b> Psorijaza i komorbiditeti. ....	13
<b>Slika 4.1.</b> Postupak razdvajanja krvnih stanica s pomoću gradacijskog medija A) prije centrifugiranja i B) nakon centrifugiranja. ....	31
<b>Slika 4.2.</b> Bürker-Türk komorica/hemocitometar.....	32
<b>Slika 4.3.</b> Dizajn i kontrola kvalitete višeparametarske protočne citometrije. ....	37
<b>Slika 4.4.</b> Dizajn i kontrola kvalitete višeparametarske protočne citometrije. ....	38
<b>Slika 4.5.</b> Dizajn i kontrola kvalitete višeparametarske protočne citometrije. ....	39
<b>Slika 4.6.</b> Usporedna analiza $\gamma\delta$ subpopulacija svježih i krioprezerviranih/smrznutih stanica	40
<b>Slika 4.7.</b> Usporedna analiza $\gamma\delta$ subpopulacija svježih i krioprezerviranih/smrznutih stanica	41
<b>Slika 4.8.</b> Krivulja amplifikacije isječaka DNA od interesa .....	44
<b>Slika 5.1</b> Reprezentativni primjer analize $CD4^+$ i $CD8^+$ limfocita T iz periferne krvi ispitanika metodom protočne citometrije .....	53
<b>Slika 5.2.</b> Reprezentativni primjer analize $\gamma\delta^+$ limfocita T iz periferne krvi ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze i kontrolne skupine ispitanika metodom protočne citometrije. ....	58
<b>Slika 5.3.</b> Reprezentativni primjer analize subpopulacija $\gamma\delta^+$ limfocita T iz periferne krvi te zastupljenost $V\delta 1^+$ , $V\delta 2^+$ i $V\delta 1^-V\delta 1^-$ subpopulacija unutar $TCR\gamma\delta$ staničnog odjeljka ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze i kontrolne skupine ispitanika metodom protočne citometrije te prikaz njihovih relativnih frekvencija.....	59
<b>Slika 5.4.</b> Utjecaj citomegalovirus serološkog statusa na zastupljenost $\gamma\delta$ T subpopulacija u perifernoj krvi svih ispitanika .....	61
<b>Slika 5.5.</b> Utjecaj indeksa tjelesne mase i visoko osjetljivog C-reaktivnog proteina na udjele cirkulirajućih $CD3^+\gamma\delta TCR^{high}$ T stanica u združenom uzorku ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze i kontrolne skupine ispitanika.....	62
<b>Slika 5.6.</b> Utjecaj serumskih razina CCL27 kemokina na zastupljenost $CD3^+\gamma\delta TCR^+$ staničnog odjeljka te $TCR\delta$ subpopulacija u perifernoj krvi ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze.....	63
<b>Slika 5.7.</b> Utjecaj serumskih razina CCL27 kemokina na zastupljenost $CD3^+\gamma\delta TCR^+$ staničnog odjeljka te $TCR\delta$ subpopulacija u perifernoj krvi kontrolne skupine ispitanika .....	64



<b>Slika 5.8.</b> Utjecaj serumskih vrijednosti IL-18 na udjele cirkulirajućih CD3 <sup>+</sup> γδTCR <sup>int</sup> Vδ1 <sup>+</sup> limfocita T stanica .....	65
<b>Slika 5.9.</b> Udio CD3 <sup>+</sup> γVδ1 <sup>-</sup> δ2 <sup>-</sup> subpopulacije γδTCR <sup>int</sup> limfocita T u perifernoj krvi muških ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze i kontrolne skupine muških ispitanika te utjecaj težine bolesti na iste .....	68
<b>Slika 5.10.</b> Međugenski korelacijski obrasci zabilježeni u sortiranim γδ T stanicama zdravih ispitanika .....	70
<b>Slika 5.11.</b> Transkripcijski profil γδ T staničnog odjeljka u perifernoj krvi ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze i kontrolne skupine ispitanika.....	71
<b>Slika 5.12.</b> Usporedni prikaz razlike među skupinama i korelacijskih odnosa genske ekspresije u sortiranim γδ T stanicama ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze i kontrolne skupine ispitanika .....	72
<b>Slika 5.13.</b> Usporedba razlike u ekspresiji ispitivanih gena sortiranih γδ T stanica ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze i kontrolne skupine ispitanika .....	73
<b>Slika 5.14.</b> Povezanost promjene relativnih udjela perifernih γδ T subpopulacija s razinom ekspresije gena ZBTB16 i IL18R u sortiranim γδ T stanicama zdravih ispitanika .....	74
<b>Slika 5.15.</b> Povezanost promjene relativnih udjela CD3 <sup>+</sup> γδTCR <sup>int</sup> Vδ1 <sup>+</sup> stanica s razinom ekspresije gena RORC u sortiranim γδ T stanicama zdravih ispitanika.....	75
<b>Slika 5.16.</b> Reprezentativni primjer analize MAIT stanica iz periferne krvi ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze i kontrolne skupine ispitanika metodom protočne citometrije. ....	76
<b>Slika 5.17.</b> Utjecaj serumskih vrijednosti IL-18 na promjenu udjela atipičnih MR1-spregnutih Vα7.2 <sup>-</sup> T stanica u perifernoj krvi ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze.....	80
<b>Slika 5.18.</b> Međugenski korelacijski obrasci zabilježeni u sortiranim MAIT stanicama zdravih ispitanika.....	82
<b>Slika 5.19.</b> Transkripcijski profil MAIT staničnog odjeljka u perifernoj krvi ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze i kontrolne skupine ispitanika .....	83
<b>Slika 5.20.</b> Usporedba razlike u ekspresiji ispitivanih gena sortiranih MAIT stanica ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze i kontrolne skupine ispitanika .....	84

## 1 UVOD

Psorijaza je kronična, rekurentna, imunološki posredovana upalna bolest kože, nejasne etiologije. Osim kože, kod 10-30 % oboljelih zahvaćeni su i zglobovi, a zbog pridruženih kardiovaskularnih, gastrointestinalnih, psiholoških i ostalih komorbiditeta (Slika 1.4.) psorijaza se može promatrati kao sustavni klinički entitet (1 – 4).

Etimologija riječi „psoriasis“ dolazi od grčke riječi „psora“ što znači svrbež te grčke riječi „isis“ što znači stanje (5). U prošlosti, psorijaza je zajedno s leprom, kategorizirana u skupinu kožnih bolesti, što je dovelo do poistovjećivanja s istom, stigmatizacije oboljelih od psorijaze te njihove izolacije (5). U 18. stoljeću, dermatolog Robert Willian uvodi novu klasifikaciju kožnih oboljenja, kojom eritematoskvamozne promjene na koljenima i pridružene udubine na nokatim pločama prepoznaje kao zasebne kliničke simptome te ih objedinjuje pod nazivom lepra vulgaris. Zahvaljujući minucioznom radu autora Gilbert i Hebra, psorijaza je u konačnici klinički i terminološki definirana i time posljedično diferencirana od drugih dermatoloških bolesti (6 – 10).

### 1.1 Klinička slika, podjela i dijagnoza psorijaze

Psorijaza se ubraja u skupinu papuloskvamoznih dermatoza. Klinička obilježja uključuju pojavu ograničenih eritematoznih papula i makula, prekrivenih srebrno bijelim ljuskama smještenim na predilekcijskim mjestima: koži vlasišta, ekstenzornim stranama laktova i koljena te lumboskaralnoj regiji (11).

Klinička slika odraz je promjena vidljivih u histološkoj slici epidermisa i dermisa. U epidermisu prisutna je hiperproliferacija keratinocita (hiperkeratoza) uzrokovana njihovom abnormalnom diferencijacijom, uz trajno prisutne jezgre (parakeratoza), što dovodi do posljedičnog zadebljanja epidermisa (akantoza) uz smanjenje ili gubitak zrnatog sloja epidermisa (hipogranuloza odnosno agranuloza) (1).

Limfociti, poglavito linije CD8<sup>+</sup> (CD, od engl. *cluster differentiation*) stanica, neutrofil, dendritičke (DC, od engl. *dendritic cells*) i Langerhansove stanice, akumuliraju se u epidermisu i pospješuju formiranje Munrovih mikroapscesa (fokalno nakupljanje neutrofila u stratum corneumu) (1, 12, 13). Unutar dermisa javljaju se produljene i proširene kapilare, smještene u izduženim dermalnim prečkama iznad kojih je epidermis stanjen, uz perivaskularni infiltrat limfocita, poglavito pomoćničkih CD4<sup>+</sup> T staničnih linija, ali i drugih imunskih populacija

poput DC, makrofaga, prirodno ubilačkih stanica (NK, od engl. *natural killer*), gama-delta T stanica ( $\gamma\delta$ ) i urođenih limfoidnih stanica (ILCs, od engl. *innate lymphoid cells*) (1, 12).

S obzirom na heterogenu kliničku sliku te lokalizaciju promjena na koži razlikujemo više oblika psorijaze među kojima kronična stacionarna/plak/vulgarna psorijaza (PV, od lat. *psoriasis vulgaris*) čini 85 % - 95 % svih kliničkih oblika (14).

S obzirom na pojavnost sterilnih pustula (neutrofilne nakupine u epidermisu) razlikuju se:

- I. nepustularni oblici psorijaze (lat. *psoriasis non pustulosa*) te
- II. pustularni oblici psorijaze (lat. *psoriasis pustulosa*) (13, 15).

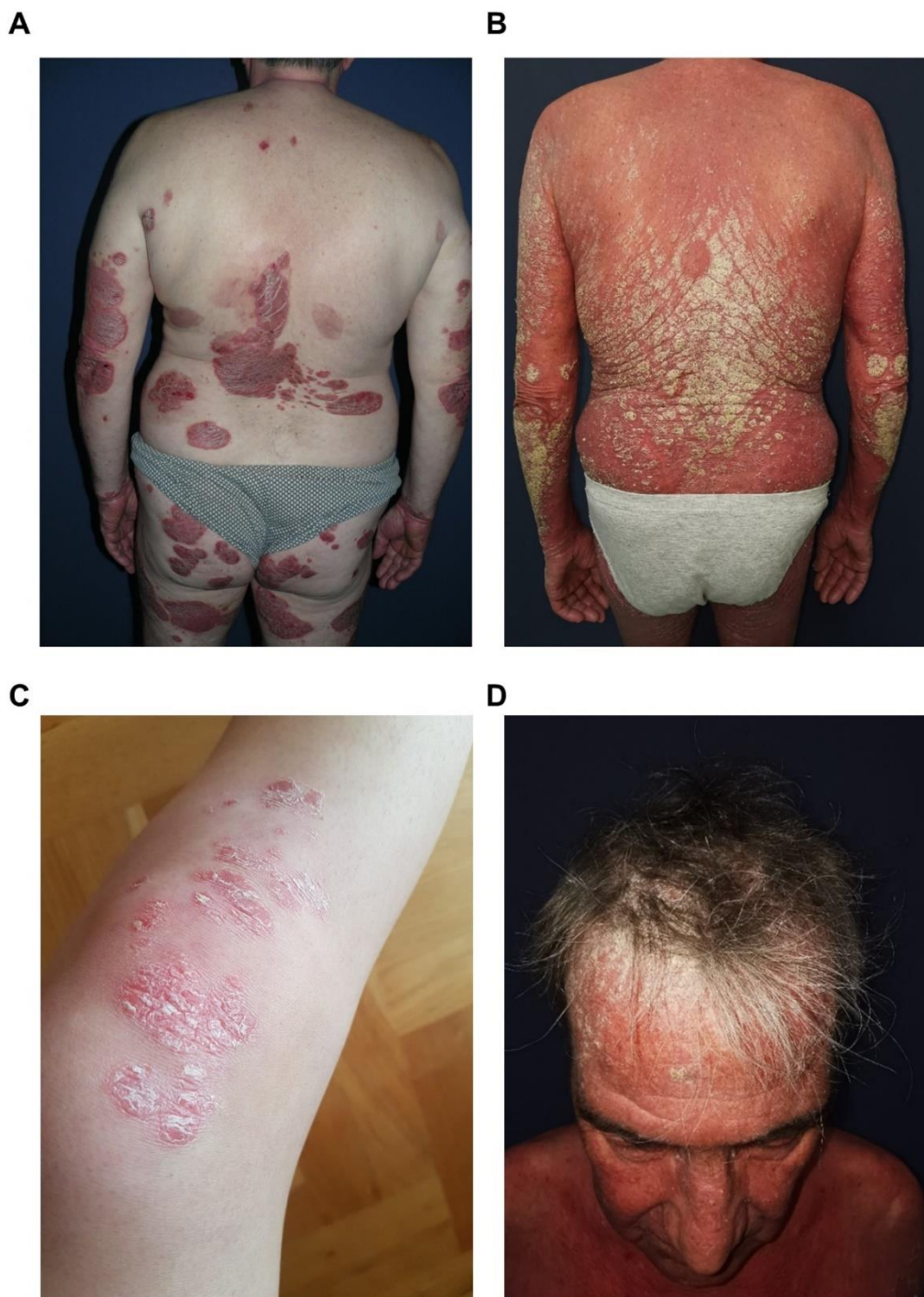
Pri tome su kod nepustularnih oblika, histološki vidljivi Munrovi mikroapscesi, dok su Kogojeve spongiformne (spužvaste) pustule, u kojima stanične membrane nekrotičnih epidermalnih stanica okružuju neutrofilnu nakupinu intrakornealno, patognomonične za pustularni oblik psorijaze (13).

I. U nepustularne oblike psorijaze (lat. *psoriasis non pustulosa*) ubrajamo:

- Vulgarnu psorijazu, odnosno kronični stacionarni oblik/plak psorijaza (Slika 1.1.)
- Eruptivnu ili kapljičastu psorijazu (lat. *psoriasis guttata*)
- Eritrodermijski oblik psorijaze (lat. *psoriasis erythrodermica*)
- Psorijazu posebnih lokalizacija/regija (psorijazu lica, psorijazu vlasišta (lat. *psoriasis capillitii*), psorijazu intertriginoznih regija (lat. *psoriasis inversa*), psorijazu genitalne regije, psorijazu dlanova i tabana (lat. *psoriasis palmoplantaris*), psorijazu noktiju (lat. *psoriasis unguinum*), oralnu psorijazu )

II. U pustularne oblike (lat. *psoriasis pustulosa*) psorijaze ubrajamo:

- Generalizirani oblik:
  1. Generalizirani oblik pustulozne psorijaze (lat. *psoriasis pustulosa generalisata*); unutar kojeg razlikujemo nekoliko oblika (von Zumbusch, anularni oblik)
  2. *Impetigo herpetiformis*
  3. *Psoriasis vulgaris cum pustulationem*
- Lokalizirani oblik:
  1. Palmoplantarna pustulozna psorijaza (lat. *psoriasis pustulosa palmoplantaris*) (Barber- Konigsbeck)
  2. *Acrodermatitis chronica continua suppurativa* (Hallopeau) (13, 15).



**Slika 1.1. Različiti klinički oblici vulgarne psorijaze**

*A) kronični stacionarni oblik plak psorijaze; B) kronični stacionarni oblik plak psorijaze s tendencijom k razvoju eritrodermije; C) predilekcijsko mjesto za razvoj plak psorijaze – zglobovi (koljeno); i D) psorijaza vlasišta.*

*A), B), D) Ustupljeno od strane dr. Marije Šola (autorski rad) C) Autorski rad*



**Slika 1.2. Klinička slika pustulozne psorijaze**

*A), B), C), D) generalizirani pustulozni oblik psorijaze; E) pustulozni oblik psorijaze s psorijatično promijenjenim nokatnim pločama. Ustupljeno od strane dr. Marije Šola (autorski rad).*

U pozadini više kliničkih oblika psorijaze, prepoznajemo genetička i demografska obilježja koja pojednostavljaju podjelu psorijaze na tip I i tip II.

Psorijaza tipa I zastupljena je kod dvije trećine svih oboljelih od psorijaze. Pojavljuje se u ranoj životnoj dobi (< 40 godine života), često združena s pozitivnom obiteljskom anamnezom i specifičnim genskim varijantama humanih leukocitnih antigena (HLA, od engl. *human leukocyte antigen*), preciznije HLA-Cw6, HLA-B13 i HLA-DR7. Oboljeli od psorijaze tipa I nerijetko razvijaju težu kliničku sliku i doživljavaju učestale recidive (16).

Psorijaza tipa II nastupa u kasnijoj dobi (>40 godine života), bez jasne povezanosti s obiteljskom anamnezom i/ili genima sustava HLA, često uz razvoj blažih kliničkih simptoma (16).

Dijagnoza bolesti postavlja se na temelju anamnestičkih podataka, kliničke slike te histološke verifikacije bolesti. S ciljem izbora optimalne terapije te praćenja odgovora na lijekove u primjeni, skala indeksa zahvaćenosti kože i težine kliničke slike (PASI, od engl. *Psoriasis Area and Severity Index*) koristi se za procjenu površine i anatomske regije (glava, trup, gornji udovi i donji udovi) zahvaćene kože, kao i za analizu intenziteta oštećenja u vidu jačine eritema, debljine te stupnja deskvamacije (17, 18). Bodovni sustav skale PASI, raspona od 0 - 72, omogućava klasifikaciju PV prema težini kliničke slike, pa tako razlikujemo lakše (PASI<10), srednje teške (10>PASI<20) i teške (PASI>20) oblike oboljenja.

Psihološko opterećenje izazvano psorijazom moguće je pak ocijeniti primjenom upitnika dermatološkog indeksa kvalitete života DLQI (engl. *Dermatology Life Quality Index*) koji se sastoji od 10 pitanja, bodovnog raspona od 0 do 30. Vrijednosti DLQI koje nadmašuju 10 bodova ukazuju na lošu kvalitetu života te zajedno s rezultatima PASI analize služe u oblikovanju daljnjih postupaka liječenja i terapije (19).

## 1.2 Epidemiologija psorijaze

Prema dosadašnjim dostupnim podacima, svjetska prevalencija PV u odrasloj dobi varira od 0,91 % (Sjedinjene Američke Države) do 8,5 % (Norveška), dok u dječjoj dobi iznosi 0 % (Tajvan) do najviše 2,1 % (Italija) (20).

Prevalencija i incidencija PV ovisi o specifičnim populacijskim obrascima učestalosti nasljednih rizičnih čimbenika, dobi, spolu i geografskom položaju ispitivanih populacija. U tom kontekstu, opisani su tzv „ekvatorijalni učinci“ Sunčeva ultraljubičastog (UV) B zračenja i izloženosti specifičnim antigenima u pozadini regionalnih razlika u PV prevalenciji (20, 21). Štoviše, spol i dob značajno utječu na incidenciju PV pa je, slijedom navedenog, zabilježena veća pojavnost psorijaze kod mlađih žena (18 - 29 godina) i starijih muškaraca (30 - 39 godina), u usporedbi s muškarcima i ženama iste dobi. Incidencija kod oba spola smanjuje se pak u dobi od 40 - 49 godina, a zatim ponovo raste, kod žena nakon 50., a kod muškaraca nakon 60. godine života (22).

### 1.3 Etiologija psorijaze

Unatoč brojnim studijama koje su tijekom povijesti istraživale pojavnost, potencijalne uzročnike i raznolike terapijske pristupe u liječenju psorijaze, etiologija bolesti još uvijek je nedovoljno razjašnjena. Psorijaza je i danas stoga područje stalnog istraživanja s ciljem razvoja kurativne, a ne samo simptomatske terapije.

Uspješna implementacija imunosupresivne terapije ciklosporinom A, krajem 1970-tih, ukazala je na ključnu ulogu nekontroliranog imunološkog odgovora u inicijaciji i progresiji bolesti (23). Slijedom prvih terapijskih uspjeha, razvijena je paleta bioloških lijekova koji inhibiraju djelovanje specifičnih imunskih populacija i ublažavaju simptome psorijaze, poput inhibitora tumornog nekrotizirajućeg faktora-alfa (TNF- $\alpha$ , od engl. *tumor necrosis factor alpha*) (adlimumab, etanrecept, infliximab), inhibitora interleukina (IL, od engl. *interleukin*)-12/23 (ustekinumab), inhibitora IL-17 (secukinumab, ixekizumab) i inhibitora IL-23 (guselkumab). Dugotrajna primjena može potencijalno, međutim, rezultirati neželjenim nuspojavama, a obustava liječenja najčešće dovodi do recidiva pa je za uspješnu kontrolu bolesti potrebna doživotna liječnička skrb. Unatoč poznatim kliničkim, psihološkim, socijalnim i financijskim dimenzijama, ova bolest i dalje ostaje zagonetka. Poznato je, međutim, da razvoju psorijaze posreduju združeni učinci stresnih okolišnih događaja, narušene kožne barijere i brojnih genetičkih i epigenetičkih čimbenika koji posreduju razvoju autoreaktivnih imunoloških stanica usmjerenih protiv, za sada, nepoznatih (auto)antigen(a) (24 – 26).

#### 1.3.1 Uloga genetičkih čimbenika

Epidemiološka istraživanja u obiteljima oboljelih upućuju na važnu ulogu višestrukih nasljednih čimbenika u pojavi i razvoju psorijaze. Pozitivna obiteljska anamneza među srodnicima u prvom koljenu prisutna je u 40 % slučajeva oboljelih, a postotak vjerojatnosti razvoja psorijaze kod djeteta oba pogođena roditelja iznosi čak 50 % (27). Snažan utjecaj genske komponente, zabilježen je i usporedbom frekvencije pojavnosti PV u monozigotnih i dizigotnih blizanaca, pri čemu pojavnost psorijaze u jednojajčanim parovima varira od 62 % do 70 %, za razliku od dizigotnih blizanaca kod kojih je ta stopa znatno manja (21 % - 23 %). Oboljeli monozigotni blizanci, štoviše, često dijele sličan tijek oboljenja, uz podjednak stupanj i tjelesnu raspodjelu simptoma koji se pojavljuju u podjednako dobi (27, 28). Slijedom



navedenog, vjeruje se da pojavnost psorijaze uvelike ovisi o genskoj predispoziciji (60 % – 90 %), a tek ostatak rizika pripisuje se okolišnim faktorima (29).

Na osnovi provedenih cjelogenomskih studija povezanosti (GWAS, od engl. *genome wide association studies*) genskih polimorfizama i psorijaze, otkriveno je više od 60 potencijalno rizičnih genskih lokusa. Među njima, identificirana je nekolicina genskih varijanti koje se najčešće susreću u genomu oboljelih, i koje stoga najvećim dijelom pridonose riziku za razvoj psorijaze. Rizične genske varijante pronalazimo unutar više kromosomskih regija (PSORS, od engl. *psoriasis susceptibility regions*), među kojima u okviru PSORS1 lokusa (6p21.3) pronalazimo i visokorizične varijante gena HLA-Cw6, HLA-B13 i HLA-B7. Rizik razvoja psorijaze vezan je, međutim, i za brojne druge PSORS lokuse, uključujući PSORS 2-9 (PSORS 2 (17q25), PSORS 3 (4q34), PSORS 4 (1q21), PSORS 5 (3q21), PSORS 6 (19p13), PSORS 7 (1p32), PSORS 8 (16q) i PSORS 9 (4q31) (30 – 32).

PSORS1 zauzima područje od 200 kb (kilobaza), koje smješteno na kratkom kraku kromosoma 6 (6p21.3), i obuhvaća gene sustava tkivne snošljivosti/podudarnosti ili histokompatibilnosti (MHC, od engl. *major histocompatibility kompleks*), među kojima i visokorizične varijante gena HLA-C koje kodiraju MHC molekule razreda I. MHC-I molekule posreduju aktivaciju citotoksičnih CD8<sup>+</sup> limfocita T, potencijalno važnih imunoloških sudionika u razvoju psorijatičnih lezija. U prilog važnosti HLA-C lokusa govori i činjenica da HLA-Cw6 homozigoti imaju 2 do 5 puta veću vjerojatnost obolijevanja od PV tipa 1 u usporedbi s HLA-Cw6 heterozigotima (33). Posljednjih godina, u okviru PSORS1 regije otkriveni su i neki novi geni kandidati, uključujući alfa-spiralni štapićasti protein sa spiralnom zavojnicom 1 (CCHR1, od engl. *coiled-coil alpha-helical rod protein 1*) u pozadini abnormalne diferencijacije i proliferacije keratinocita (30) te korneodezmosin koji igra važnu ulogu u procesima deskvamacije epidermisa. (30 – 32). PSORS1 lokus sadrži dakle, genske varijante koje moguće utječu na promijenjenu funkciju imunološkog sustava, nekontroliranu proliferaciju i narušeni integritet stanica u koži.

Osim navedenih gena PSORS1 regije, važnu ulogu u psorijazi imaju i genske varijante drugih PSORS područja, posebice geni koji kodiraju komponente ključnih upalnih molekula, poput gena IL12B koji kodira podjedinicu p40 IL-12 i IL-23, te gena IL23A i IL23B, nužnih za sintezu podjedinice p19 IL-23, i IL-23 receptora (34). U okviru iste studije, zabilježena je i povezanost psorijaze s polimorfizmima gena koji kodira nuklearni čimbenik kapa B (NF- $\kappa$ B, od engl. *nuclear factor kappa B*), ključnog medijatora izvanstaničnih upalnih



signala, čija je aktivnost vezana uz povećanu proliferaciju keratinocita i sintezu proupalnih citokina (34, 35).

### 1.3.2 Uloga okolišnih čimbenika



**Slika 1.3. Okolišni čimbenici koji sudjeluju u nastanku i razvoju psorijaze**

*Autorski rad napravljen pomoću računalnih programa Inkscape (Brooklyn, New York, SAD) te Microsoft PowerPoint 2019*

#### *Debljina*

Psorijaza i prekomjerna tjelesna težina, pretilost ili gojaznost (lat. *obesitas*), kao stanje upale neinfektivne geneze (sterilne upale) s aktivnom produkcijom citokina, međusobno čine začarani krug, koji je dvosmjernan u vidu pretilosti kao predisponirajućeg čimbenika u razvoju psorijaze te psorijaze kao stanja koje pogoršava pretilost (36 – 38).

Stanje pretilosti, definirano indeksom tjelesne mase (BMI, od engl. *body mass index*) većim od 30, linearno korelira s pojavom i progresijom psorijaze te dvostruko povećava rizik od razvoja bolesti (39). Zanimljivo, u krvi pretilih osoba opisane su povećane koncentracije TNF- $\alpha$  (40), a u adipoznom tkivu zabilježena je povećana ekspresija upalnih citokina (IL-1 $\beta$  i IL-6) i kemokina vezanih uz migraciju i udomljavanje monocita (MCP-1, od engl. *monocyte chemoattractant protein 1*), neutrofila (IL-8 ili CXCL8, od engl. *chemokine (C-X-C motif)*)

*ligand*) i CXCR3+ limfocita T (CXCL9 ili MIG, od engl. *monokine induced by gamma interferon*), ujedno ključnih sudionika opisanih u patofiziologiji psorijaze (39, 41).

### *Pušenje*

Pušenje je rizični okolišni čimbenik za razvoj mnogih bolesti (kardiovaskularnih bolesti, kronične obstruktivne bolesti pluća (KOPBP), malignih bolesti, peptičkog ulkusa, Chronove bolesti, sistemskog eritemskog lupusa), uključujući i psorijazu (42 – 45). Osobe koje puše  $\geq 30$  godina, približno više od 14 cigareta dnevno, imaju dvostruko veći rizik za razvoj psorijaze. Štoviše, pušenje utječe na razvoj kliničke slike, pri čemu se najsnažnije povezuje s pojavom palmoplantarnog pustuloznog oblika psorijaze. Osim kliničke slike oboljelih od psorijaze, pušenje oblikuje njihov odgovor na terapiju kao i razvoj specifičnih komorbiditeta, ponajviše psorijatični artritis. (46 – 48). Važno je naglasiti da cigaretni dim sadrži  $> 7\ 000$  kemikalija koje interferiraju s funkcijom imunološkog sustava te utječu na izražaj gena vezanih uz povećan rizik za razvoj psorijaze, kao što su HLA-Cw6 i HLA-DQA1\*0201 (46, 49). Slobodni radikali u dimu cigareta, štoviše, mogu nadmašiti antoksidativni kapacitet organizma i time pospješiti aktivaciju upalnih transkripcijskih čimbenika u imunskim stanicama. Jedan od takvih scenarija uključuje aktivaciju NF- $\kappa$ B u limfocitima te posljedičnu sintezu proupalnih prostagandina i kemokinskih liganada kao što su CCL20 i CXCL8 koji potiču kemotaksiju limfocita, DC te neutrofila na mjesta upale (49, 50). Plazmacitoidne dendritičke stanice (pDCs, od engl. *plasmacytoid dendritic cells*), makrofagi i druge antigenske prezentirajuće stanične linije, kao i keratinociti te endotelne stanice, na svojoj površini izražavaju nikotinske acetilkolinске receptore, koji se pri susretu s nikotinom iz duhanskog dima, mogu aktivirati i potaknuti kaskadu upalnih reakcija (49, 51). U takvim uvjetima, može doći do pojačane sinteze upalnih citokina TNF- $\alpha$ , interferona gama (INF- $\gamma$ , od engl. *interferon gamma*), IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-12 i IL-23 te međustaničnih (ICAM-1, od engl. *Intercellular Adhesion Molecule 1*) i vaskularnih adhezijskih molekula (VCAM-1, od engl. *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*), kao i vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF, od engl. *vascular endothelial growth factor*). Navedeni medijatori u koži oboljelih od psorijaze potiču razvoj upalnog mikookoliša, posljedičnu limfocitnu infiltraciju, angiogenezu te ubrzanu i patološku diferencijaciju epidermalnih stanica. (49, 52).

Opažajnim istraživanjem u populaciji 178 oboljelih te dobno, spolno i rasno podudarnih zdravih kontrola kineske nacionalnosti, uočena je 10 puta veća učestalost pojavnosti psorijaze

u HLA-Cw pozitivnih ispitanika s pozitivnom anamnezom pušenja (>10 cigareta dnevno) (53). Zanimljivo, učestalost oboljenja rasla je s dnevnim povećanjem broja cigareta i godinama pušenja (53).

### *Alkohol*

Osobe oboljele od PV sklonije su povećanom unosu i zloupotrebi alkohola. Međutim, uzročno-posljedični odnos između alkohola i psorijaze još uvijek je nerazjašnjen (54). Osim otežane suradljivosti pacijenata uslijed povećane upotrebe alkohola, poznato je da alkohol interferira s farmakodinamičkim i farmakokinetičkim svojstvima sustavnih terapijskih pripravaka i time izravno utječe na učinkovitost i ishod liječenja psorijaze. Važno je također napomenuti da alkohol uzrokuje sterilnu upalu organizma koja se javlja kao posljedica alkoholom potaknute sinteze proupalnih citokina poput TNF-a, INF- $\gamma$ , IL-1, IL-6 i IL-8, redom važnih sudionika u patogenezi psorijaze (54, 55).

### *Lijekovi*

Lijekovi mogu izazvati nastanak *de novo* psorijaze kod osoba s negativnom obiteljskom anamnezom, bez rizičnih genetičkih obilježja. Isto tako, primjena određenih lijekova može potaknuti pojavu kliničke slike psorijaze u genetički predisponiranih osoba ili može uzrokovati pogoršanje već prisutnih simptoma, kao i pojavu novih na do tada nezahvaćenoj koži, što je najčešći slučaj (56). Prekid primjene lijekova koji djeluju kao okidači razvoja psorijaze, kod nepredisponiranih osoba rezultirat će povlačenjem kliničkih simptoma, dok kod predisponiranih osoba to često nije slučaj (57).

. Litij, beta blokatori, antimalarici (hidroksiklorokin/klorokin), tetraciklini, terbinafin, nesteroidni protuupalni lijekovi (NSAID, od engl. *nonsteroidal anti-inflammatory drugs*), inhibitori angiotenzin-konvertirajućeg enzima (ACE, od engl. *Angiotensin Converting Enzyme*), imikvimod, TNF- $\alpha$  inhibitori i monoklonska protutijela usmjerena na protein programirane stanične smrti 1, samo su neki od poznatih lijekova „okidača“ psorijaze (58).

Točan mehanizam kojim navedeni lijekovi uzrokuju nastanak i razvoj psorijaze nije poznat, međutim, postoji nekoliko teorija koje nastoje objasniti njihovo djelovanje (57 – 68):

- odgođeni tip alergijske reakcije ili alergijski posredovana imunološka reakcija povezuje se s primjenom beta blokatora (67)

- smanjenje razine unutarstaničnih sekundarnih glasnika, posebice cikličkog adenzin monofosfata (engl. *cyclic adenosine monophosphate*, cAMP) nakon primjene beta blokatora i tetraciklina (57) te smanjenje inozitola nakon primjene litija (58), što potencijalno dovodi do smanjene unutarstanične razine kalcija te posljedične hiperproliferacije keratinocita
- povećanje unutar stanične fosforilacije i kinaznih kaskada u T stanicama (litij, beta blokatori) (68)
- povećanje sinteze IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-17, TNF- $\alpha$  i INF- $\gamma$  nakon primjene litija (65, 66)
- inhibicija epidermalne transglutaminaze i promjene vezane uz diferencijaciju i proliferaciju epidermalnih stanica nakon terapije antimalaricima; hidroksiklorokin/klorokin (60)
- povećanje razine leukotriena u pozadini NSAID terapije (61)
- povećanje razine kinina, aktivacije kalikrein-kinin osovine i njezinih neposrednih učinaka na razvoj tip 17 imunskog odgovora i proliferaciju keratinocita u pozadini terapije ACE inhibitorima (63)
- aktivacija IL23/IL17 osovine i sinteze INF- $\gamma$  nakon primjene imikvimod reagensa i TNF- $\alpha$  inhibitora (64)

Predložene teorije mehanizama inkriminirajućih lijekova vezane su, dakle, uz diferencijaciju i funkciju keratinocita i imunskih stanica u koži, i dijelom daju naslutiti identitet ključnih igrača i događaja koji prethode pojavi prvih simptoma i razvoju psorijaze.

### *Stres*

Stres se također ubraja u skupinu okolišnih čimbenika koji pridonose razvoju psorijaze; a i sama psorijaza zauzvrat predstavlja stres za pacijenta. Nedavna meta-analiza na uzorku 39 studija, međutim, nije potvrdila čvrstu uzročno-posljedičnu vezu između psihološkog stresa i pogoršanja ili početka psorijaze (69). Unatoč tome, brojne retrospektivne studije, utemeljene na podacima prikupljenima prisjećanjem pacijenata, bilježe visok postotak oboljelih s pozitivnom anamnezom stresnih događaja prije neposrednog početka (40 %) ili recidiva (80 %) psorijaze (70). Točan mehanizam ili mehanizmi kojima stres uzrokuje nastanak i razvoj psorijaze i danas su nedovoljno razjašnjeni. Poznato je ipak da su generalni učinci stresa vezani

uz aktivaciju simpatičko-adrenalno-medularne i hipotalamičko-hipofizne-nadbubrežne osovine (HPA, od engl. *hypothalamic–pituitary–adrenal axis*) te isprepleteni s funkcijom imunološkog sustava.

U tom kontekstu, poznato je da kortikotropin oslobađajući hormon (CRH, od eng. *corticotropin releasing hormone*), koji se otpušta aktivacijom HPA osi, i posreduje sistemski odgovor na stres, ima potencijalnu ulogu i u nastanku PV. Naime, u psorijatičnim lezijama zabilježena je povećana ekspresija CRH (71), a *in vitro* analize potvrđuju neposrednu ulogu CRH kao inicijatora sinteze proupalnih citokina IL-6 i IL-11 u staničnim linijama humanih keratinocita (72).

Stres može djelovati i na promjene perifernih udjela imunskih stanica pa je tako u krvi PV ispitanika pod utjecajem induciranog psihološkog stresa, zabilježen promijenjeni citokinski profil i povećan udio CD4<sup>+</sup> limfocita i monocita (73), kao i NK stanica te CD3<sup>+</sup> limfocita koji na svojoj površini izražavaju kutane limfocitne antigene (CLA, od engl. *cutaneous lymphocyte-associated antigens*) odgovorne za udomljavanje perifernih imunskih linija u koži oboljelih (74).

### *Mikroorganizmi*

Mikroorganizmi (bakterije, virusi i gljive) često se opisuju kao potencijalni okidači imunološke kaskade koja dovodi do nastanka i razvoja psorijaze.

Tonzilarna infekcija beta hemolitičkim streptokokom grupe A povezuje se s pojavom ili pogoršanjem simptoma psorijaze; prije svega eruptivnog odnosno kapljičastog oblika bolesti. Potencijalni uzročni mehanizmi streptokokne infekcije vezani su uz M protein i pirogeni egzotoksin, tzv. superantigene beta hemolitičkog streptokoka, koji vezanjem za varijabilnu regiju beta lanca (V $\beta$ ) T staničnog receptora (TCR, od engl. *T cell receptor*) uzrokuju aktivaciju i klonalnu ekspanziju CLA<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> i CLA<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T limfocita, koji pak tragom selektinskih liganada migriraju u kožu (75, 76). Aktivirani T limfociti koji prepoznaju M6 protein beta hemolitičkog streptokoka mogu, radi strukturalne sličnosti, križno reagirati s epidermalnim keratinom te na taj način potaknuti kaskadu autoreaktivnih događaja koji će u konačnici rezultirati pojavom psorijaze (77).

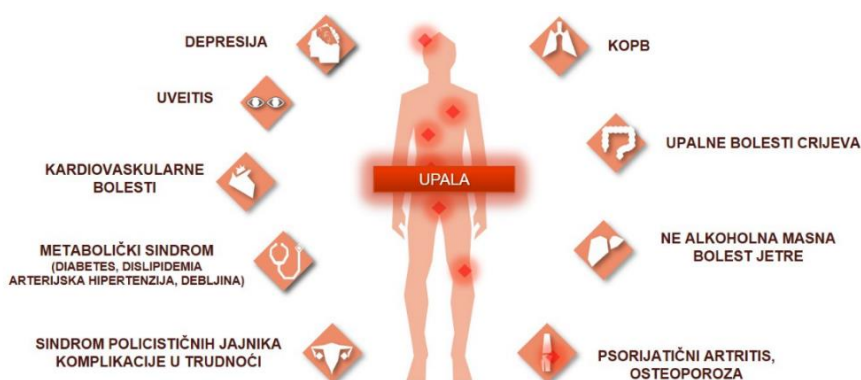
U skupinu mikroorganizama koji posreduju slične patološke učinke svrstavaju se i *Staphylococcus aureus*, *Malassezia*, *Candida*, virus humane imunodeficijencije te humani endogeni retrovirusi (59).

## Trauma

Koebnerov fenomen ili fenomen izomorfno podražaja (od grčke riječi *iso* što znači jednako te *morphosis* što znači formirati ili oblikovati) prvi je opisao Heinrich Koebner, 1877 godine. Pojam podrazumijeva nastanak morfe/promjene, karakteristične za određenu dermatozu, kao odgovor na traumu zdrave kože (78).

Iako predstavlja kliničko obilježje psorijaze, Koebnerov fenomen nije patognomoničan za psorijazu već se može javiti i u sklopu drugih dermatoz (lichen planus, vitiligo, verruce plane, lichen sclerosus, itd.) (79). Točan mehanizam nastanka traumom induciranih promjena nije poznat, ali postoji nekoliko teorija. Uočeno je da se Koebnerov fenomen kod bolesnika s psorijazom češće javlja ukoliko su kod oboljelih prisutni i drugi čimbenici poput genske predispozicije, slabog terapijskog odgovora u mlađoj dobi, izloženosti psihološkom stresu ili hladnoći (79). Nadalje, za puni izražaj simptoma nakon traume, potrebno je istodobno oštećenje epidermisa i dermisa, posljedično povećanje udjela CD4<sup>+</sup>T limfocita, promjena mikrovaskularne opskrbe papilarnog dermisa i povećana sinteza čimbenika živčanog rasta. Navedene promjene zatim uzrokuju proliferaciju keratonocita, degranulaciju mastocita, aktivaciju i udomljavanje T limfocita u oštećenim regijama kože (79, 80).

### 1.4 Komorbiditeti



**Slika 1.4. Psorijaza i komorbiditeti.**

*Autorski rad doktorantice napravljen pomoću računalnog programa Microsoft PowerPoint 2019. KOPB – kronična obstruktivna bolest pluća*

Psorijaza se često javlja u pratnji brojnih drugih oboljenja ili komorbiditeta (Slika 1.4.). U podlozi svih komorbiditeta povezanih s psorijazom nalazi se sterilna upala koja je posljedica

imunološki posredovanih mehanizama zajedničkih i psorijazi i pratećim komorbiditetima. Između psorijaze te komorbiditeta, stoga, nastaje začarani upalni krug koji dovodi do međusobnog pogoršanja svih vezanih bolesti (81).

Psorijaza je udružena s metaboličkim sindromom obilježenim povišenim arterijskim tlakom, dislipidemijom, pretilošću te inzulinskom intolerancijom, što povećava rizik od kardiovaskularnih bolesti te dijabetesa tipa II (82). Osim toga, psorijaza je nezavisni rizični čimbenik za razvoj infarkta miokarda, osobito kod mlađih osoba (83). Povećana je također vjerojatnost upalnih bolesti crijeva (Chronove bolesti i ulceroznog kolitisa), koje zajedno s psorijazom dijele 7 rizičnih genskih lokusa (84), kao i imunološke mehanizme u podlozi nastanka bolesti. (85).

Povišene vrijednosti TNF- $\alpha$  i IL-6, neovisno o pridruženim upalnim bolestima, često se nalaze u podlozi depresije koja se pojavljuje kod čak 60 % oboljelih od psorijaze (86, 87). Uveitis se javlja kod 2 % osoba oboljelih od PV s prisutnim psorijatičnim artritismom (88). Također učestalije je prisutan nealkoholni steatohepatitis, KOPB i ostali (Slika 1.4.). Važno je naglasiti i učestalost psorijatičnog artritisa, koji, iako usko povezan s psorijazom, predstavlja zasebni entitet. S obzirom na učinkovitost istovjetne biološke terapije, psorijaza i psorijatični artritis očito dijele dio istovjetne imunološke mehanizme u svojoj patogenezi (89), međutim, klinički simptomi i rezultati GWAS ukazuju na različitu etiologiju u razvoju ovih srodnih oboljenja (90). Što se tiče gena unutar MHC sustava, prisutnost HLA - Cw6, HLA - B13, HLA - B7 povezana je s pojavnošću psorijaze, dok je prisutnost HLA - B27, HLA - B39 povezana s većom vjerojatnošću oboljevanja od psorijatičnog artritisa (91, 92)

## 1.5 Imunološki sustav i koža

Imunološki je sustav kompleksni sustav organa, tkiva i stanica čija je uloga vezana uz očuvanje integriteta i zaštitu ljudskog organizma. Pri susretu sa stranim tvarima (antigenima), naš organizam reagira aktivacijom brzih, efektorskih linija urođene imunosti, koje izravno djeluju na neposredne prijetnje i osiguravaju vrijeme potrebno za razvoj adaptivnog imunskog odgovora na specifične antigene. Djelovanje urođene i stečene imunosti međusobno je zavisno; stanice urođenog imunološkog sustava na prvoj liniji obrane organizma modeliraju efektorski odgovor stečene imunosti adekvatnom obradom i prezentacijom patogenih peptidnih antigena u sklopu MHC molekula, akumulirajući na jednom mjestu sve znakove koji bi mogli narušiti integritet organizma (93).

Međusobnu komunikaciju urođene i stečene imunosti potpomažu stanice koje izražavaju fenotipska i funkcionalna obilježja oba imunosna razreda pa se stoga nazivaju nekonvencionalnim ili tranzicijskim stanicama. Ove linije čine „most“ između urođenog i stečenog imunološkog sustava omogućujući njihovo međusobno sinkrono djelovanje. U nekonvencionalne imunosne vrste ubrajamo sluznicama pridružene invarijantne T (MAIT, od engl. *Mucosal-associated invariant T*) limfocite koje zajedno s  $\gamma\delta$  T stanicama te invarijantnim prirodnoubilačkim T stanicama (iNKT, od engl. *invariant natural killer T cells*) posreduju brze efektorske odgovore izlučivanjem upalnih citokina (INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-22), citotoksičnih enzima i medijatora (perforini, granzimi). Njihova aktivacija u uvjetima upalnog miljea može se odvijati bez prethodnog kontakta s antigenom, ali može biti i potaknuta prepoznavanjem specifičnih, nepeptidnih antigena u kompleksu s neklasičnim MHC molekulama poput CD1d, CD1c ili molekula povezanih s MHC 1 (MR1, od engl. Major Histocompatibility Complex I-related gene protein) (94).

Zdrava koža udomljava raznolike imunosne stanice, pri čemu epidermis naseljavaju Langerhansove stanice i CD8<sup>+</sup> limfocitne populacije, retikularni dermis limfociti B, a dermis uglavnom dermalne dendritičke stanice, eozinofili, makrofazi, mastociti, CD4<sup>+</sup> limfociti te prirodne limfocitne (MAIT i  $\gamma\delta$ T) i limfoidne linije (ILC) imunosnih stanica (95, 96). Zajedno s keratinocitima i fibroblastima, navedene imunosne populacije pridonose pravilnoj funkciji i homeostazi ključnih fizioloških procesa u koži (održavanje hidro - elektrolitske ravnoteže, termoregulaciji, fotoprotekciji, sintezi vitamina D, skladištenju masti i vode), djelujući prvenstveno u zaštiti organizma od nepovoljnih egzogenih utjecaja (13, 97).

## 1.6 Imunopatogeneza psorijaze

### 1.6.1 Inicijacija

Kod genetski predisponiranih osoba, pod utjecajem stresnih okolišnih čimbenika (vanjskih i sustavnih) koji narušavaju funkciju ili integritet kožne barijere, dolazi do stvaranja i/ili oslobađanja molekularnih obrazaca povezanih s oštećenjem tkiva (DAMPs, od engl. *Damage-Associated Molecular Patterns*) i/ili s patogenim mikroorganizmima (PAMPs, od engl. *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) (25).

PAMPs jesu esencijalne, vrlo konzervirane građevne jedinice mikroorganizama koje se u fiziološkim uvjetima ne nalaze u ljudskom organizmu i predstavljaju egzogeni signal za



aktivaciju imunološkog sustava. DAMPs se pak oslobađaju oštećenjem vlastitih stanica i stoga djeluju kao endogeni signali koji primarno aktiviraju stanice urođenog imunološkog sustava, vežući se na njihove receptore za prepoznavanje molekularnih obrazaca (PRRs, od engl. *pattern recognition receptors*) (98, 99).

Oštećenjem i/ili smrću keratinocita oslobađaju se DAMPs, prvenstveno kationski antimikrobni proteini katelicidini (CAMP/LL-37), a potom i dijelovi RNA i DNA molekula, koje nakon apoptoze keratinocita tvore LL-37-DNA i/ili LL-37-RNA komplekse (100, 101). Nastale DAMPs i/ili PAMPs komplekse prepoznaju receptori nalik Toll proteinu (TLRs, od engl. *toll-like receptors*), posebice TLR7, TLR8, i TLR9 pripadnici PRR obitelji na površini DC stanica, koji zatim potiču ekspresiju NF- $\kappa$ B i posljedičnu transkripciju proupalnih citokina, kemokina i adhezijskih molekula čime započinje upalna kaskada u koži (102).

Usljed upale, tragom dermalnog adipocitokina kemerina, u dermisu se udomljavaju pDC, koje su odsutne u zdravoj koži, a u uvjetima upale proizvode IFN- $\alpha$  i INF- $\beta$  (102, 103). Zajedno s DAMPs i PAMPs, interferoni, IL-1 $\beta$ , IL-6 i TNF- $\alpha$  stimuliraju sazrijevanje mijeloidnih dermalnih dendritičkih stanica (DDC) (104) i neklasičnih DC linija koje proizvode inducibilnu dušik-oxid sintazu (iNOS, od engl. *inducible nitric-oxide synthase*), TNF- $\alpha$ , IL-20 i IL-23 (105). Oslobođeni katelicidin LL37 potiče keratinocite na sintezu i izlučivanje IL-8 (CXCL8), IL-18 (CXCL1), CXCL10 i CCL20 (MIP-3 $\alpha$ ), i time pospješuje pojačanu kemotaksiju perifernih neutrofila, T limfocita, DC te Th17 stanica (106).

Tragom oslobođenih kemokina, kožu u inicijalnoj fazi upale naseljava veliki broj neutrofila. Aktivacija neutrofila uzrokuje nalet („respiratory burst“) reaktivnih metabolita kisika (ROS, od engl. *reactive oxygen species*), degranulaciju neutrofila te formiranje neutrofilnih izvanstaničnih/ekstracelularnih zamki (NETs, od eng. *neutrophil extracellular traps*) građenih od nuklearnog i granularnog neutrofilnog sadržaja, metaloproteinaza i antimikrobnih proteina. (107). Nastale NETs mogu sadržavati i LL37 te služiti u svrhu kontinuirane aktivacije pDC (108). Štoviše, neutrofil i mastociti putem NETs oslobađaju IL-17 (108), a nastale ROS molekule pojačavaju aktivaciju limfocita T (107).

Nadalje, DC aktivirane vezanjem PPR-a s DAMPs i PAMPs putuju iz kože u regionalne limfne čvorove gdje potencijalno posreduju aktivaciju autoreaktivnih naivnih Th0 pomoćničkih (od engl. *helper T cell*) limfocita usmjerenih protiv koži svojstvenih autoantigena poput katelicidina LL37, ADAMTS-sličan protein 5 (ADAMTSL5, od engl. *disintegrin-like and metalloprotease domain containing thrombospondin type 1 motif-like 5*), PLA2G4D (od engl. *phospholipase A2 group IVD*) i keratina 17 (95, 109). Pod utjecajem citokina koje

otpuštaju aktivirane DC dolazi do specifične diferencijacije Th limfocita, pri čemu IL-12 usmjerava diferencijaciju Th0 u Th1 sekretorne linije (IFN $\gamma$  i TNF $\alpha$ ), dok IL-23 stimulira diferencijaciju Th0 u Th17 (IL-17) i Th22 pomoćničke vrste (IL-22); diferencirani limfociti potom se sele u kožu, gdje pospješuju nastavak upale, odnosno formiranje psorijatičnog plaka (95).

Migracija i udomljavanje aktiviranih Th stanica u koži odvija se kemotaksijom, tragom kemokinskih liganada (keratinociti, DC, endotelne stanice) i adhezijskih molekula izraženih na površini aktiviranih endotelnih stanica u koži. Ključnu ulogu u tim procesima imaju limfocitni receptori poput CLA, CCR10 i CCR6, koji prepoznaju i vežu ligandne molekule E selektina (110), kemokina CCL27 (111) i CCL20, koje pak izlučuju keratinociti stimulirani djelovanjem IL-1  $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$ , IL-17 i INF- $\gamma$  (112, 113). Upalni mikrookoliš u psorijatičnim lezijama utječe i na funkcionalnost CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (engl. *Forkhead box p3*) Treg limfocita (od engl. Regulatory T cells), pa dolazi do neučinkovite inhibicije i posljedičnog pogoršanja autoreaktivnog imunološkog odgovora (25).

Sve veća pažnja u patogenezi psorijaze pridodaje se prirođenim limfoidnim stanicama, prvenstveno ILC3 stanicama koje svojim transkripcijskim profilom i citokinskim obilježjima nalikuju Th17 stanicama. Ove prirodene linije izražavaju receptore prirodne citotoksičnosti NKp44, transkripcijski čimbenik ROR $\gamma$ t te čine važan izvor IL-22 i IL-17 u koži i krvi oboljelih od PV (114).

### 1.6.2 Formacija i “održavanje”/perzistiranje psorijatičnog plaka

Klinička slika psorijaze odraz je histoloških promjena prvenstveno kao posljedica 1) kvantitativnih (hiperkeratoza, hipogranuloza, agranuloza) i kvalitativnih (parakeratoza) obilježja keratinocita uz pojavu akantoze, 2) prisutnosti upalnog infiltrata te 3) pojačane angiogeneze, dilatacije, zavojitosti (tortuoznosti) te propusnosti krvnih žila papilarnog dermisa.

Psorijatične promjene na koži velikim su dijelom posredovane promjenama u vaskularnom odjeljku kože, kao rezultat pojačanog lučenja VEGF u osoba oboljelih od PV (115). Proangiogenički učinak imaju i ranije opisani citokini poput TNF- $\alpha$ , IL-8 i IL-17 (116). Dušikov oksid kao neposredni produkt iNOS koji oslobađaju aktivirane upalne DDC, uzrokuje vazodilataciju krvnih žila (105), a TNF- $\alpha$  (105) i IL-6 (117) potiču okolne keratinocite na ekspresiju E – selektina, ICAM1 i VCAM1 adhezijskih molekula koje omogućavaju udomljavanje perifernih T limfocita u koži (117).

Diferencirani limfociti iz limfnih čvorova tragom mreže oslobođenih citokina i kemokina migriraju na mjesto nastanka DAMPs i/ili PAMPs te u međusobnoj interakciji s rezidualnim imunskim i ne-immunosnim stanicama, pospješuju stvaranje upalnog miljea. U skladu s navedenim, u psorijatičnim lezijama i perifernoj krvi oboljelih od psorijaze, zabilježen je povećan broj CD4<sup>+</sup> Th1 limfocita, CD4<sup>+</sup> Th17 limfocita, CD4<sup>+</sup>Th22 limfocita i CD8<sup>+</sup> citotoksičnih stanica tipa 1, 17 i 22 (Tc1, Tc17, Tc22), kao i povišene vrijednosti njihovih karakterističnih citokina IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-17A, TNF- $\alpha$ , IL-12 i IL-22. (118 – 121).

Donedavno psorijaza je smatrana bolešću čija je pojava uglavnom vezana uz abnormalno djelovanje tip I imunskih stanica, međutim, danas je poznato da citokini IL-17 i IL-23 čine centralnu okosnicu upale koja pridonosi formiranju psorijatičnog plaka (122).

IL-23 jest proupalni heterodimerični citokin, dio obitelji IL-12 citokina, s kojim zajedno dijeli p40 (IL-12p40) podjedinicu, ali ne i podjedinicu p19 (IL-23p19) koja je patognomonična samo za IL-23 (123, 124). Interleukin-23 produkt je aktiviranih DC, makrofaga i monocita te vezanjem za pripadajuće receptore (IL23R, IL12R $\beta$ 1) na površini ciljnih stanica potiče razvoj i ekspanziju IL-17 producirajućih imunskih vrsta urođenog i stečenog imunološkog sustava (125). Osim navedenih antigenskih prezentirajućih stanica, IL-23 proizvode i aktivirani keratinociti, a isti potiče i sintezu IFN- $\gamma$  od strane memorijskih T stanica. Interferon- $\gamma$  zatim stimulira ekspresiju receptora IL-12R te time omogućava diferencijaciju CD4<sup>+</sup> Th1/Tc1 limfocita (126, 127). Interleukin-23 posreduje i aktivaciju Th22 stanica, koje obilježava lučenje IL-22 i ekspresija kemokinskih receptora (CCR10, CCR6, CCR4) koji usmjeravaju aktivirane stanice na mjesta upale u koži (25, 118). Lučenje IL-22 u koži, inhibira diferencijaciju keratinocita, i potiče sintezu antimikrobnih peptida koji imaju važnu ulogu u aktivaciji i kemotaksiji neutrofila (25).

IL-17 homodimerični je (ili herterodimerični) glikoprotein u čiju obitelj ubrajamo 6 članova (IL-17A (IL-17 ili CTLA-8), -17B (CX1/NERF), -17C (CX2), -17D /IL-27), -17E (IL-25), i -17F (ML-1)) (128). U psorijatičnim lezijama uočena je povećana sinteza glasničke RNA (mRNA, od engl. *messenger RNA*) citokina IL-17A, IL-17C i IL-17F (129). Izvori IL-17 u koži su, međutim, brojni te uključuju pripadnike adaptivnog (T limfociti) i urođenog (mastociti, ILC, neutrofili) (130) imunološkog sustava, kao i urođene limfocitne linije, preciznije MAIT i  $\gamma\delta$  T limfocite. Povećana razina IL-17 u koži, stimulira keratinocite na proizvodnju i lučenje antimikrobnih peptida (katelicidina/LL37, proteina S100 obitelji: S100A7/psoriasin, S100A8 i S1009 zajedno formiraju kalpoptektin,  $\beta$  defensin 4) koji produbljuju upalu. U tom kontekstu, LL37 potiče sintezu kemokinskih liganda IL-8 (CXCL8), IL-18 (CXCL1) i CXCL10 (IP10) te posljedičnu kemotaksiju CXCR2<sup>+</sup> neutrofila (106) i CXCL10 (IP10)<sup>+</sup> Th1/Tc1 limfocita (131).

Aktivirani keratinociti otpuštaju i  $\beta$  defensin A (132) te CCL20 kemokinski ligand, koji zatim pospješuju migraciju i udomljavanje CCR6<sup>+</sup> DC i Th17/Tc17 stanica (106, 133).

S100 proteini također stimuliraju izražaj brojnih kemokinskih liganada (IL-8 (CXCL8), IL-18 (CXCL1, CXCL2, CXCL3, CCL20) i upalnih citokina (IL-6 i TNF- $\alpha$ ) koji pak, mehanizmom pozitivne povratne sprege, potiču širenje upalnog mikrookoliša (134), hiperproliferaciju i abnormalnu diferencijaciju keratinocita (135).

Osim infiltrirajućih imunosnih vrsta, CLA<sup>+</sup> memorijske T stanice koje obitavaju u tkivu (od engl. *Tissue-resident memory T (Trm) cells*), igraju potencijalno važnu ulogu u nastanku i širenju psorijatičnih lezija. Ovu hipotezu podupiru rezultati animalnih studija, u kojima su dijelovi nezahvaćene kože oboljelih od PV transplantirani na imunodeficijentne mišje modele bez mogućnosti sinteze limfocita T, B i NK stanica (IFNA<sup>-/-</sup>, IFNB<sup>-/-</sup> i RAG<sup>-/-</sup> (od engl. *recombination activating gene 2*). Unatoč izostanku ključnih imunosnih komponenti, miševi koji su primili ksenograft kože spontano razvijaju psorijatične lezije, uz olakšanje simptoma tek nakon primjene anti-TNF- $\alpha$  terapije (136). Ovi eksperimenti sugeriraju ključnu ulogu rezidualnih imunosnih stanica, čija je proliferacija u psorijazi ovisna o lokalnoj proizvodnji TNF- $\alpha$ .

Važnost tip 1 i tip 17 imunosnog odgovora u psorijazi potvrđuje i uspješnost humanih bioloških terapijskih pripravaka usmjerenih protiv TNF- $\alpha$ , IL-12/IL-23, IL-17A i IL-23. Međutim, prestankom terapije, upalni se mehanizmi reaktiviraju i uzrokuju recidiv kožnih promjena. Povratak kožnih lezija nakon prestanka terapije čini se posreduju patogene, rezidualne T stanične populacije, koje pokazuju oligoklonalni repertoar TCR receptora, izlučuju IL-17 i trajno naseljavaju kožne lezije oboljelih od psorijaze (137).

Među njima, nekonvencionalni efektori prirođenog imunosnog odgovora, posebice  $\gamma\delta$  T-limfociti i CD3+MR1+TCR-V $\alpha$ 7.2+PLZF+ROR $\gamma$ t+ MAIT stanice imaju potencijalno važnu, ali nedovoljno poznatu ulogu u inicijaciji i razvoju vulgarne psorijaze (138 – 140).

## 1.7 MAIT limfociti

MAIT stanice prvi se put spominju 1993. godine, kao nova populacija CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> dvostruko negativnih (DN, od engl. *double-negative*) limfocita T, koji izražavaju ograničeni repertoar  $\alpha\beta$ TCR lanaca (141). Naziv MAIT dobili su 2003. godine temeljem brojnosti ove populacije u lamini proprijii probavnog sustava. Osim u crijevnoj sluznici, MAIT stanice prisutne su i u drugim tkivima i organima koji se nalaze na mjestima izravnog kontakta sa

stranim antigenima, poput pluća (142), ženskog genitalnog sustava (uterus, cerviks) (143), krvi i koži (144) te jetri, gdje čine trećinu prisutnih limfocita (145) i masnom tkivu (146).

MAIT stanice čine približno 1-10 % ukupne populacije perifernih limfocita T te većinu populacije CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> T stanica u perifernoj krvi (147). Posreduju homeostatske i obrambene funkcije u zdravom organizmu, infektivnim i neinfektivnim bolestima (148). MAIT stanice izražavaju ograničeni repertoar T staničnih receptora, nastalih rekombinacijom nekolicine gena V (TRAV1-2) i J (TRAJ33, TRAJ12 ili TRAJ22) prilikom sinteze  $\alpha$ -lanca, odnosno preslagivanjem gena TRBV, TRBD i TRBJ pridruženih  $\beta$  lanaca (141). Osim semi-invarijantnog TCR (Va7.2) receptora, MAIT stanice također izražavaju visoke razine tzv. surogat biljega poput receptora nalik C-tipu lektina CD161, i IL-18R $\alpha$ , koji su donedavno korišteni u svrhu imunofenotipizacije MAIT stanica, unatoč činjenici da je njihova ekspresija zabilježena i kod drugih limfocitnih linija poput konvencionalnih  $\alpha\beta$  CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup>, NK i NKT stanica (149). Većina su MAIT stanica, međutim, CD4<sup>-</sup>CD8 $\alpha\alpha$ <sup>+</sup> (35 %) i CD4<sup>-</sup>CD8 $\alpha\beta$ <sup>+</sup> (45 %) te dvostruko negativne CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> stanice (15 %), izraženog efekterskog memorijskog fenotipa (CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>CD28<sup>+</sup>), a tek manji dio MAIT populacije čine CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> (1.3 %) i dvostruko pozitivne CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> DP (od engl. *double positive*) MAIT stanice (1.3 %) (94, 149). Osim prethodno navedenih, klasičnih MAIT stanica, kod ljudi su prisutne i atipične MR1<sup>+</sup>TCRVa7.2<sup>-</sup> MAIT vrste (150).

MAIT stanice prepoznaju nepeptidne mikrobne antigene, najčešće derivate bakterijskog metabolizma riboflavina, vezane u kompleksu s MR1 antigen prezentirajućim molekulama. Osim aktivacije vezane uz spregu T staničnog receptora i antigen-MR1 kompleksa, MAIT stanice pokazuju sposobnost antigen neovisne aktivacije, nalik onoj koju susrećemo kod prirođenih imunskih vrsta. U tom kontekstu, MAIT stanice pokazuju više modaliteta TCR neovisne aktivacije, koji ovise o združenom djelovanju različitih TLR liganada i citokina poput IL-1, IL-7, IL1-2, IL-15, IL-18 i IL-23 (150). Nakon aktivacije, MAIT stanice posreduju brze i izravne antimikrobne odnosno proupalne učinke otpuštanjem citokina IL-17, INF- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  (151), ključnih medijatora upalnih procesa u psorijazi.

Razvojem efekterskog programa MAIT stanica upravljaju transkripcijski čimbenici poput PLZF (od engl. *promyelocytic leukemia zinc finger*), ROR $\gamma$ t (kodiran genom *RORC*, od engl. *retinoic-acid-receptor-related Orphan Receptor C*), T-bet (od engl. *T-box expressed in T cells*), EOMES (od engl. *Eomesodermin*) i RUNX3 (od engl. *runt-related transcription factor 3*), kao izravni posrednici ekspresije IL-17A i INF- $\gamma$ , kemokinskog receptora CCR6, te granularnih proteaza poput granzima B (GZMB) (152, 153).

Brojnost i fenotipska obilježja MAIT stanica mijenjaju se također u ovisnosti o dobi, spolu, infektivnim i neinfektivnim stanjima. Sukladno navedenom, periferni udjeli MAIT stanica rastu od rođenja i dostižu maksimum u dobi od 25 do 30 godina starosti (154). Njihova brojnost potom opada pa kod starijih od 80 godina čine desetinu vrijednosti broja koji je zabilježen kod osoba reproduktivne dobi (154). Negativan učinak dobi na brojnost MAIT stanica u krvi, može se djelomično objasniti fiziološkom involucijom timusa i smanjenim lučenjem spolnih hormona koji utječu na brojnost i raspodjelu i drugih imunskih populacija (154, 155). U tom kontekstu, kod starijih osoba zabilježen je smanjeni udio  $CD4^+ CD8\alpha\alpha^+$  MAIT stanica koje pak izražavaju memorijski fenotip,  $CD45RA^- CD45RO^+$  (154). S druge strane, znatno veći broj MAIT stanica uočeni su u perifernoj krvi osoba reproduktivne dobi (15 - 50 godina), posebice osoba ženskog spola koje imaju značajno veće udjele u odnosu na muškarce iste dobi (154, 155). Pušenje (156), debljina i dijabetes tipa 2 povezani su sa smanjenim udjelima MAIT stanica u perifernoj krvi (146, 157). Smanjeni periferni udjeli MAIT stanica zabilježeni su i kod različitih autoimunih bolesti (multiple skleroze, upalne bolesti crijeva, sistemskog eritemskog lupusa, reumatoidnog artritisa, astme), posebice prilikom pogoršanja simptoma, potencijalno kao posljedica redistribucije MAIT stanica iz periferne krvi u upalna tkiva (158 - 161). Slični obrasci redistribucije perifernih MAIT stanica zabilježeni su i uslijed infekcije *Mycobacterium tuberculosis* (162), citomegalovirusom (CMV), virusom hepatitisa B i C (HBV i HCV) (163) te u pojedinim malignim oboljenjima (164).

## 1.8 Uloga MAIT limfocita u psorijazi

Unatoč poboljšanom razumijevanju fenotipa i funkcije MAIT stanica, njihova uloga u psorijazi gotovo je u potpunosti neistražena. Dosadašnji rezultati, utemeljeni na analizi surogat biljega u jednoj studiji, opisuju podjednake udjele  $CD8^+ CD161^+ TCRV\alpha 7.2^+$  stanica u koži zdravih i oboljelih ispitanika, čije periferne  $CD8^+ IL-17^+$  i  $CD8^+ IL-22^+$  populacije izražavaju povećanu ekspresiju CLA pozitivno korelirajući s težinom oboljenja i veličinom PASI indeksa (163). Zabilježeni obrasci neprecizno odražavaju MAIT frekvencije jer pojedine linije adaptivnih T populacija također eksprimiraju  $CD161$  i  $TCRV\alpha 7.2$  (149). U tom kontekstu, točan udio MAIT stanica u  $CD8^+ IL-17^+$ ,  $CD8^+ INF-\gamma^+$  i  $CD8^+ IL-22^+$  populaciji T stanica koje zajedno čine značajan dio limfocitnog infiltrata u koži oboljelih od psorijaze (119,121) ostaje nepoznat, kao i stvarni doprinos nekonvencionalnih izvora IL-17 patologiji psorijaze. Studije

MAIT stanica u kontekstu drugih autoimunih oboljenja, poput multiple skleroze (165), dijabetesa (166) i ankiloznog spondilitisa (167) opisuju deficit perifernih CD161<sup>+</sup>V $\alpha$ 7.2<sup>+</sup> T populacija, koje u većem broju naseljavaju mjesta upale i posreduju brze efektorske učinke izlučivanjem INF- $\gamma$  i IL-17. Istovjetni rezultati prikazani su i u kontekstu psorijatičnog artritisa (168). MAIT stanice također pokazuju sposobnost TCR-neovisne aktivacije i izlučivanja IL-17 u kontaktu s upalnim mikrookolišem obogaćenim citokinima poput IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-15 i IL-18. Opisani obrasci nalikuju upalnim uvjetima zabilježenim u psorijatičnim lezijama, ali specifični frekvencijski udjeli, migratorni obrasci i izvršni kapaciteti klasičnih MR1<sup>+</sup>TCRV $\alpha$ 7.2<sup>+</sup> te atipičnih MR1<sup>+</sup>TCRV $\alpha$ 7.2<sup>-</sup> MAIT stanica u psorijazi još uvijek su nerazjašnjeni. Jednako tako, u potpunosti je nepoznata uloga promjene specifičnih transkripcijskih čimbenika i površinskih receptora u inicijaciji i razvoju obilježja bolesti.

## 1.9 $\gamma\delta$ T stanice

$\gamma\delta$  T limfociti pripadaju skupini nekonvencionalnih T stanica koje posjeduju ograničeni spektar TCR klonotipova nastalih rekombinacijom V (14 za  $\gamma$ -lanac, 8 za  $\delta$ -lanac), D (3 samo za  $\delta$ -lanac) i J (5 za  $\gamma$ -lanac, 4 za  $\delta$ -lanac) genskih varijanti smještenih unutar lokusa TRG (7p15-p14) i TRD (14q11.2). S obzirom na brojnost, tkivnu preraspodjelu i raznolikost  $\gamma$  i  $\delta$  TCR lanaca, unutar odjeljka  $\gamma\delta$  T limfocita razlikujemo nekoliko subpopulacija (169). Kod čovjeka pronalazimo dvije osnovne subpopulacije  $\gamma\delta$  T stanica: V $\delta$ 1 stanice, uglavnom prisutne u tkivima i timusu te V $\delta$ 2 limfocite koji čine većinu krvne  $\gamma\delta$  T populacije i najčešće koeksprimiraju V $\gamma$ 9 lanac (170). U manjem broju prisutne su i V $\delta$ 3 stanice koje čine 0,2 % svih cirkulirajućih limfocita te V $\delta$ 4, V $\delta$ 5, V $\delta$ 6, V $\delta$ 7 i V $\delta$ 8 stanice čija se uloga tek u potpunosti treba razjasniti (171). Različiti podskupovi  $\gamma\delta$  T stanica u cirkulaciji mogu se ujedno razlikovati na temelju razine ekspresije  $\gamma\delta$  T staničnog receptora i CD3 koreceptorskih molekula, pri čemu  $\gamma\delta^{\text{int}}$  izražavaju veći, a  $\gamma\delta^{\text{hi}}$  stanice manji broj CD3 molekula. Populacija  $\gamma\delta^{\text{int}}$  stanica obuhvaća većinu V $\delta$ 2 krvne populacije, a unutar  $\gamma\delta^{\text{hi}}$  podskupine uglavnom su prisutne V $\delta$ 1 i V $\delta$ 3 subpopulacije (172, 173).

$\gamma\delta$  T limfociti prepoznaju široki spektar nepeptidnih, stranih, ali i vlastitih fosforiliranih lipidnih antigena vezanih u kompleksu s neklasičnim antigen prezentirajućim molekulama poput BTN3A1 (od engl. *butyrophilin subfamily 3 member A1*), CD1c ili CD1d. BTN3A1 najčešće služe pri aktivaciji V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T stanica (174), a CD1 varijante često se povezuju s aktivacijom V $\delta$ 1 subpopulacija (175). Osim fosfoantigena,  $\gamma\delta$  T stanice prepoznaju različite

molekularne indikatore stresnih okolišnih događaja, uključujući ligande prirodnoubilačkih NKG2D (od engl. *natural killer group 2, membrane D*) receptora, pri čemu posreduju direktne citotoksične učinke lučenjem topljivih medijatora, granzima i perforina (93). Sposobne su, također, putem TLR receptora vezati oslobođene DAMP i PAMP molekule, pri čemu pospješuju širenje upalnih signala lučenjem citokina INF- $\gamma$  i IL-17. Nalik na MAIT stanice,  $\gamma\delta$  T limfociti pokazuju svojstvo TCR neovisne aktivacije u uvjetima upalnog mikrookoliša, pri čemu povećane razine IL-12, IL-15 i IL-18 potiču sintezu i lučenje INF- $\gamma$  (153).

$\gamma\delta$  T stanice izražavaju raznolike funkcijske modalitete kojima upravljaju različiti transkripcijski čimbenici. U naivnih, timusnih vrsta pri susretu s fosforiliranim antigenima u prisutnosti IL-2 i IL-15, dolazi do izražaja T-box transkripcijskih čimbenika (T-bet) i *Eomesodermin* (Eomes) koji stimuliraju lučenje INF- $\gamma$  (176). Periferne V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 mogu pak u kontekstu IL-7 (177), IL-23 i TCR stimulacije diferencirati u IL-17<sup>+</sup> INF- $\gamma$  populacije (178). U okviru redovite epitelne funkcije u zdravom organizmu,  $\gamma\delta$ T limfociti posreduju zaštitne, regenerativne i antitumorske učinke, ekspresijom proteolitičkih enzima (granzima i perforina), inzulinu sličnog čimbenika rasta (IGF-1, od engl. *insulin like growth factor*) i proapoptotskih receptora poput FasL i TRAIL (od engl. *TNF-released apoptosis induced ligand*) (179). Također humane  $\gamma\delta$  T stanice imaju antigen prezentirajući kapacitet tj. imaju sposobnost prezentacije antigena  $\alpha\beta$  CD4<sup>+</sup> te CD8<sup>+</sup> T stanicama (180, 181).

Ontogeneza  $\gamma\delta$ T stanica započinje u timusu i mijenja se ovisno o spolu, dobi, izloženosti stranim antigenima i proupalnim citokinima čije je lučenje uvjetovano egzogenim i endogenim podražajima/stanjima (93);

V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T stanice čine 2/3 svih  $\gamma\delta$  T limfocita u krvi fetusa, ali im se udio pred porod smanjuje na 1/3. Suprotno, brojnost V $\delta$ 1 subpopulacije raste tijekom gestacije (182). Po rođenju, udio V $\delta$ 2 subpopulacije nastavlja rasti do 15 godine života podjednako u oba spola, a potom se nakon 20.-30. godine života linearno smanjuje, brže kod osoba muškog spola (183). Pad broja  $\gamma\delta$  T stanica najvećim dijelom reflektira smanjenje udjela efektorsko/memorijskih i terminalno diferenciranih linija, a memorijske vrste perzistiraju i u starijoj dobi (183). Udio V $\delta$ 1 subpopulacije relativno je neovisan o dobi i spolu (170). Kvantitativne oscilacije pojedinih subpopulacija objašnjavaju se takozvanim „valovima“ T staničnog razvoja, koji su primarno vezani uz proliferaciju postojećih V $\delta$ 2 jedinski, a ne uz razvoj novih naivnih subpopulacija (184).

Osim fizioloških čimbenika poput dobi i spola, na promjenu kvantitativnih i kvalitativnih obilježja  $\gamma\delta$  T razreda uvelike utječu patološka stanja. Infekcija CMV virusom, modulira



kvanitativne udjele i fenotip  $\gamma\delta$  T subpopulacija (185). Povećanju udjela i apsolutnog broja  $\gamma\delta$  T subpopulacije uslijed CMV infekcije pridonosi  $V\delta 2^-$  subpopulacija, prvenstveno  $V\delta 1^+$ ,  $V\delta 3^+$  i  $V\delta 5^+$  stanice dok  $V\delta 2$  odjeljak ostaje nepromijenjen (186). Iste imaju izražen efektorski memorijski fenotip te su  $CD45RA^+ CD27^- CD38^+ HLA-DR^+ CD45RO^- CD28^-$  (187–189). U fetalnom razdoblju u prisutnosti CMV infekcije pak osim  $V\delta 2^-$  subpopulacija ekspanziji  $\gamma\delta$  T staničnog razreda pridonose i „neklasične“  $V\gamma 9^- V\delta 2^+$  stanice (190). Uslijed infekcije ljudskog organizma intracelularnim bakterijama dolazi do povećanja udjela i apsolutnog broja  $V\gamma 9V\delta 2$  T stanica u krvi (191, 192). Neoplastične bolesti, lijekovi te određene prehrabene namirnice, kao izvori fosforiliranih metabolita mevalonatnog i nemevalonatnog puta, također mogu utjecati na promjene u broju i sastavu  $\gamma\delta$  T staničnog odjeljka (170). Radi svojih funkcijskih karakteristika i plastičnosti,  $\gamma\delta$  T limfociti česti su sudionici u razvoju brojnih autoimunih bolesti (140, 193).

#### 1.10 Uloga $\gamma\delta$ T stanica u psorijazi

Približno 2-9% svih dermalnih limfocita T čine  $\gamma\delta$  T stanice. U koži oboljelih od psorijaze zabilježen je povećani udio rezidentnih, dermalnih  $\gamma\delta$  T stanica (40%) u odnosu na zdrave ispitanike (15%). Štoviše, dermalne  $\gamma\delta$  T stanice čine većinu  $IL-17^+$  limfocita u koži oboljelih (25) te ekspresijom  $IL-23$  receptora,  $ROR\gamma t$  transkripcijskog čimbenika,  $CCR6$  kemokinskog receptora i lučenjem upalnih citokina  $IL-17$ ,  $IL-22$ ,  $IFN-\gamma$  i  $TNF-\alpha$  pospješuju razvoj i održavanje upalnog imunskog odgovora u koži oboljelih (194, 195). Razvoj upalnog mikrokoliša pospješuje mobilizaciju i udomljavanje specijaliziranih efektorskih linija adaptivne imunosti ( $Th1$ ,  $Tc1$ ,  $Th17$ ,  $Tc17$ ), ali i perifernih  $V\gamma 9\delta 2$  T loza koje pridonose dediferencijaciji keratinocita i progresiji epitelne hiperplazije (196). Kod oboljelih zabilježen je smanjeni broj cirkulirajućih  $CLA^+ CCR6^+ CCR10^+ V\gamma 9^+ V\delta 2^+$  T stanica, koje pak u većem broju naseljavaju promijenjenu kožu (196). Suprotno tome, značajne razlike u frekvenciji  $V\delta 1^+$  T stanica u krvi oboljelih i zdravih kontrola nisu zabilježene. Noviji radovi pak ukazuju na heterogenost fenotipa i funkcije  $\gamma\delta$  T loza i pokazuju da različite subpopulacije mogu imati različite, možda čak i suprotne uloge (197) te razvojne puteve (198).

Međutim, specifični udjeli i migracijski obrasci  $V\delta 1$  i  $V\delta 2$  T limfocitnih populacija u psorijazi, kao i povezanost promjene njihovih frekvencija s težinom i obilježjima vulgarne psorijaze još uvijek su nerazjašnjeni. Jednako tako, u potpunosti je nepoznato kako promjene linijski specifičnih transkripcijskih čimbenika i površinskih receptora  $\gamma\delta T$  stanica utječu na incijaciju i progresiju oboljenja.

## 2 HIPOTEZA

Periferni udjeli, kao i promjene u sintezi mRNA odnosno ekspresiji MAIT i  $\gamma\delta$  T linijski specifičnih transkripcijskih čimbenika i površinskih receptora, značajno se razlikuju kod osoba oboljelih od vulgarne psorijaze i zdravih ispitanika te koreliraju s veličinom PASI indeksa i serumskim razinama upalnih citokina (IL-17, IL-18, IL-23) i kemokinskih liganada (CCL20 i CCL27).

### 3 CIJEVI ISTRAŽIVANJA

Na temelju hipoteze postavljeni su sljedeći specifični ciljevi:

1. odrediti i usporediti udjele perifernih MAIT i  $\gamma\delta$  T stanica u populaciji ukupnih perifernih mononuklearnih stanica oboljelih od PV i zdravih ispitanika;
2. odrediti i usporediti serumske razine upalnih citokina i kemokina kod zdravih i oboljelih ispitanika;
3. kvantificirati i usporediti ekspresijske profile transkripcijskih čimbenika i površinskih receptora sortiranih MAIT i  $\gamma\delta$  T limfocita kod oboljelih i zdravih ispitanika;
4. ispitati povezanost perifernih udjela i ekspresijskih profila transkripcijskih čimbenika i površinskih receptora sortiranih MAIT i  $\gamma\delta$  T populacija s biokemijskim, demografskim i kliničkim obilježjima oboljelih i zdravih ispitanika te serumskim razinama upalnih citokina i kemokina.

## 4 MATERIJALI I METODE

### 4.1 Ustroj studije

Istraživanje je provedeno kao opažajno istraživanje parova (engl. *case control study*) (199).

### 4.2 Materijali

#### 4.2.1 Ispitanici i ispitivane skupine

Istraživanje je obuhvatilo 21-og punoljetnog ispitanika oboljelog od vulgarne psorijaze (PV) i 22 zdrave, po dobi i spolu podudarne, nesrodne osobe koje su činile kontrolnu skupinu (CTRL). Veličina uzorka odgovara reprezentativnim studijama iz dostupne literature (119, 121, 147, 149, 163, 200).

Probir zdravih kontrola i oboljelih ispitanika proveden je nasumičnim redoslijedom pregleda u okviru standardne dijagnostičke obrade na Zavodu za dermatologiju i venerologiju KBC Osijek. Usmeno i pismeno obrazloženje ciljeva, metoda i očekivanih ishoda istraživanja pruženo je svim zainteresiranim ispitanicima, a informirani pristanak prikupljen je od svih uključenih sudionika. Oboljeli ispitanici izabrani su na temelju klinički i histološki potvrđene dijagnoze vulgarne psorijaze. Težina bolesti određena je s pomoću skale PASI (17, 18), a utjecaj bolesti na kvalitetu života procijenjen je DLQI upitnikom (19). Zabilježeni su osnovni identifikacijski i demografski podaci (ime, prezime, dob i spol) i učinjena su antropometrijska mjerenja (tjelesna visina i tjelesna masa ispitanika) s ciljem određivanja BMI. Prikupljeni su također anamnestički podaci o pojavnosti vulgarne psorijaze u obitelji, dobi pri pojavi prvih simptoma, komorbiditetima, lijekovima u trenutnoj primjeni, vitaminskim i mineralnim dodacima prehrani te postojećim alergijama na lijekove.

Isključene su maloljetne osobe, kao i bolesnici na sustavnoj biološkoj, citostatskoj, fotokemoterapiji (psoralen i UVA zračenje) ili fototerapiji (uskospektralno UVB zračenje) unutar minimalno godinu dana prije uključanja u istraživanje, osobe s pridruženim autoimunim, malignim i infektivnim oboljenjima ili dokumentiranom epizodom alergijske reakcije unutar 6 tjedana prije dijagnostičke obrade.

Kontrolnu skupinu činile su zdrave, nesrodne, odrasle osobe, po dobi i spolu prilagođene skupini oboljelih, koje su odabrane tijekom redovite dermatološke skrbi benignih, neinfektivnih

ili imunološki neutralnih promjena na koži, bez sustavne medikamentozne ili fototerapije, povijesti alergijskih, malignih ili autoimunih oboljenja.

U okviru dijagnostičke obrade svih ispitanika, učinjena je analiza visoko osjetljivog C reaktivnog proteina (hsCRP, od engl. *high-sensitivity C reactive protein*), sedimentacije eritrocita (SE), diferencijalne (DKS) i cjelovite krvne slike (KKS: broj eritrocita- E, leukocita – L, trombocita – Trc, količina hemoglobina – Hb i hematokrita – Htc), s mjerenjem prosječnih eritrocitnih i trombocitnih parametara uključujući volumen eritrocita (MCV, od engl. *mean corpuscular volume*), sadržaj hemoglobina u eritrocitu (MCH, od engl. *mean corpuscular hemoglobin*), koncentraciju Hb u 1L eritrocita (MCHC, od engl. *mean corpuscular hemoglobin concentration*), raspodjelu eritrocita po volumenu (RDW, od engl. *red cell distribution width*) i volumen trombocita (MPV, od engl. *mean platelet volumen*). Izmjerene su i koncentracije jetrenih enzima (alanin aminotransferaze - ALT, aspartat aminotransferaze –AST i gama glutamil transferaze - GGT), ureae, kreatinina, i seroloških biljega *Mycobacterium tuberculosis* (QuntiFERON-TB Gold test), hepatitis B (anti-HBs, HBsAg, anti-HBc IgG, anti-HBc IgM, HBeAg, anti-HBe), hepatitis C (anti-HCV) i citomegalovirus (anti-CMV IgG/IgM) infekcije.

Ispitanicima su dodijeljeni kodirani identifikacijski brojevi koji su se koristili tijekom prikupljanja i analize bioloških uzoraka te interpretacije rezultata. Svi primijenjeni postupci probira ispitanika i obrade uzoraka odobreni su odlukom Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra (KBC-a) Osijek (Potvrda br. R2-9042/2018) te Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku (UR. BROJ: 2158- 61- 07-18-135).

#### 4.2.2 Upotrijebljene kemikalije

Tijekom istraživanja korištene su sljedeće kemikalije:

- Lymphoprep™ (Stemcell Technologies, Vancouver, Kanada)
- LIVE/DEAD™ Fixable Dead Cell Stain Kits (Thermo FisherScientific, Waltham, Massachusetts, SAD)
- Human TruStain FcX™ (BioLegend, San Diego, Kalifornija, SAD)
- anti-human CD3εFITC (donacija prof. Petera Balogha, Medicinski fakultet Sveučilišta u Pečuhu, klon UCHT1 gamma)
- Anti-human CD8a PerCP-Cyanine5.5(eBioscience, klon RPA-T8)
- Anti-human CD4 PE-Cy7 (eBiosciences, klon SK3)
- Anti-human TCRVα7.2 PE (BioLegend, klon 3C10)

- MR1-5-OP-RU [5-(2-oxopropylideneamino)-6-D-ribitylaminouracil] konjugirani tetramer obilježen APC (NIH Tetramer Core Facility)
- Anti-human TCR $\gamma\delta$  PE-Cy7 (BioLegend, klon B1)
- Anti-human TCRV $\delta$ 1 APC (eBiosciences, klon TS8.2)
- Anti-human TCRV $\delta$ 2 PerCP/CY5.5 (BioLegend, klon B6)
- ArC™ Amine Reactive Compensation Bead Kit (Thermo FisherScientific, Waltham, Massachusetts, SAD)
- Anti-Mouse Ig,  $\kappa$ /Negative Control Compensation Particles Set (BD, Franklin Lakes, New Jersey, SAD)
- mirVana™ miRNA izolacijski set s fenolom (Thermo Fisher Scientific, SAD)
- Human Custom Procarta Plex 5-plex kit (eBioscience, Affymetrix)
- PrimeScript™ RT Reagent Kit-a (Takara Bio, SAD)
- TaqMan probe (Tablica 4.1)

**Tablica 4.1. Popis TaqMan proba i veličina umnoženih DNA odsječaka**

ID testa	Skraćenica gena	Naziv gena	Pristuni broj u banci gena	Veličina PCR odsječka (pb) (bp)
Hs00232313_m1	<b>PLZF (ZBTB16)</b>	<i>Promyelocytic Leukemia Zinc Finger Protein; Zinc Finger And BTB Domain Containing 16</i>	NM_001018011.1	67
Hs01091094_m1	<b>RUNX3</b>	<i>Runt-related transcription factor 3</i>	NM_001018011.2	108
Hs01076112_m1	<b>RORC</b>	<i>RAR Related Orphan Receptor C</i>	NM_001018011.3	62
Hs00706455_s1	<b>CCR10</b>	<i>C-C Motif Chemokine Receptor 10</i>	NM_001018011.4	147
Hs00171121_m1	<b>CCR6</b>	<i>C-C Motif Chemokine Receptor 6</i>	NM_001018011.5	63
Hs04276253_m1	<b>SELPLG (CLA)</b>	<i>Selectin P ligand; cutaneous lymphocyte-associated antigene</i>	NM_001018011.6	68
Hs00187256_m1	<b>IL-18R</b>	<i>interleukin-18 receptor 1</i>	NM_001018011.7	67
Hs00172872_m1	<b>EOMES</b>	<i>Eomesodermin</i>	NM_001018011.10	81
Hs01060665_g1	<b>ACTB (actin)</b>	<i>actin beta</i>	NM_001018011.8	63
Hs00894392_m1	<b>TBX21</b>	<i>T-box transcription factor 21</i>	NM_001018011.9	119
Hs99999910_m1	<b>TBP</b>	<i>TATA box binding protein</i>	NM_001018011.11	127

## 4.3 Metode

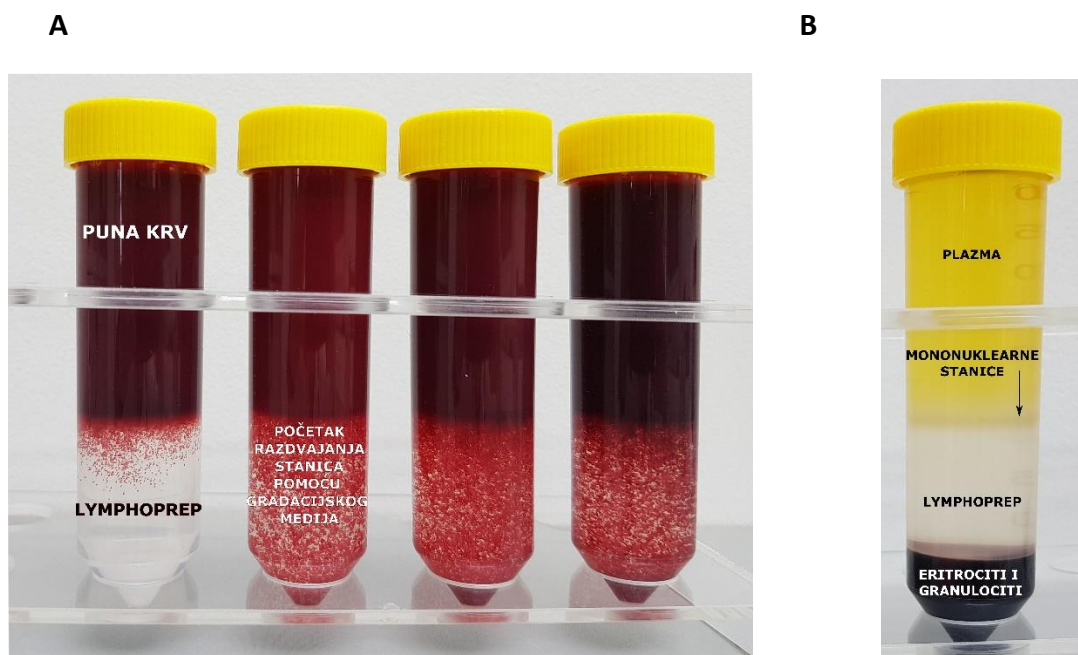
### 4.3.1 Uzorkovanje krvi

Odabranim ispitanicima izuzeti su svježi, jutarnji uzorci periferne krvi u dvije vrste epruveta; s dodatkom litijevog heparina, za izolaciju ukupnih perifernih mononuklearnih stanica (PBMC, engl. *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) i bez dodatka antikoagulansa, za odvajanje seruma.

### 4.3.2 Izolacija ukupnih perifernih mononuklearnih stanica

Izolacija PBMC stanica učinjena je centrifugiranjem 2 x 8 ml heparinizirane krvi u gradijentu gustoće Lymphoprep™ medija (Stemcell Technologies, Vancouver, Kanada) prema uputama proizvođača. Lymphoprep™ sterilni je gradacijski medij, gustoće 1,077 g/mL, koji se koristi za razdvajanje polimorfonuklearnih i mononuklearnih krvnih populacija na temelju razlike u gustoći. Granulociti i eritrociti zbog veće gustoće ( $> 1.077$  g/mL), tijekom centrifugiranja, prolaze kroz Lymphoprep™ i talože se na dnu Falcon epruvete, dok se mononuklearne PBMC ( $< 1.077$  g/mL) stanice zadržavaju na njegovoj površini. Do trenutka korištenja Lymphoprep medij skladišten je na temperaturi od  $+4$  °C, zaštićen od svjetlosti.

POSTUPAK: U praznu Falcon epruvetu volumena 50 mL pipetirano je 15 mL Lymphoprep medija. Uzorak krvi razrijeđen je s 0,9 % otopinom NaCl (fiziološka otopina) u omjeru 1 : 1, i potom pažljivo nanesen na površinu Lymphoprep medija pazeći da se dvije otopine ne pomiješaju (Slika 4.1.). Pripremljeni uzorci centrifugirani su na sobnoj temperaturi (25 °C) 25 min brzinom od 800 g, uz veličinu ubrzanja 6 i isključene kočnice. Po završetku centrifugiranja bjeličasti sloj PBMC stanica, smješten između plazme i Lymphoprep medija, pažljivo je skupljen i prebačen u Falcon epruvetu od 15 mL, bez dodirivanja istaloženih eritrocita i granulocita. Prikupljeni volumen PBMC stanica nadopunjen je fosfatnim puferom (engl. *Phosphate-buffered saline*, PBS) pH 7,5, do ukupnog volumena od 14 mL. Pripremljeni uzorci potom su centrifugirani na 25 °C, 10 minuta, brzinom od 800 g, uz maksimalne vrijednosti ubrzanja i kočenja. Nastali je supernatant odbačen, a istaložene stanice resuspendirane u 8 mL PBS pufera. Novim ciklusom centrifugiranja (5 min na 550 g) stanice su istaložene, i zatim resuspendirane u 5 mL PBS pufera za potrebe kvantifikacije.



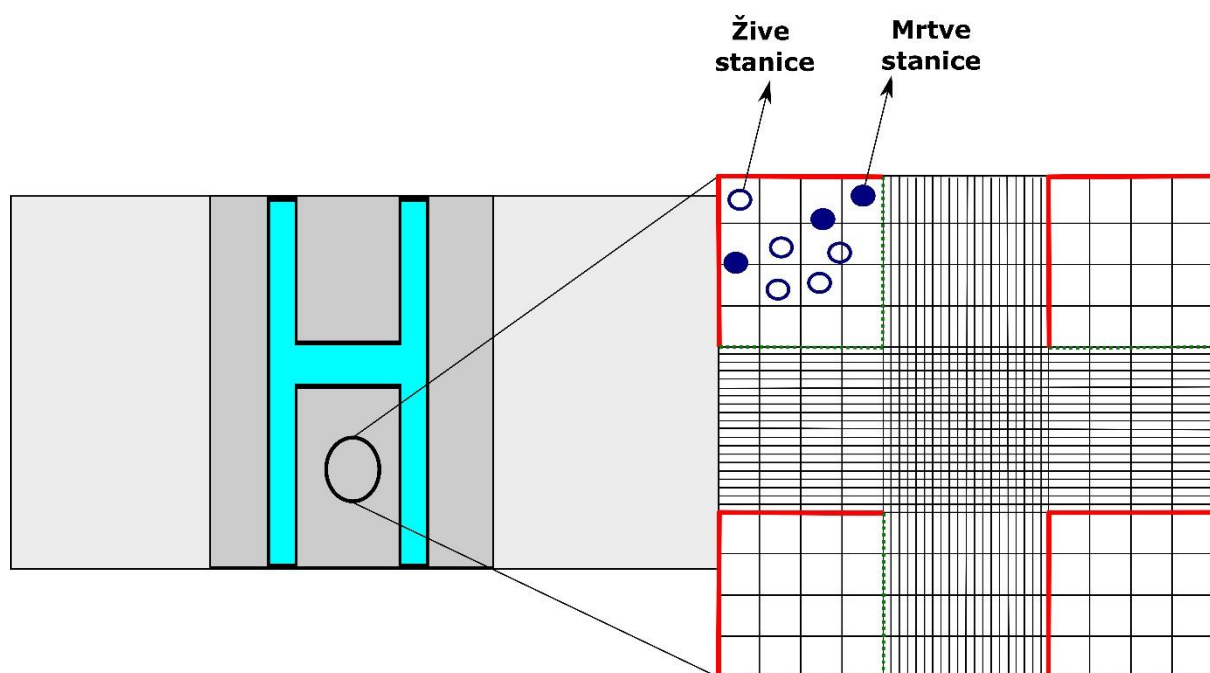
**Slika 4.1. Postupak razdvajanja krvnih stanica s pomoću gradacijskog medija A) prije centrifugiranja i B) nakon centrifugiranja.**

*Autorski rad uz doradu računalnim programom Inkscape (Brooklyn, New York, SAD)*

#### *Kvantifikacija i priprema alikvota izoliranih PBMC stanica*

Prinos izoliranih PBMC stanica određen je primjenom komorice za brojanje stanica ili hemocitometra (Bürker-Türkova komorica), i svjetlosnog mikroskopa (Zeiss Axiovert 25, Njemačka). Bürker-Türkova komorica sadrži laserski ugraviranu mrežicu koja se sastoji od devet kvadrata površine  $1 \times 1 \text{ mm}$  ( $1 \text{ mm}^2$ ). Oni su podijeljeni u tri smjera;  $0,25 \times 0,25 \text{ mm}$  ( $0,0625 \text{ mm}^2$ ),  $0,25 \times 0,20 \text{ mm}$  ( $0,05 \text{ mm}^2$ ) i  $0,20 \times 0,20 \text{ mm}$  ( $0,04 \text{ mm}^2$ ). Središnji je kvadrat dalje podijeljen na manje kvadrate površine  $0,05 \times 0,05 \text{ mm}$  ( $0,0025 \text{ mm}^2$ ). Podignuti rubovi hemocitometra nose pokrovnicu  $0,1 \text{ mm}$  iznad označene rešetke, dajući svakom kvadratu definirani volumen. Stanice koje su veličinom jednake ili veće od  $10 \text{ }\mu\text{m}$  (te kriterije zadovoljavaju leukociti) broje se unutar kvadrata površine  $1 \text{ mm}^2$  (kutnim kvadrantima) s ugraviranim kvadratima površine  $0,0625 \text{ mm}^2$ . (Slika 4.2.)





**Slika 4.2. Bürker-Türk komorica/hemocitometar.**

*Rubni dijelovi mjernih područja komorice označeni su punim crvenim i zelenim isprekidanim linijama. Stanice prisutne u crvenim rubnim područjima pridružuju se ukupnom broju stanica, ali ne i one koje pronalazimo na zelenim granicama mjernih kvadratića. Broje se žive/vijabilne stanice, vidljive kao rubno plavo obojeni krugovi, za razliku od plavom bojom ispunjenih mrtvih stanica. Slika (autorski rad) je napravljena računalnim programom Inkscape (Brooklyn, New York, SAD)*

POSTUPAK: Za potrebe brojanja, 50  $\mu\text{l}$  suspenzije PBMC stanica pomiješano je s 100  $\mu\text{l}$  tripan plavila. Pripremljena smjesa nanosena je na komoricu te je učinjeno brojanje vijabilnih (neobojenih) i mrtvih (obojenih) stanica. Broj vijabilnih stanica određen je formulom  $\frac{N}{4} \times 3 = x \times 10^4$  stanica/ $\text{cm}^3$ , pri čemu  $\frac{N}{4}$  označava prosječni broj stanica u sva 4 polja, a broj 3 faktor razrjeđenja. Dio svježih PBMC stanica odmah je iskorišten za potrebe protočne citometrije ( $1 \times 10^6$  stanica u 1 ml PBS), i sortiranja ( $6 \times 10^6$  stanica), uz posljedičnu izolaciju RNA. Ostatak izolirane PBMC populacije podijeljen je u alikvote koncentracije  $3 \times 10^6$  stanica/mL i kriogeno pohranjen.

### Smrzavanje PBMC alikvota

POSTUPAK: Alikvoti PBMC stanica ( $3 \times 10^6$ ) resuspendirani su u 0,5 ml hladnog fetalnog goveđeg seruma (FBS, od engl. *Fetal bovine serum*, Biosera, Francuska), i jednakom volumenu prethodno ohlađenog ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) medija za smrzavanje (FBS + 20 % dimetil sulfoksid – DMSO, od engl. *dimethyl sulfoxide*, AppliChem), koji je dodavan kap po kap. Pripremljeni uzorci u kriotubicama, smješteni su u stiroporni nosač i kratkotrajno (24 – 72 sata) pohranjeni na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , prije nego što su prebačeni u spremnik s tekućim dušikom. Neposredno prije bojanja i analize na protočnom citometru, kriokonzervirane PBMC stanice kratko su inkubirane (60 s) u vodenoj kupelji na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a zatim u sterilnoj epruveti od 15 ml razrijeđene dokapavanjem 10 ml prethodno zagrijanog, kompletiranog RPPMI-1640 medija (10 % FBS, 1 % Na-piruvat, 0,01 M HEPES, Sigma-Aldrich). Odmrznute stanice istaložene su centrifugiranjem tijekom 10 minuta pri brzini od 350 g, potom resuspendirane s 5 ml RPMI-1640 medija i inkubirane 30 minuta na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  u  $\text{CO}_2$  inkubatoru. Prije bojanja s protutijelima, stanice su isprane s 5 mL PBS pufera, peletirane pri brzini od 350 g 5 min, i konačno resuspendirane u 1 mL pufera za bojanje stanica.

#### 4.3.3 Protočna citometrija

Protočna citometrija (engl. *flow cytometry*, *flow cytofluorometry* ili *flow microfluorometry*) multiparametrijska je analitička metoda koja se najčešće koristi za kvantitativnu i kvalitativnu analizu stanica te za izdvajanje (sortiranje) stanica unaprijed određenih karakteristika iz ispitivanog uzorka. Od kvalitativnih podataka omogućava nam analizu unaprijed definiranih željenih fizikalnih (veličina stanice te unutarstanična struktura odnosno stupanj granuliranosti) i kemijskih osobina stanica (prisutnost ili odsutnost površinskih i/ili unutarstaničnih i/ili nuklearnih proteina; deoksiribonukleinske kiseline (DNK), količine kalcija).

Uređaj se sastoji iz 3 dijela: (a) sustava za protok stanica (engl. *fluidics*), (b) optičkog sustava (lasera, leća i fotodetektora) te (c) elektroničkog sustava. Preduvjet za analizu stanica na protočnom citometru je priprema suspenzije stanica prije analize te postizanje toka pojedinačnih stanica tijekom same analize na uređaju. Postoji nekoliko mehanizma kojim se postiže takav usmjereni tok pojedinačnih stanica, a najčešći je hidrodinamičko usmjeravanje (engl. *hydrodynamic focusing*). Ispitivane stanice protiču pojedinačno sustavom protoka stanica pri čemu budu obasjane laserskom zrakom/zrakama određenih valnih duljina. Pri tome dolazi

do disperzije svjetlosti ovisno o fizikalnim karakteristikama stanica (veličina, kompleksnost citoplazme) te u slučaju prethodnog vezanja specifičnih protutijela obilježenih fluorokromima i do emisije fluorescencije određene valne duljine. Slijedom navedenih događaja s površine pojedinih stanica reflektira se polikromatska svjetlost, koja se sustavom filtera i dihromnih stakalaca usmjerava na fotodetektore. Fotodetektori bilježe fotone te ih pretvaraju u elektroničke signale, odnosno pulseve napona. Najčešće korišteni detektori jesu fotomultiplicirajuće tubice (PMT, od engl. *photomultiplier tube*). Analogni se podaci u suvremenim uređajima pretvaraju u digitalne podatke koji nam omogućavaju analizu dobivenih rezultata. Razlikuju se 3 vrste fotodetektora: FSC-detektor (od engl. *Forward scatter*) koji nam daje podatke o veličini stanice, SSC-detektor (od engl. *Side scatter*) koji nam daje podatke o kompleksnosti stanične citoplazme poput granuliranosti stanica te FL (od engl. *fluorescence*) – detektori koji “hvataju” fluorescentni signal određene valne duljine, a koji potječe od fluorokroma kojim su obilježena određena protutijela za analizu kemijskih komponenta stanice.

Ovisno o odabiru dobivenih podataka zabilježenih fotodetektorima (veličine stanica, stupnja granuliranosti, kemijskog sastava) odabiremo željenu populaciju stanica za analizu. Rezultati mogu biti prikazani numerički ili grafički (histogram fluorescencije ili točkasti prikaz (engl. *dotplot*)).

#### *Izrada kompenzacijske matrice*

Najčešće korišteni fluorokromi u protočnoj citometriji, nakon ekscitacije, emitiraju polikromatsku svjetlost širokog raspona valnih duljina. Najveći se dio tog spektra filtrira i usmjerava na odgovarajući FL detektor, međutim, zbog širokog raspona valnih duljina pojedinih fluorokroma, mali dio te svjetlosti odlazi i u susjedne FL detektore. Stoga je prije početka pokusa neophodno s pomoću jednobojnih kontrola (SS, od engl. *single stain control*) napraviti kompenzacijsku matricu, koja nam omogućava adekvatnu analizu podataka. Kompenzacija predstavlja udio signala u susjednom detektoru koji se oduzima stanicama koje odašilju primarni signal za dotični fluorokrom. Kompenzacije su specifične za kombinaciju napona u detektorima koje se koriste pri pojedinim mjerenjima.

*Isključivanje mrtvih stanica iz analize*

Mrtve su stanice bile isključene s pomoću komercijalnog kita za određivanje viabilnosti stanica (LIVE/DEAD™ Fixable Dead Cell Stain Kits (Thermo FisherScientific, Waltham, Massachusetts, SAD) prema uputama proizvođača. LIVE/DEAD komercijalni kit funkcionira na principu razlike u intenzitetu fluorescencije koja je veća od 50 puta između mrtvih i živih stanica. Ova se boja veže za slobodne amine na površini stanice te u njenoj unutrašnjosti. S obzirom da oštećene i mrtve stanice imaju povećanu permeabilnost stanične membrane, kod njih boja ulazi u stanicu te se veže za slobodne amine u unutrašnjosti stanice i na površini stanice, dok se ista kod živih, vijabilnih stanica kovalentno veže samo s aminima stanične membrane, zbog čega oštećene i mrtve stanice pokazuju višestruko jače fluorescentno obojenje.

*Inhibicija nespecifičnog vezanja protutijela*

Imunološke stanice, u prvom redu fagociti (monociti i graulociti) te B limfociti, na svojoj površini izražavaju receptore za Fc segment imunoglobulina (FcR), koji im omogućava prepoznavanje opsoniziranih mikroorganizama. Tijekom obilježavanja stanica specifičnim protutijelima u svrhu analize na protočnom citometru stoga dolazi do nespecifičnog vezanja protutijela za Fc receptore i stvaranja lažno pozitivnih rezultata. S ciljem eliminacije nespecifičnih signala, kod analize humanih uzoraka, koristi se nekoliko metoda blokade neželjenog vezanja, uključujući saturaciju FcR nespecifičnim imunoglobulinima klase IgG, AB-humanim serumom ili specifičnim protutijelima usmjerenim na FcR (npr. anti-CD16). U tu svrhu, pri izradi ove doktorske disertacije korišten je komercijalno dostupan komplet (Human TruStain FcX™ reagensa, BioLegend, San Diego, Kalifornija, SAD). Ukratko, stanice su prije označavanja specifičnim protutijelima inkubirane s 5 µl navedenog reagensa tijekom 10 minuta pri sobnoj temperaturi.

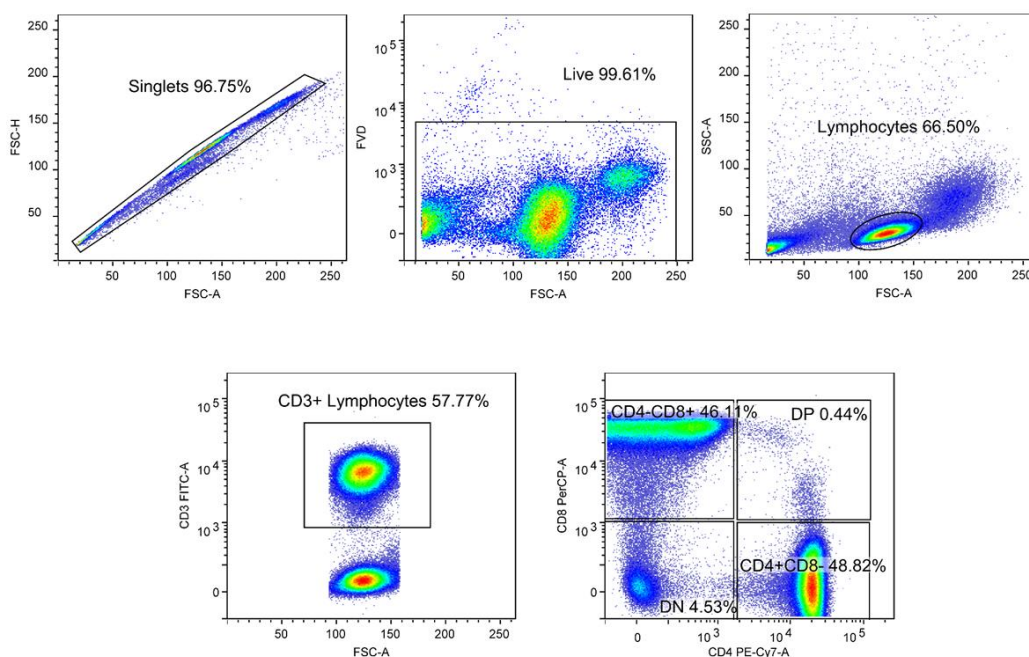
*Imunofenotipizacija PBMC stanica specifičnim fluorescentno obilježenim protutijelima od interesa i protočna citometrija*

U sljedećem koraku stanice su bile označene protutijelima obilježenim različitim fluorokromima, kako slijedi: CD3ε FITC (donacija prof. Petera Balogha, Medicinski fakultet Sveučilišta u Pečuhu, klon UCHT1 gamma), CD4 PE-Cy7 (1 : 200, klon SK3, eBiosciences),

CD8a PerCP-Cy5.5 (1 : 200, klon RPA-T8, eBiosciences), TCRV $\alpha$ 7.2 PE (1 : 100, klon 3C10, BioLegend) i MR1-5-OP-RU [5-(2-oxopropylideneamino)-6-D-ribitylamino-uracil] konjugiranim tetramerom obilježenim APC (1 : 100, NIH Tetramer Core Facility) (201). Prethodno navedena kombinacija korištena je s ciljem određivanja MAIT stanica. Druga kombinacija protutijela uključivala je CD3 $\epsilon$  FITC (donacija prof. Petera Balogha, Medicinski fakultet Sveučilišta u Pečuhu, klon UCHT1 gamma) i TCR $\gamma\delta$  PE-Cy7 (1 : 100, klon B1, BioLegend) protutijela s ciljem određivanja  $\gamma\delta$  T stanica.

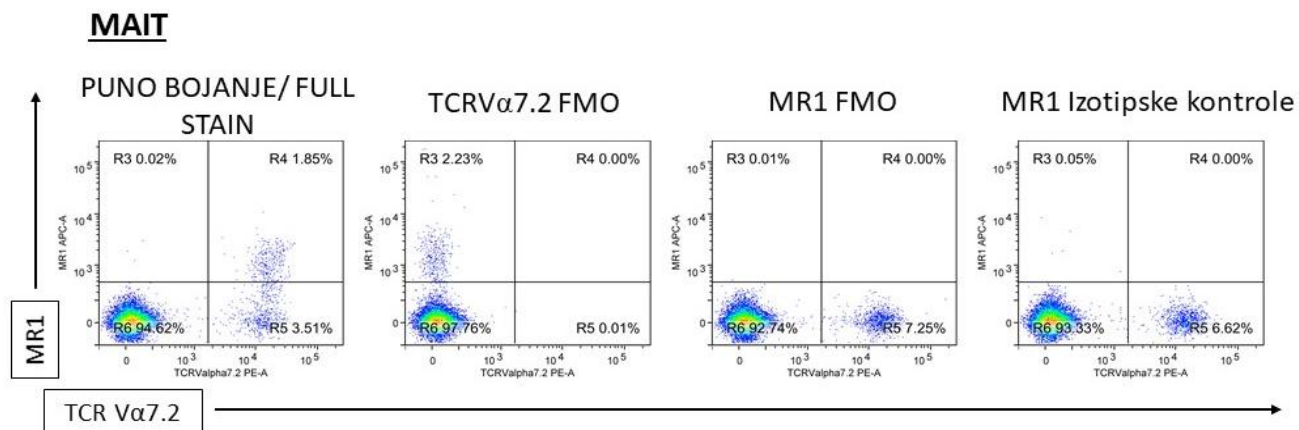
Iz krioperzerviranih uzoraka učinjeno je bojenje protutijelima CD3 $\epsilon$ FITC (donacija prof. Petera Balogha, Medicinski fakultet Sveučilišta u Pečuhu, klon UCHT1 gamma), TCR $\gamma\delta$  PE-Cy7 (1 : 100, klon B1, BioLegend), TCRV $\delta$ 1 APC (1 : 100, clone TS8.2, eBiosciences) i TCRV $\delta$ 2 PerCP/CY5.5 (1 : 200, clone B6, BioLegend) za određivanje specifičnih subpopulacija  $\gamma\delta$  T stanica ( $\delta$ 1 i  $\delta$ 2) (Slika 4.6. i Slika 4.7.). Prije početka pokusa optimalna koncentracija svih protutijela određena je postupkom titracije te izračunavanjem indeksa obojenosti (od. engl. *stain index*). Ukratko, nakon prethodno opisanih postupaka određivanja vijabilnosti te saturacije FcR, stanice su inkubirane kombinacijom protutijela tijekom 30 minuta na +4 °C. Uzorci su analizirani na protočnom citometru BD FACS Canto II (FACS Canto II, Becton Dickinson, SAD), pri čemu je sakupljeno najmanje 20 000 živih, jednostrukih stanica. Dobiveni rezultati analizirani su s pomoću FlowLogic v7.2.1. programa (Inivai Technologies, Menton, Australija).

U nastavku je prikazan dizajn panela te reprezentativni prikaz analize (slika 4.3., slika 4.4., slika 4.5.).



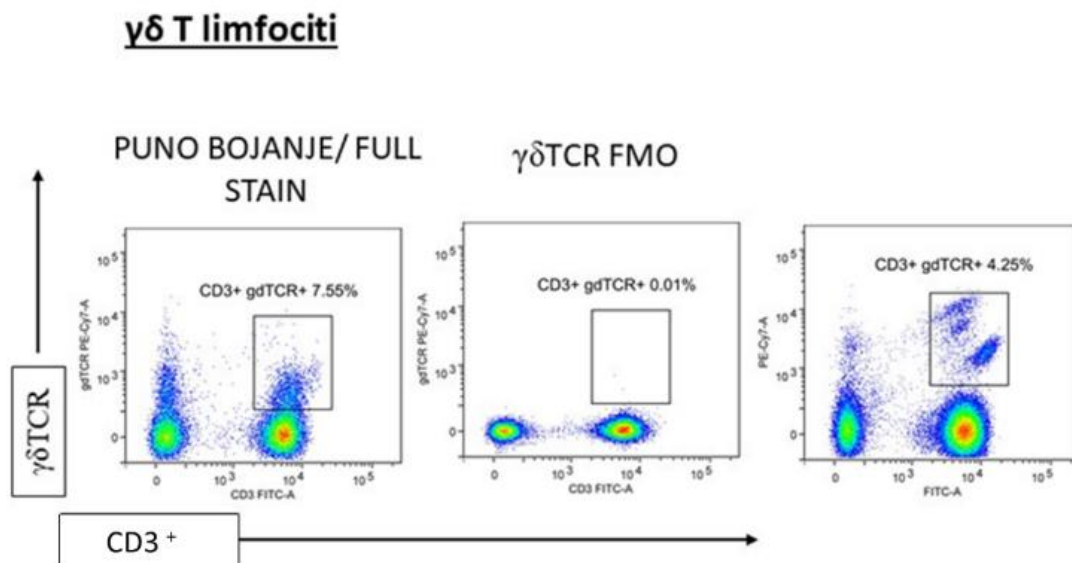
**Slika 4.3. Dizajn i kontrola kvalitete višeparametarske protočne citometrije.**

*Prikaz reprezentativne strategije određivanja populacija od interesa. Prvotno je učinjeno izdvajanje jednostrukih stanica (tzv. singlets) na temelju površine i visine signala koji potječe od pravocrtnog raspršenja svjetlosti (forward scatter area (FSC-A) i forward scatter height (FSC-H)). U sljedećem koraku za anлізу su odabrane samo žive stanice (FVD negativna populacija) potom je unutar iste definirana populacija limfocita na temelju pravocrtnog i postraničnog raspršenja svjetlosti (forward scatter area (FSC-A) i side scatter area (SSC-A)) koje nam daju podatke o veličini odnosno granuliranosti stanica. Na temelju prisutnosti CD3 glikoproteina definirana je populacija T limfocita unutar koje na temelju prisutnosti i/ili odsutnosti glikoproteina CD4 i CD8 su dalje definirane subpopulacije. FVD - fiksabilna boja za vijabilnost (od engl. fixable viability dye); FITC - fluoresceinski izotiocijanat (engl. fluorescein isothiocyanate); PE-Cy7 - od engl. phycoerythrin coupled with cyanine dye (Cy7) označeno protutijelo usmjereno na CD4 glikoprotein; PerCP - od engl. peridinin chlorophyll protein označeno protutijelo usmjereno na CD8. Sve analize provedene su na protočnom citometru BD FACS Canto II I analizirane primjenom Flow Logic programa*



**Slika 4.4. Dizajn i kontrola kvalitete višeparametarske protočne citometrije.**

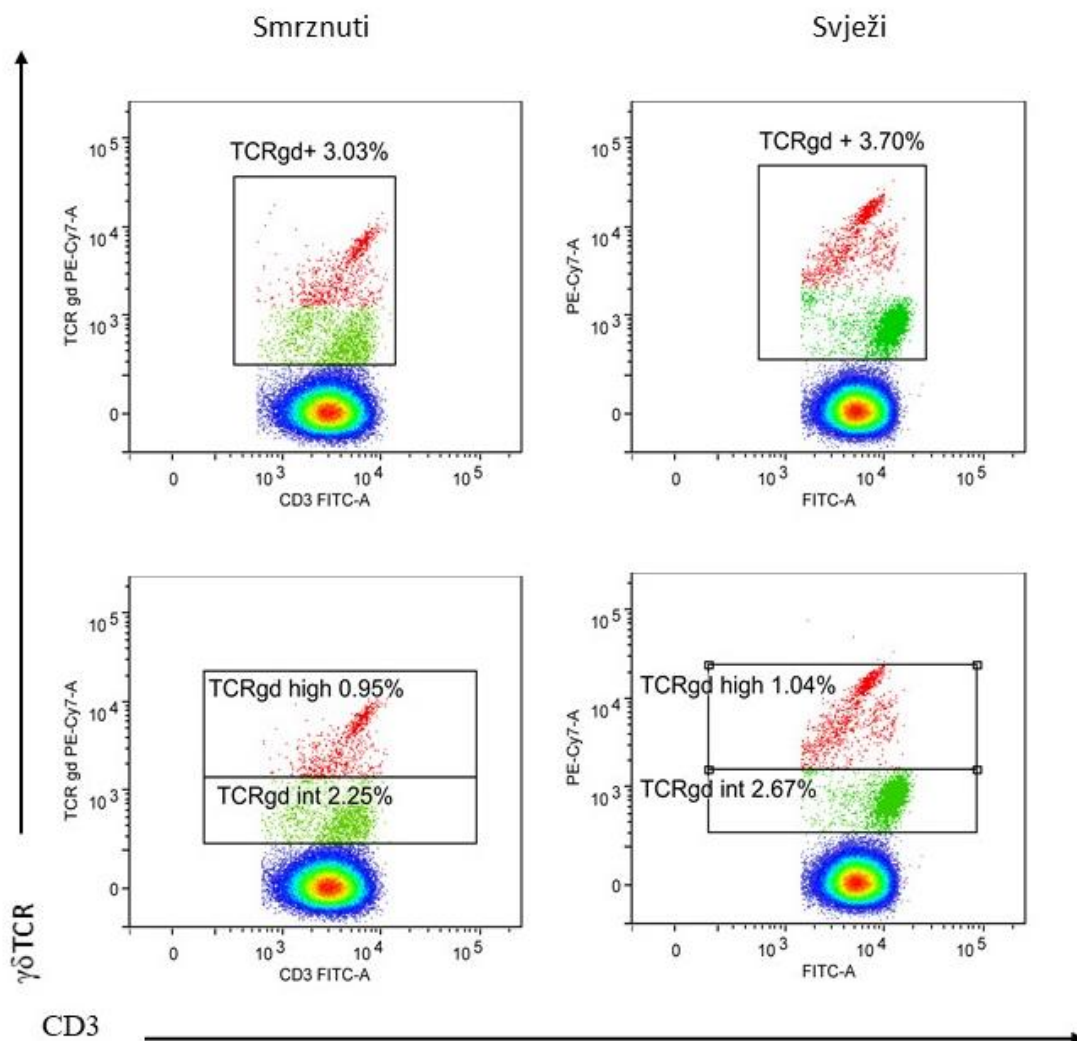
*Definicija populacije MAIT stanica temeljena je na ekspresiji TCRV $\alpha$ 7.2 i bojanju MRI tetramerom. Za precizno pozicioniranje regije od interesa upotrijebljene su odgovarajuće FMO kontrole, a specifičnost vezanja MRI tetramera dodatno je potvrđena APC obilježenom MRI izotipskom kontrolom. MAIT – sluznicama pridruženi invarijantni T (od engl. Mucosal associated invariant T) limfociti; TCR - T stanični receptor (engl. T cell receptor); MR1 - molekula povezana s MHC I (engl. Major Histocompatibility Complex I-related gene protein); FMO - fluorescencija minus jedan (od engl. Fluorescence Minus One); PE - fluorescentnim protijenom porijeklom iz crvenih algi (engl. phycoerythrin) označeno protutijelo usmjereno na TCRV $\alpha$ 7.2; APC - fluorescentnim proteinom porijeklom iz crvenih algi (engl. allophycocyanin) označeno protutijelo usmjereno na MR1. Sve analize provedene su na protočnom citometru BD FACS Canto II I analizirane primjenom Flow Logic programa*



**Slika 4.5. Dizajn i kontrola kvalitete višeparametarske protočne citometrije.**

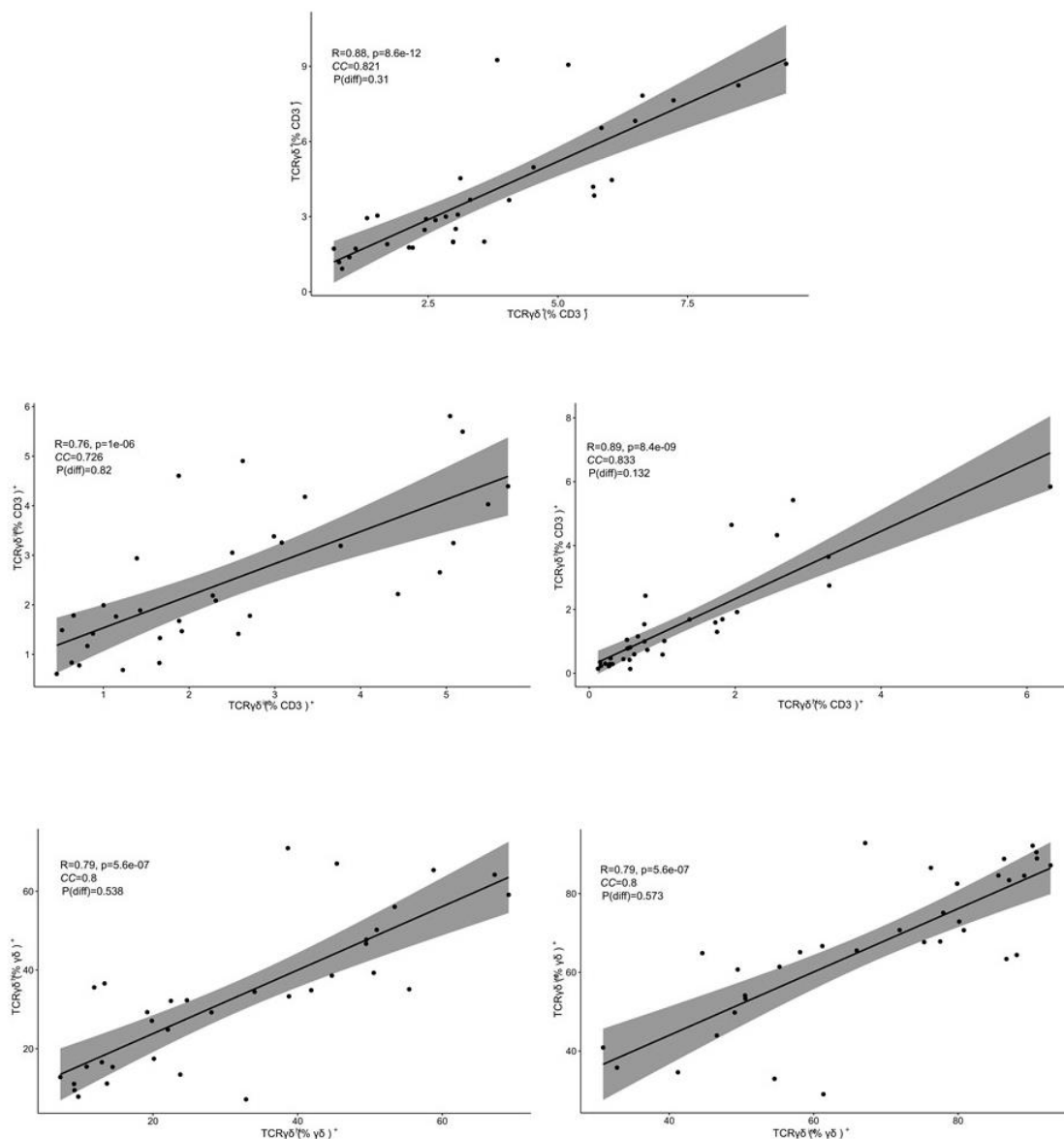
*Prikaz određivanja  $\gamma\delta$  T limfocita na temelju izražaja pan  $\gamma\delta$ TCR i CD3 molekule. Granice populacija određene su upotrebom odgovarajućih FMO kontrola. FMO – fluorescencija minus jedan (od engl. Fluorescence Minus One);  $\gamma\delta$  T limfociti - gamma-delta T limfociti, TCR - T stanični receptor (engl. T cell receptor); FITC - fluoresceinski izotiocijanat (engl. fluorescein isothiocyanate) označeno protutijelo usmjereno na CD3; PE-Cy7 - od engl. phycoerythrin coupled with cyanine dye (Cy7) označeno protutijelo usmjereno na  $\gamma\delta$  TCR. Sve analize provedene su na protočnom citometru BD FACS Canto II I analizirane primjenom Flow Logic programa*





**Slika 4.6. Usporedna analiza  $\gamma\delta$  subpopulacija svježih i krioprezerviranih/smrznutih stanica**

*Unakrsna validacija uporabom panela CD3,  $\gamma\delta$ TCR, TCRV $\delta$ 1 i TCRV $\delta$ 2 antitijela kako bi se pokazalo da su relativne stanične populacije, mjerene FACS-om, ekvivalentne uparenim, svježim i krio-konzerviranim uzorcima. TCR - T stanični receptor (engl. T cell receptor); FITC - fluoresceinski izotiocijanat (engl. fluorescein isothiocyanate) označeno protutijelo usmjereno na CD3; PE-Cy7 - od engl. phycoerythrin coupled with cyanine dye (Cy7) označeno protutijelo usmjereno na  $\gamma\delta$  TCR. Sve analize provedene su na protočnom citometru BD FACS Canto II I analizirane primjenom Flow Logic programa*



**Slika 4.7. Usporedna analiza  $\gamma\delta$  subpopulacija svježih i krioprezerviranih/smrznutih stanica**

*Korelacijska analiza podudarnosti (sortiranje stanica aktivirano fluorescencijom), svježi (x-os) u odnosu na odmrznute (krioprezerviranih) periferne mononuklearne stanice (y-os) nakon označavanja proitujelima specifičnim za izdvajanje  $\gamma\delta$  T stanica.*

*R - Spearmanov koeficijent korelacije; CC - Linov koeficijent korelacije podudarnosti, P (diff) - P vrijednost dobivena Wilcoxonovim testom. Crna linije predstavlja linearni regresijski pravac. Zasjenjena regija pokazuje 95 % interval pouzdanosti.*

#### 4.3.4 Sortiranje MAIT i $\gamma\delta$ T stanica

U svrhu određivanja transkriptoma specifičnih subpopulacija limfocita – MAIT i  $\gamma\delta$  T limfocita, stanice su prije izolacije ukupne mRNA sortirane s pomoću protočnog citometra. Sortiranje MAIT i  $\gamma\delta$  T limfocita te izolacija ukupne mRNA iz sortiranih uzoraka učinjena je na Zavodu za imunologiju i biotehnologiju Kliničkog Centra Sveučilišta u Pečuhu. Izolacija PBMC stanica, saturacija FcR, određivanje viabilnosti uzorka te označavanje stanica specifičnim protutijelima, učinjeno je istovjetno prethodno opisanim pokusima za fenotipizaciju MAIT i  $\gamma\delta$  T stanica. Za potrebe sortiranja upotrijebljeno je  $6 \times 10^6$  izoliranih PBMC stanica koje su bile označene sljedećim protutijelima: CD3 $\epsilon$  FITC (donacija prof. Petera Balogha, Medicinski fakultet Sveučilišta u Pečuhu, klon UCHT1 gamma), TCRV $\alpha$ 7.2 PE (1:100, klon 3C10, BioLegend), MR1-5-OP-RU [5-(2-oxopropylideneamino)-6-D-ribitylamino] konjugiranim tetramerom obilježenim APC (1:100, NIH Tetramer Core Facility) (201) i TCR $\gamma\delta$  PE-Cy7 (1:100, klon B1, BioLegend).

Sortiranje je učinjeno s pomoću BIO-RAD S3e™ Cell Sortera (Bio-Rad Laboratories, SAD). Pri tome je iz ukupnih PBMC stanica izdvojeno minimalno 3000 MR1 reaktivnih T stanica te 15000  $\gamma\delta$  T stanica.

#### 4.3.5 Izolacija ukupne RNA

Za izolaciju ukupne RNA korišten je mirVana™ miRNA izolacijski set (Thermo Fisher Scientific, SAD) prema uputama proizvođača. Navedeni komplet namijenjen je za izolaciju RNA iz  $10^2$  -  $10^7$  stanica.

POSTUPAK: U suspenziju sortiranih stanica najprije je dodano 50  $\mu$ l miRNA *Homegenate Additive pufera*, a nakon 10 minuta inkubacije na ledu, još 500  $\mu$ l TRIzol reagensa i 100  $\mu$ l kloroforma. Uzorci su dobro promiješani na *vortex* miješalici, a zatim centrifugirani na sobnoj temperaturi, 5 min pri brzini od 10000 g. Gornja, vodena faza s udjelom RNA pažljivo je izdvojena pipetiranjem u novu tubicu, a donja je organska faza s ostacima staničnih makromolekula odbačena. U vodenu frakciju dodano je 625  $\mu$ l 100 % etanola sobne temperature. Pripremljena suspenzija propuštena je kroz filter kolonu, a vezani RNA materijal pročišćen je nizom susljednih ispiranja, najprije sa 700  $\mu$ l Wash otopine 1, a zatim s 500  $\mu$ l Wash otopine 2. Nakon svakog centrifugiranja protok je odbačen. Po završetku posljednjeg ciklusa ispiranja, na filter kolonice dodano je 40  $\mu$ l zagrijane (95 °C) vode bez primjesa DNA i

RNA nukleaza (NFW, od engl. *nuclease free water*), i ukupna RNA je eluirana centrifugiranjem 30 s pri brzini od 10 000 g.

Koncentracija i čistoća ( $OD_{260}/OD_{280} > 1.8$ ) RNA uzoraka analizirani su mjerenjem absorbancije na IMPLIN P-Class P-330 nanospektrofotometru (IMPLIN GmbH, Njemačka). Uzorci RNA pohranjeni su na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  do trenutka upotrebe.

#### 4.3.6 Kvantifikacija genske ekspresije primjenom RT-qPCR metode

##### *Sinteza komplementarne DNA*

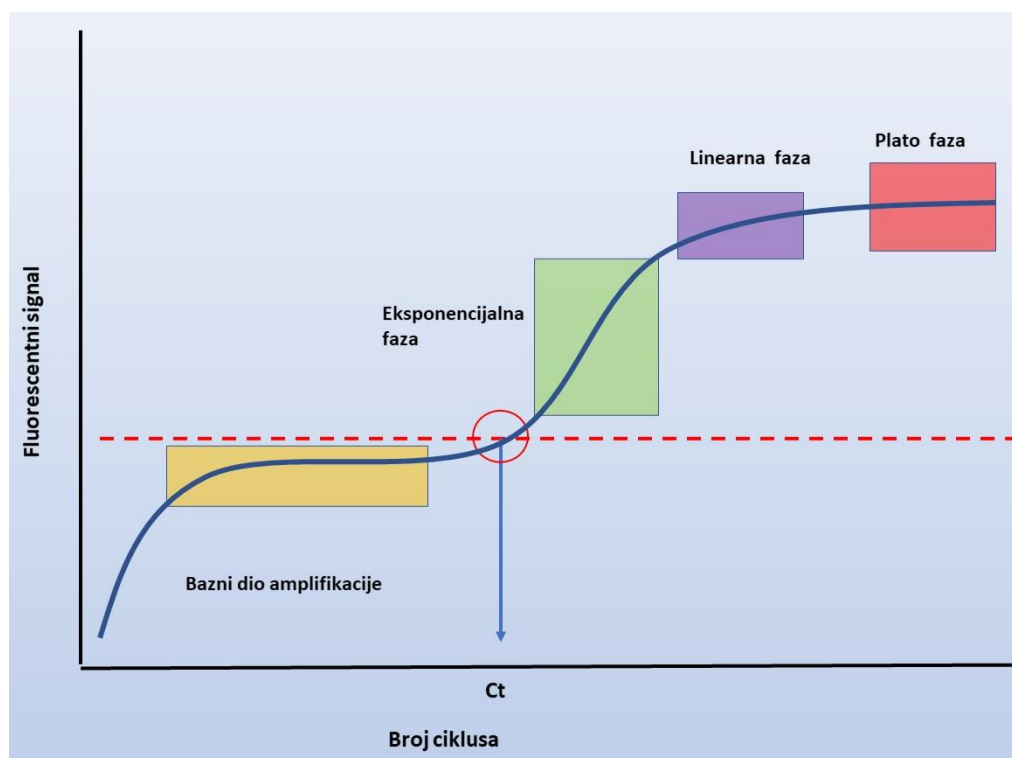
Sinteza cDNA (od engl. *complementary DNA*) podrazumijeva prepisivanje mRNA u komplementarne cDNA molekule primjenom odgovarajućih oligonukleotidnih početnica i enzima reverzne transkriptaze (RT). Brojnost dobivenih cDNA kopija u ispitivanim uzorcima može se zatim odrediti metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom (qPCR, od engl. *quantitative polymerase chain reaction*). Postupak cDNA sinteze učinjen je upotrebom PrimeScript™ RT Reagent komercijalnog kompleta (Takara Bio, SAD) prema uputama proizvođača.

POSTUPAK: Reakcijska smjesa ukupnog volumena 40  $\mu\text{l}$  sadržavala je 8  $\mu\text{l}$  PrimeScript™ pufera, 6  $\mu\text{l}$  NFW, 2  $\mu\text{l}$  oligo-dT početnica (2.5  $\mu\text{M}$ ), 2  $\mu\text{l}$  nasumičnih heksamernih oligonukleotida (5  $\mu\text{M}$ ), 2  $\mu\text{l}$  PrimeScript™ RT enzimske smjese te 20  $\mu\text{l}$  ukupne RNA radne koncentracije 5 ng/ $\mu\text{L}$ . Nakon pripreme reakcijske smjese, uzorci su inkubirani 15 minuta na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , nakon čega je reakcija reverzne transkripcije zaustavljena zagrijavanjem 5 s na  $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Dobivenu cDNA razrijedili smo 6 puta na ukupni volumen od 240  $\mu\text{l}$ . Uzorci su alikvotirani, i do trenutka upotrebe pohranjeni na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

##### *Kvantitativna lančana reakcija polimerazom*

qPCR precizna je i pouzdana metoda za kvantifikaciju DNA isječaka od interesa. Tijekom reakcije prati se fluorescentni signal kojeg emitiraju ekscitirani fluorescentno obilježeni DNA produkti nastali kao rezultat vezanja fluorescentno obilježenih boja (nespecifična detekcija) ili fluorescentno obilježenih oligonukleotidnih proba (specifična detekcija). Fluorescentni signal raste proporcionalno količini novonastale DNA, a promjene fluorescencije moguće je pratiti u obliku amplifikacijske krivulje (Slika 4.8.). Krivulja

amplifikacije sigmoidalnog je oblika i odražava stopu DNA amplifikacije na početku, sredini i kraju PCR reakcije.



**Slika 4.8. Krivulja amplifikacije isječaka DNA od interesa**

Bazni dio amplifikacijske krivulje prikazuje razinu fluorescencije na početku PCR reakcije (okvirno 0 - 18 ciklusa) kada fluorescencija nastalih DNA produkata ne nadmašuje pozadinsku fluorescenciju. Intenzitet fluorescentnog signala naglo raste u eksponencijalnoj fazi kada se broj DNA kopija udvostručuje u svakom PCR ciklusu. U linearnoj fazi, amplifikacija usporava radi iskorištenja jedne ili više komponenti smjese te u konačnici reakcija staje, a fluorescencijski signal prestaje rasti što predstavlja plato fazu. Eksponencijalna faza služi za kvantifikaciju fluorescencijskog signala u ispitivanim uzorcima, pri čemu se vrijednost PCR ciklusa u kojem fluorescencijski signal prelazi prag fluorescencije definira kao vrijednost graničnog ciklusa ili Ct vrijednost (engl. threshold cycle;  $C_t$  /  $C_q$  quantification cycle). Što je početna količina DNA kopija u ispitivanom uzorku veća, to će fluorescentni signal rasti brže pa će stoga izmjerena Ct vrijednost biti manja. Usporedbom Ct vrijednosti između uzoraka moguće je kvantificirati razlike u početnoj količini DNA materijala.

Za analizu razlike u količini DNA materijala mogu se koristiti metode apsolutne ili relativne kvantifikacije. Apsolutna kvantifikacija podrazumijeva usporedbu Ct vrijednosti u

nepoznatim uzorcima, s Ct vrijednostima serije standarda poznate koncentracije ciljnih DNA/RNA molekula. U nedostatku apsolutnih standardnih uzoraka, provodi se relativna kvantifikacija usporedbom Ct vrijednosti ciljnih gena s Ct vrijednostima referentnih ili „housekeeping“ gena. Procjena veličine razlike između normaliziranih Ct vrijednosti (engl. *fold difference* ili *fold change*) u uzorcima različitog podrijetla ili fenotipskog statusa može se provesti primjenom  $2^{-\Delta\Delta CT}$  metode autora Livak i suradnika (2002).

Važno je napomenuti da je za optimalnu usporedbu Ct vrijednosti ciljnih i referentnih gena bitno da učinkovitost PCR reakcije bude podjednaka. U suprotnom, značajna razlika u ekspresiji ciljnih u odnosu na referentne gene može izostati ili biti lažno naglašena. Učinkovitost PCR amplifikacije ciljnih i referentnih gena može se utvrditi pripremom standardne krivulje (dijagram dobivenih Ct vrijednosti u odnosu na logaritamske vrijednosti količine standarda) koja nastaje amplifikacijom najmanje 5 serijskih razrjeđenja uzoraka poznate koncentracije.

#### *Priprema standardnih krivulja*

Standardne krivulje ciljnih i referentnih gena pripremljene su RT-qPCR analizom 5 serijskih razrjeđenja uzorka poznate koncentracije cDNA. Sva mjerenja provedena su na uređaju QuantStudio 5 *real-time* PCR (Thermo Fisher Scientific, SAD), a analiza podataka učinjena je računalnim programom QuantStudio Design & Analysis Software v1.5.1.

POSTUPAK: Za pripremu standardne krivulje, odabrano je 6 uzoraka RNA radne koncentracije 20 ng/μl te je učinjena reverzna transkripcija u ukupnom volumenu od 20 μl na način kako je prethodno opisano u potpoglavlju *Sinteza komplementarne DNA*. Dobivena cDNA udružena je u jedinstveni uzorak volumena 120 μl koji je potom razrijeđen 3 puta dodatkom 240 μl RNase free H<sub>2</sub>O na ukupni volumen od 360 μl. U slijedećem koraku pripremljeno je 5 serijskih razrjeđenja, pri čemu je svaki uzorak razrijeđen 4 puta u odnosu na prethodni. Pripremljeni standardi poznate koncentracije alikvotirani su i do trenutka upotrebe pohranjeni na -20 °C.

#### *Analiza genske ekspresije s pomoću TaqMan proba*

Razina mRNA ekspresije ciljnih (*PLZF/ZBTB16*, *RUNX3*, *EOMES*, *TBX21*, *RORC*, *IL18R*, *CCR6*, *CCR10*, *SELPLG*) i referentnih gena (*TBP*, *ACTB1*) određena je RT-qPCR metodom primjenom fluorescentno obilježenih TaqMan oligonukleotidnih proba i QuantStudio 5 PCR uređaja. U izvornom obliku, na 5' kraju TaqMan probe kovalentno je vezan

fluorofor, čije fluorescentno zračenje apsorbira molekularni prigušivač (engl. *Q-quencher*) na 3' kraju. Prilikom sinteze novog DNA lanca, djelovanjem enzima Taq polimeraze, dolazi do cijepanja vezane TaqMan probe, posljedičnog razdvajanja fluorofora i prigušivača te emisije i detekcije fluorescentnog zračenja na kraju svakog PCR ciklusa.

POSTUPAK: Temperaturni uvjeti i raspored pipetiranja uzoraka i standarda dizajnirani su u računalnom programu QuantStudio Design & Analysis Software v 1.5.1. Za pripremu reakcijske smjese ukupnog volumena 15  $\mu$ l, korišteno je 7,5  $\mu$ l komercijalnog kompleta TaqMan® Universal PCR Master Mix (AppliedBiosystems, Foster City, Kalifornija, SAD), 0,75  $\mu$ l odgovarajuće TaqMan Expression probe, 2,75  $\mu$ l vode bez nukleaza i 4  $\mu$ l cDNA. U negativnu kontrolu, umjesto cDNA, dodano je 4  $\mu$ l vode. Pripremljena reakcijska smjesa pažljivo je pipetirana u mikrotitarske jažice PCR ploče koja je zatim prelijepljena prozirnomo plastičnom folijom i centrifugirana 1 min pri brzini od 3000 rpm na 4 °C. Amplifikacija ciljnih i referentnih gena u svim uzorcima učinjena je u triplicatu prema unaprijed definiranom temperaturnom protokolu (Tablica 4.2.). Standardi i negativne kontrole bili su dijelom svih qPCR eksperimenata i mjereni su u duplikatu.

**Tablica 4.2. Program za qRT-PCR**

		Temperatura	Vrijeme
Inkubacija		95 °C	10 min
45 ciklusa	Denaturacija	95 °C	15 s
	Vežanje početnica i elongacija	60 °C	1 min
„Hold“		4 °C	$\infty$

#### *Analiza učinkovitosti i preciznosti RT-qPCR reakcija*

Učinkovitost RT-qPCR amplifikacije ciljnih i referentnih gena provedena je analizom Ct vrijednosti standardnih serijskih razrjeđenja u računalnom programu Design & Analysis Software v 1.5.1.. Svi ispitivani TaqMan kompleti početnica i proba, pokazali su visoku

učinkovitost amplifikacije cDNA standarda, u rasponu od 83,1-102 % u  $\gamma\delta$  i od 77,5-96.9 % u MAIT uzorcima. Preciznost qPCR mjerenja i pouzdanost predviđanja koncentracije cDNA na temelju izmjerenih vrijednosti fluorescencije procijenjena je linearnim korelacijskim koeficijentom ( $R^2$ ). U svim qPCR reakcijama zabilježene su visoke vrijednosti  $R^2$  u rasponu od 0,990 – 0,999. Učinjena je i analiza varijabilnosti Ct vrijednosti standarda unutar jednog („intra-assay“) ili više („inter-assay“) qPCR eksperimenata. Varijabilnost unutar jednog qPCR testa bila je manja od 1,57 % za sve ispitivane transkripte, i manja od 2,93 % između različitih qPCR eksperimenata.

#### *Kvantifikacija genske ekspresije $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodom*

Relativna kvantifikacija genske ekspresije određena je u Microsoft Excel programu primjenom metode  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (203). Mjerenja ciljnih i referentnih gena izvedena u triplicatu, najprije su korištena za izračun srednjih Ct vrijednosti. Srednje Ct vrijednosti ciljnih gena izmjerene u PV i CTRL uzorcima normalizirane su u odnosu na srednje Ct vrijednosti referentnog TBP gena, primjenom sljedećih formula:

$$\Delta CT (PV) = CT \text{ ciljni gen} - CT \text{ kontrolni gen}$$

$$\Delta CT (CTRL) = CT \text{ ciljni gen} - CT \text{ kontrolni gen}$$

Dobivene  $\Delta Ct$  vrijednosti svih uzoraka zatim su normalizirane u odnosu na srednju  $\Delta Ct$  vrijednost kontrolne skupine prema sljedećoj formuli:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{uzorak}) - \Delta CT (\text{kontrola})$$

U konačnici, veličina razlike (engl. *Fold change*) normaliziranih razina genske ekspresije u PV i CTRL uzorcima određena je formulom:  $Fc = 2^{-\Delta\Delta CT}$

#### 4.3.7 Mjerenje serumskih razina citokina i kemokina

Serumske razine citokina IL-17A/F, IL-18, IL-23 i kemokina CCL20 (MIP-3 $\alpha$ ), CCL27 (C-TACK) izmjerene su primjenom Human Custom Procarta Plex 5-plex (eBioscience, Affymetrix) komercijalnog kompleta na Luminex 200 uređaju Medicinskog fakulteta, sveučilišta Palacký u Olomoucu, Češka. Metoda se temelji na principu „sendvič“ imunotesta, gdje dva različita protutijela prepoznaju različite epitope istog proteina. Uzorci seruma miješaju se s fluorescentno obilježenim magnetnim kuglicama ili mikrosferama koje na svojoj površini



nose protutijela usmjerena protiv specifičnih ciljnih antigena. Kompleks koji nastaje vezanjem magnetne kuglice, protutijela i antigena prepoznaje sekundarno, biotinom obilježeno protutijelo. Kompleks se detektira dodatkom streptavidina konjugiranog s fluorokromom, koji emitira fluorescentno zračenje u trenutku kada nastali kompleks prolazi pored detektora. Koncentracija ciljnih analita u nepoznatim uzorcima određuje se na temelju izmjerenih vrijednosti fluorescencije i njihove usporedbe s vrijednostima fluorescentnog signala serije standardnih razrjeđenja uzorka poznate koncentracije analita.

POSTUPAK: U uzorak seruma volumena 25  $\mu$ l dodano je 50  $\mu$ l magnetnih kuglica (mikrosfera) obloženih antitijelima i 25  $\mu$ l univerzalnog pufera. Nakon 2 h inkubacije na tresilici (500 rpm), i jednog ciklusa ispiranja, dodano je 25  $\mu$ l biotinizirane mješavine protutijela. Pripremljeni uzorci inkubirani su još 30 min uz kontinuiranu trešnju brzinom od 500 rpm. Nakon ispiranja i dodatka 50  $\mu$ l streptavidina konjugiranog s fikoeritriinom (SA-PE; od engl. *streptavidin conjugated phycoerythrin*) uzorci su ponovo inkubirani 30 min na tresilici pri brzini od 500 rpm. U konačnici, po završetku posljednjeg ciklusa ispiranja, uzorcima je pridruženo 120  $\mu$ l Reading pufera. Po isteku 5 min inkubacije fluorescencija je izmjerena na Luminex 200 uređaju. Svi uzorci seruma testirani su u duplikatu.

Paralelno s uzorcima, testirana su sedmerostruka serijska razrjeđenja standarda poznate koncentracije ispitivanih analita. Gornja (engl. *Upper Limit of Quantitation*, ULOQ) i donja granica osjetljivosti (engl. *Lower Limit of Quantitation* LLOQ) korištenih testova bile su sljedeće: IL-17A/F (LLOQ-ULOQ; 7,25 - 29700 pg/mL), IL-18 (14 - 14750 pg/mL), IL-23 (15 - 60900 pg/mL), CCL20 (6.49 - 6650 pg/mL) i CCL27 (2.47 - 10100 pg/mL). Zabilježene vrijednosti fluorescentnih signala u uzorcima i standardima analizirane su primjenom 5P logističkog fit algoritma u računalnom programu ProcartaPlex Analyst software v1.0 (eBioscience, Affymetrix).

#### 4.4 Statistički postupci

Veličina učinka (Cohenov  $d$ ,  $\Delta/SD$ ) potrebna za statističku snagu od 80% uz dvostrani  $\alpha=0,05$ , t-test, 2 neovisne skupine, normalna distribucija, iznosi 0,8 za uzorak od 20+20 ispitanika (GPOWER v3.1.9.4). Za procijenjene (204, 205), očekivane aritmetičke sredine učestalosti CD4<sup>+</sup> T (50 %), CD8<sup>+</sup> T (40 %), CD3<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  (6 %) i CD3<sup>+</sup> MAIT stanica (3 %) u perifernoj krvi zdravih osoba, uz pripadne standardne devijacije od 10 %, 8 %, 3 % i 1.5 %, razlika aritmetičkih sredina ( $\Delta$ ) iznosi 8 %, 6,4 %, 2,4 % i 1,2 %, odgovarajući biološki umjerenom do velikom učinku. Slijedom navedenog, Cohenov  $d$  fiksiran je na 0,8, odgovarajući biološki velikom učinku.

Normalnost distribucije promatranih brojeanih varijabli testirana je Sharipov-Wilkovim testom, a homogenost (jednakosti) varijanci Levenovim testom. Budući da su iste/skalarne varijable pokazale odstupanje od normalne distribucije, primijenjeni su neparametrijski testovi.

Kontinuirani (brojeani) podaci prikazani su medijanom s interkvartilnim rasponom (IQR, od engl. *interquartile range*,). Prije analize, razine vrijednosti CMV IgG u serumu su vinzorizirane (postupak zamjene ekstremnih vrijednosti najvećim ili najmanjim preostalim mjerenjem (206)). Mann-Whitneyev U-test korišten je za utvrđivanje statistički značajnih razlika u mjernim pokazateljima ispitivane i kontrolne skupine, a Fisherov egzaktni test primijenjen je na tablice kontigencije. Wilcoxon test sume rangova primijenjen je za testiranje razlike medijana uparenih uzoraka.

Povezanost pojedinih pokazatelja uparenih uzoraka procijenjena je Spearmanovim koeficijentom korelacije ( $\rho$ ), dok je Linov koeficijent konkordancije korišten za mjerenje slaganja na kontinuiranoj skali (207).

Analiza glavnih komponenti (PCA, od engl. *principal component analysis*) primjenjena je za prikaz logaritmiranih vrijednosti razlike genske ekspresije. Ukoliko nije drugačije naznačeno, dvostrani  $P<0.05$  predstavlja prag značajnosti.

Statističke analize provedene su pomoću NCSS2007 (v07.1.20, NCSS LLC, Kaysville, Utah, USA). Za PCA i grafički prikaz korišten je softver R v3.6.0 ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)) u okruženju RStudio v 1.2.5001 (RStudio Inc., Boston, MA, USA), zajedno s ComplexHeatmap, DescTools, factoextra, FactoMineR, ggjoy, ggplot2, ggpubr, Hmisc, missMDA, pheatmap, randomcoloR, RColorBrewer i tidyr paketima, računalnim programom Inkscape (Brooklyn, New York, SAD), GraphPad Prism v.9.0.0. te Microsoft PowerPoint 2019.

## 5 REZULTATI

### 5.1 Demografske, kliničko-antropometrijske, serološke i biokemijske karakteristike ispitanika

Rezultati analize demografskih i kliničko-antropometrijskih obilježja te seroloških vrijednosti virusnih i bakterijskih biljega oboljelih i zdravih ispitanika, prikazani su u tablici 5.1. U tablici 5.2 nalazi se, pak, prošireni prikaz rezultata analize biokemijskih parametara krvi. Skupine zdravih i oboljelih ispitanika nisu se značajno razlikovale po spolu, dobi i indeksu tjelesne mase (Tablica 5.1). Muškarci su u odnosu na ženske ispitanice, također, bili podjednake dobi (Mann-Whitney U test;  $p = 0,233$ ), bez značajnih razlika u odnosu na serumske razine hsCRP (Mann-Whitney U test;  $p = 0,75$ ) i anti-CMV IgG (Mann-Whitney U test;  $p = 0,726$ ), ali uz nešto veće BMI vrijednosti [(25,5 (23,2 - 27,8) vs. 21 (19,7 - 26,8) kg/m<sup>2</sup>; Mann-Whitney U test;  $p = 0,04$ ]. Svi ispitanici bili su negativni na biljege akutne infekcije *Mycobacterium tuberculosis*, hepatitis B (HbsAg, anti-HBc IgG, anti-HBc IgM, HBeAg, anti-HBe) i hepatitis C (anti-HCV) virusa. Suprotno, anti-HBs protutijela otkrivena su u 43 % (9/21) PV i 55 % (12/22) CTRL ispitanika, što u kontekstu negativnih rezultata svih ostalih HBV testova (HBsAg, anti-HBc IgG, anti-HBc IgM, HBeAg, anti-HBe) najvjerojatnije odražava posljedice prethodne imunizacije na HBV u okviru obveznog programa cijepljenja u Republici Hrvatskoj. Sukladno navedenom, usporedbom zdravih i oboljelih ispitanika, značajne razlike u seropozitivnosti i titru anti-HBs, ili anti-CMV IgM/IgG protutijela, nisu zabilježene (Tablica 5.1).

Vrijednosti mjernih elemenata kompletne krvne slike, jetrenih i bubrežnih parametara te eritrocitnih obilježja, bile su također podjednake u obje skupine (tablica 5.2). Serumska razina hsCRP bila je nešto viša u PV skupini ispitanika, međutim, uočene razlike nisu dosegnule statističku značajnost (Tablica 5.2).

U trenutku uzorkovanja krvi, PV ispitanici nisu primjenjivali ni jedan oblik lokalne ili sustavne terapije, a sudeći po vrijednostima PASI i DLQI skale, izražavali su uglavnom blaže simptome bolesti (Tablica 5.1). Povezanost PASI i DLQI rezultata s biokemijskim, virusnim i bakterijskim biljezima upale nije zabilježena.

**Tablica 5.1. Demografske, kliničko-antropometrijske i serološke karakteristike skupine ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze i kontrolne skupine ispitanika**

	PV	CTRL	P
<b>N (M/Ž omjer)</b>	21 (14/7)	22 (16/6)	0,75 **
<b>Dob (godine)</b>	33 (27 - 39)	32 (28 - 40)	0,922**
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	25,2 (21,3 - 29,1)	24,7 (20,7 - 27,1)	0,356*
<b>PASI</b>	7,7 (5,5 - 12,5)	-	-
<b>DLQI</b>	3,0 (1,0 - 6,5)	-	-
<b>Anti-CMV IgG (poz/neg)</b>	13/4	17/3	0,68**
<b>Anti-CMV IgG (AU/mL)</b>	145 (29 - 185)	136 (72 - 184)	0,866*
<b>Anti-CMV IgM (poz/neg)</b>	1/16	0/18	0,485**
<b>Anti-HBs IgG (mIU/mL)</b>	28 (0 - 153)	201 (16 - 725)	0,095*

PV- skupina ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze; CTRL – skupina kontrolnih, po dobi i spolu uparenih ispitanika; N – broj ispitanika; M – muški ispitanici; Ž – ženski ispitanici; BMI (engl. *Body mass index*) indeks tjelesne mase; PASI (engl. *Psoriasis area and severity index*) indeks zahvaćenosti kože i težine kliničke slike; DLQI (engl. *Dermatology life quality index*) dermatološki indeks kvalitete života; CMV - citomegalovirus; IgG/M – Immunoglobulin G/M; HBs – s antigen hepatitis B virusa.

Podaci su prikazani kao medijani s interkvartilnim rasponom (IQR), razlike između skupina su testirane \* Mann-Whitney U-testom ili \*\* Fisherovim egzaktnim testom, a  $p < 0,05$  se smatralo statistički značajno.

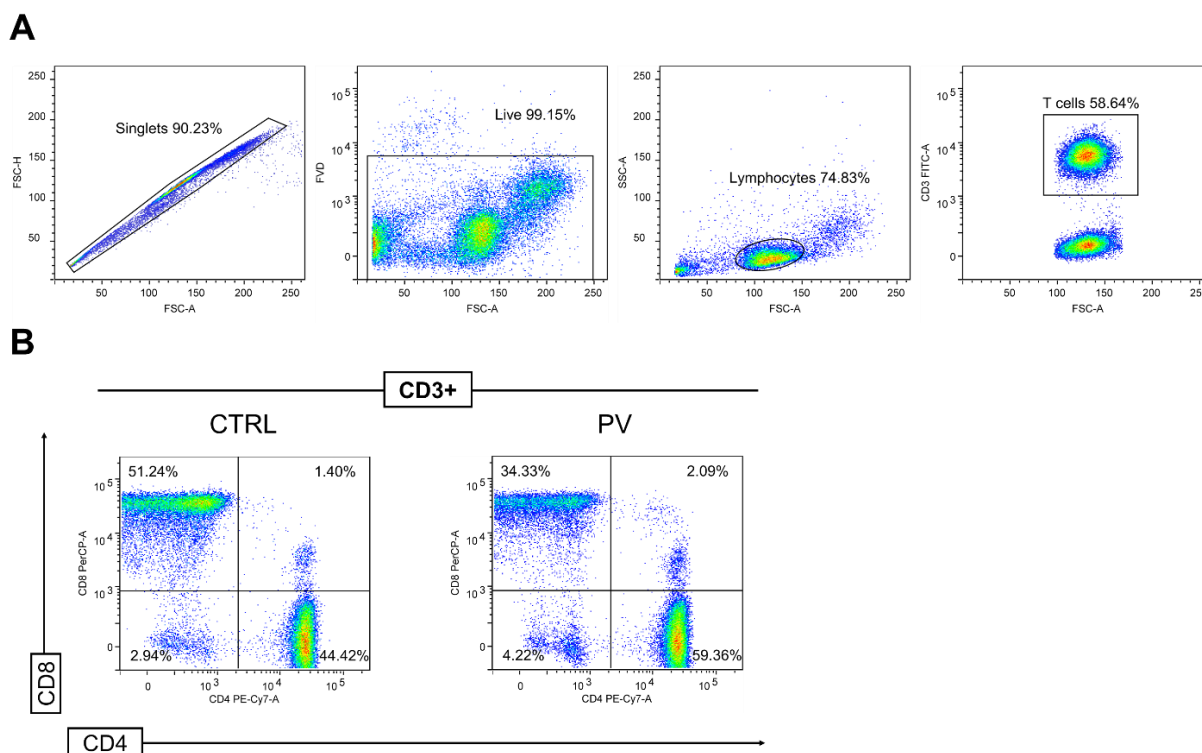
**Tablica 5.2. Biokemijske karakteristike skupine ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze i kontrolne skupine ispitanika**

	<b>PV</b>	<b>CTRL</b>	<b>P</b>
<b>N (M/Ž omjer)</b>	21 (14/7)	22 (16/6)	0,75 **
<b>hsCRP mg/L</b>	2,00 (0,70 - 3,20)	0,80 (0,50 - 1,80)	0,06*
<b>L x10<sup>9</sup> /L</b>	7,30 (5,75 - 8,83)	5,7 (4,90 - 7,65)	0,78**
<b>Ex10<sup>12</sup> /L</b>	4,99 (4,69 - 5,24)	4,99 (4,72 - 5,28)	0,64**
<b>Hb g/L</b>	151 (140,3 - 159,3)	147,5 (132,5 - 158,3)	0,43*
<b>Htc</b>	0,43 (0,42 - 0,47)	0,43 (0,39 - 0,47)	0,53*
<b>MCV fL</b>	88,8 (85,1 - 92,1)	86,0 (83,0 - 89,4)	0,08*
<b>MCH pg/L</b>	30,5 (29,5 - 31,3)	29,5 (28,2 - 30,3)	0,05**
<b>MCHC g/L</b>	343,0 (335,5 - 345,8)	339,50 (330,0 - 343,5)	0,29**
<b>RDW KV %</b>	13,0 (12,4 - 13,5)	12,50 (12,2 - 13,2)	0,16**
<b>Trc x10<sup>9</sup>/L</b>	243,0 (223,8 - 288,0)	250,00 (220,0 - 276,5)	0,75*
<b>MPV fl</b>	10,3 (10,1 - 10,9)	10,55 (9,95 - 10,9)	0,74**
<b>eo %</b>	3,00 (2,00 - 4,00)	2,00 (2,00 - 4,00)	0,62**
<b>ba %</b>	0,50 (0,00 - 1,00)	1,00 (0,00 - 1,00)	0,38**
<b>seg gr %</b>	54,5 (47,5 - 59,0)	51,0 (44,5 - 56,5)	0,15**
<b>l %</b>	32,0 (26,0 - 39,5)	37,0 (29,5 - 40,5)	0,28*
<b>mo %</b>	9,00 (7,00 - 9,60)	8,00 (7,00 - 10,0)	0,77**
<b>SE mm/3.6 KS</b>	5,00 (3,50 - 6,50)	4,00 (2,75 - 9,50)	0,89**
<b>AST U/L</b>	23,00 (18,00 - 30,00)	25,00 (21,50 - 27,75)	0,49**
<b>ALT U/L</b>	24,50 (16,00 - 31,00)	22,00 (15,75 - 37,25)	0,88**
<b>GGT U/L</b>	18,00 (13,00 - 36,00)	20,00 (12,75 - 29,25)	0,97**
<b>UREA mmol/L</b>	6,30 (4,43 - 8,75)	5,30 (3,88 - 6,30)	0,22**
<b>KREATININ (umol/L)</b>	70,00 (62,25 - 80,25)	72 (63,25 - 82,00)	0,71**

PV- skupina ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze; CTRL – skupina kontrolnih, po dobi i spolu uparenih ispitanika; N – broj ispitanika; M – muški ispitanici; Ž – ženski ispitanici; hsCRP – visoko osjetljivi C reaktivni protein (engl. high-sensitivity C reactive protein); L - leukociti; E – eritrociti; Hb – hemoglobin; Htc – hematokrit; MCV – (engl. *mean corpuscular volume*) prosječni volumen eritrocita; MCH – (engl. *mean corpuscular hemoglobin*) prosječni sadržaj hemoglobina u eritrocitu; MCHC – (engl. *mean corpuscular hemoglobin concentration*) prosječna koncentracija Hb u 1L eritrocita; RDW – (engl. *red cell distribution width*) raspodjela eritrocita po volumenu; Trc – trombociti; MPV – (engl. *mean platelet volumen*) prosječni volumen trombocita; eo – eozinofili; ba – bazofili; seg. gr. – segmentirani granulociti; l – limfociti; mo – monociti; SE- sedimentacija; AST – aspartat aminotransferaza; ALT – alanin aminotransferaza; GGT – gama glutamintransferaza. Podaci su prikazani kao medijani s interkvartilnim rasponom (IQR), razlike su između skupina testirane \* Mann-Whitney U-testom ili \*\* Studentovim t testom, a p<0,05 smatralo se statistički značajno.

## 5.2 Periferni udjeli $CD3^+$ , $CD4^+$ , $CD8^+$ , $CD4^+CD8^+$ i $CD4^-CD8^+$ limfocita T u ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze i kontrolne skupine ispitanika

Kvantitivni udjeli  $CD3^+CD4^+$  i  $CD3^+CD8^+$  limfocita T u ukupnom limfocitnom odjeljku periferne krvi određeni su protočnom citometrijom sukladno strategiji susljednog otvaranja prozora te izdvajanja regija od interesa (*gate-ova*) (Slika 5.1.).



**Slika 5.1** Reprezentativni primjer analize  $CD4^+$  i  $CD8^+$  limfocita T iz periferne krvi ispitanika metodom protočne citometrije

*Prikaz strategije susljednog otvaranja prozora te postavljanja gate-ova s ciljem izdvajanja jednostrukih živih  $CD4^+$  i  $CD8^+$  limfocita T. A) Jednostruke stanice (tzv. singlets) izdvojene su analizom FSC-A i FSC-H parametara. Među singletsima izdvojene su žive stanice na temelju bojenja FVD, a na temelju veličine stanica i njihove granuliranosti izdvojeni su potom limfociti. B) Periferni linije  $CD4^+$  i  $CD8^+$  limfocita izdvojeni su na temelju površinske izraženosti/ekspresije CD3 i CD4, odnosno CD3 i CD8 staničnih biljega. FVD – fiksabilna boja za vijabilnost (od engl. fixable viability dye); FITC - fluoresceinski izotiocijanatom (engl. fluorescein isothiocyanate) označeno protutijelo usmjereno na CD3; PerCP - od engl. peridinin chlorophyll protein označeno protutijelo usmjereno na CD8; PE-Cy7 - od engl. phycoerythrin coupled with cyanine dye (Cy7) označeno protutijelo usmjereno na CD4. Sve analize provedene su na protočnom citometru BD FACS Canto II i analizirane primjenom Flow Logic programa.*

**Tablica 5.3. Udjeli CD3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> i CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> limfocita T u perifernoj krvi ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze i kontrolne skupine ispitanika**

N (M/Ž omjer)	PV	CTRL	Mann-Whitney P <b>0.75</b>
	21 (14/7)	22 (16/6)	
% CD3 <sup>+</sup>	71,1 (62,3 - 74,7)	68,6 (58,2 - 75,3)	0.601
% CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	59,7 (49,1 - 61,4)	53,4 (43,8 - 58,9)	<b>0.023</b>
% CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	35,5 (31,5 - 45,4)	40,3 (37,6 - 49,6)	<b>0.022</b>
% CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> (DP)	1 (0,26 – 1, 71)	0,76 (0,48 – 1,24)	0.928
% CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> (DN)	3,46 (2,76-4,36)	4,07 (3,25 -5,65)	0.156

PV- skupina ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze; CTRL – skupina kontrolnih, po dobi i spolu uparenih ispitanika; N – broj ispitanika; M – muški ispitanici; Ž – ženski ispitanici; DP – dvostruko pozitivni; DN – dvostruko negativni.

Podaci su prikazani kao medijani s interkvartilnim rasponom (IQR), razlike između skupina testirane su Mann-Whitney U-testom, a  $p < 0,05$  se smatralo statistički značajnim.

Usporedbom relativnih frekvencija perifernih CD3<sup>+</sup> limfocita T kod kontrolnih (CTRL) i oboljelih (PV) ispitanika nisu zabilježene značajne razlike među skupinama (Tablica 5.3.). Međutim, relativne frekvencije CD4<sup>+</sup> limfocita unutar CD3<sup>+</sup> populacije bile su značajno povišene kod oboljelih ispitanika (PV) u odnosu na zdrave kontrole (CTRL) (Tablica 5.3.). Istovremeno, u skupini oboljelih zabilježeno je značajno smanjenje relativnih udjela CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> limfocita T (Tablica 5.3.).

U sljedećem koraku učinjena je usporedna analiza perifernih CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, dvostruko pozitivnih (DN) CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> i dvostruko negativnih (DN) CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> limfocita T kod oboljelih (PV) (N = 14) i zdravih muških ispitanika (CTRL) (N = 16); ženskih ispitanika bilo je premalo za odgovarajuću usporedbu (PV vs. CTRL: 7 vs. 6). U odnosu na zdrave muške kontrole, oboljeli muški ispitanici imali su smanjenu frekvenciju CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> limfocita T u krvi te nešto veće udjele CD4<sup>+</sup> (Tablica 5.4.). Relativna frekvencija preostalih CD3<sup>+</sup> subpopulacija, uključujući CD8<sup>+</sup> i dvostruko pozitivne CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> stanice nije se značajno razlikovala između zdravih i oboljelih muških ispitanika (Tablica 5.4.).

**Tablica 5.4. Usporedna analiza perifernih CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> i CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> limfocita T kod muških ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze i kontrolne skupine muških ispitanika**

N (M)	PV (%)	CTRL (%)	P
	14	16	
CD3 <sup>+</sup>	71,9 (56,8 – 76,9)	70,1 (57,2-75,6)	0,693
CD4 <sup>+</sup>	56,3 (46,7 - 62,6)	49,2 (40 - 54,7),	<b>0,037**</b>
CD8 <sup>+</sup>	38,0 (33,6 - 48,1)	44,8 (37,2 - 50,6)	0,152*
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> (DP)	0,58 (0,22 - 1,7)	0,86 (0,58 - 1,46),	0,406*
CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> (DN)	3,3 (2,8 - 3,8)	4,5 (3,7 - 7,4)	<b>0,003*</b>

PV- skupina ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze; CTRL – skupina kontrolnih, po dobi i spolu uparenih ispitanika; N – broj ispitanika; M – muški ispitanici; DP – dvostruko pozitivni; DN – dvostruko negativni. Podaci su prikazani kao medijani s interkvartilnim rasponom (IQR), razlike između skupina testirane su \* Mann-Whitney U-testom ili \*\* Studentovim t testom a p<0,05 se smatralo statistički značajno.

Štoviše, preraspodjelom ispitanika u odnosu na spol i usporedbom relativnih udjela CD3<sup>+</sup> subpopulacija između muškaraca i žena (M = 30 vs. Ž = 13), značajne razlike u frekvenciji CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, DP i DN stanica, nisu zabilježene (Tablica 5.5.).

**Tablica 5.5. Usporedna analiza perifernih CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> i CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> limfocita T nakon raspodjele po spolu u združenom uzorku ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze i kontrolne skupine ispitanika**

N	PV (%) + CTRL (%)		Mann-Whitney P
	M (30)	Ž (13)	
CD3 <sup>+</sup>	71,3 (57,2 – 75,7)	68,1 (63,2 – 72,4)	0,625
CD4 <sup>+</sup>	53,4 (45,1-60,2)	59,4 (56,3-60,3)	0,088
CD8 <sup>+</sup>	40,8 (35,3-48,9)	35,9 (33,1-39,4)	0,083
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> (DP)	0,8 (0,4-1,6)	0,9 (0,41-1,5)	0,979
CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> (DN)	3,8 (3,1-4,9)	0,2 (2.6-5.4)	0,296

PV- skupina ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze; CTRL – skupina kontrolnih, po dobi i spolu uparenih ispitanika; N – broj ispitanika; M – muški ispitanici; Ž – ženski ispitanici; DP – dvostruko pozitivni; DN – dvostruko negativni. Podaci su prikazani kao medijani s interkvartilnim rasponom (IQR), razlike između skupina testirane su Mann-Whitney U-testom, a p<0,05 se smatralo statistički značajno.



### 5.2.1 Povezanost relativnih udjela perifernih limfocitnih populacija s demografskim, kliničkim i biokemijskim obilježjima ispitanika

S ciljem uvida u dinamiku povezanosti relativnih udjela perifernih limfocita s demografskim (dob, spol, BMI indeks), serološkim (anti-CMV IgM/IgG, anti-HBs IgG, anti-HCV), biokemijskim (razinama hsCRP-a) i kliničkim (PASI, DLQI) obilježjima ispitanika učinjena je Spearmanova analiza. Slijedom navedenog, u skupini oboljelih ispitanika, vrijednosti skale PASI pozitivno su korelirale s relativnim udjelima leukocita ( $\rho = 0.437$ ,  $p = 0.047$ ,  $n = 21$ ), ali ne i s frekvencijom pojedinih T limfocitnih subpopulacija. Povezanost frekvencijskih udjela CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, DP i i DN stanica bila je također neovisna o dobi, spolu, titru ili seropozitivnim nalazima virusnih i bakterijskih biljega, BMI i DLQI statusu. Isto je uočeno u skupini zdravih kontrola (podaci nisu prikazani).

Međutim, u združenom uzorku ispitanika (PV i CTRL) uočena je pozitivna korelacija između seropozitivnog CMV IgG nalaza i relativne frekvencije perifernih CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> limfocita T ( $\rho = 0.338$ ,  $p = 0.041$ ,  $n = 37$ ). Štoviše, u usporedbi s CMV seronegativnim ispitanicima ( $N = 6$ ), CMV seropozitivne osobe ( $N = 31$ ) imale su značajno veće udjele CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> limfocita T u perifernoj krvi (Tablica 5.6.). Zanimljivo, na razini ukupne populacije ispitanika, zabilježena je i pozitivna korelacija između vrijednosti skale PASI i serumskih razina hsCRP ( $\rho = 0.377$ ,  $p = 0.033$ ,  $n = 32$ )

**Tablica 5.6. Udio CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> limfocita T kod citomegalovirus seropozitivnih i citomegalovirus seronegativnih ispitanika**

% CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> limfocita	PV (%) + CTRL (%)		Mann-Whitney P
	CMV IgG <sup>+</sup>	CMV IgG <sup>-</sup>	
N (M+F)	<b>31</b>	<b>6</b>	
	36,4 (31,9-44,8)	31,1 (26,8-37,6)	0,044

PV- skupina ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze; CTRL – skupina kontrolnih, po dobi i spolu uparenih ispitanika; N – broj ispitanika; M – muški ispitanici; Ž – ženski ispitanici; CMV IgG<sup>+</sup> – cytomegalovirus seropozitivni; CMV IgG<sup>-</sup> – cytomegalovirus seronegativni.  
Podaci su prikazani kao medijani s interkvartilnim rasponom (IQR), razlike između skupina testirane su Mann-Whitney U-testom, a  $p < 0,05$  se smatralo statistički značajno.

### 5.3 Razina kemokina i citokina u serumu periferne krvi oboljelih i zdravih ispitanika

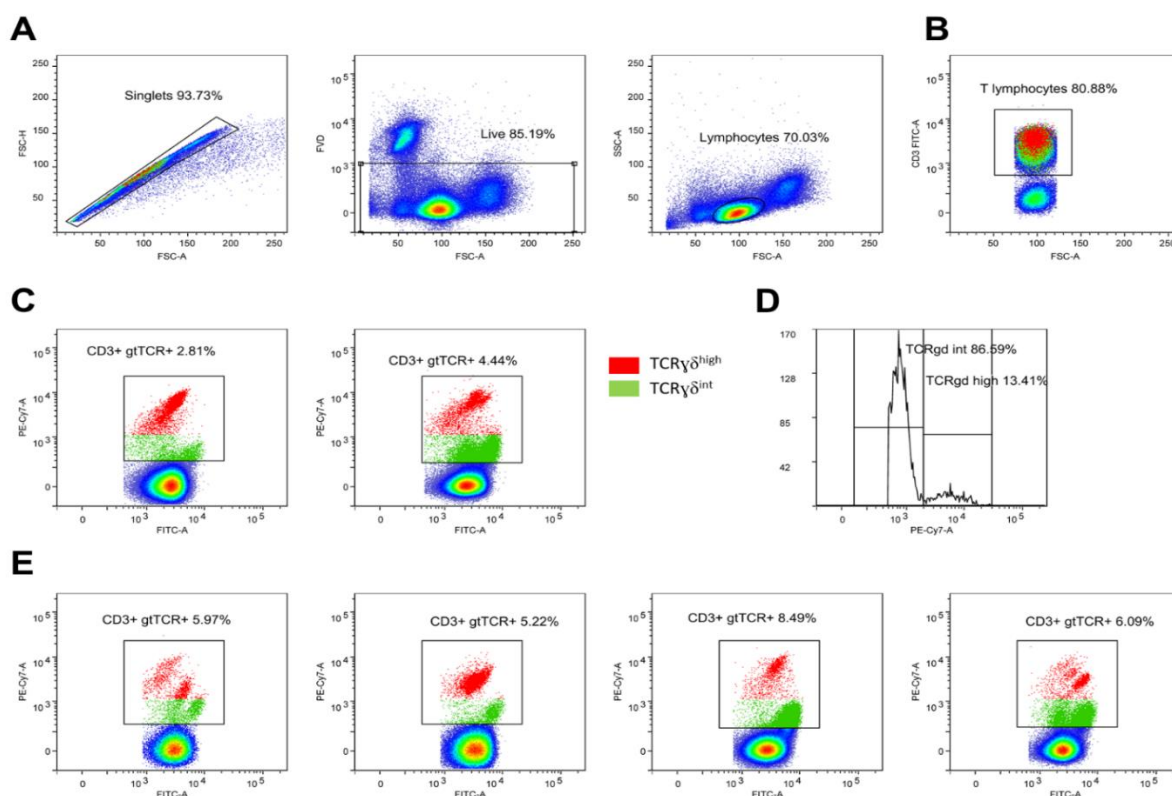
Serumske razine IL-17A/F, IL-23 i CCL20 bile su ispod donjih granica detekcije u svim ispitivanim uzorcima.

Serumske vrijednosti dva detektibilna analita, tj. CCL27, liganda CCR10 receptora koji usmjerava migraciju CD162 (CLA)<sup>+</sup> T stanica na upalna mjesta u koži, i IL-18, varirale su između 66,78 - 618,04 pg/ml i 3,22 - 23,57 pg/ml u svim analiziranim uzorcima (PV i CTRL).

Usporedbom mjerenja PV i CTRL skupine, značajne razlike u serumskoj razini kemokina CCL27 [medijan (IQR): 352,7 (267,4 - 496,6) vs. 343,5 (203,6 - 487,7) pg/ml, Fisherov egzaktni test,  $p = 0,704$ ] i citokina IL-18 [medijan (IQR): 9,1 (8,1-13,1) vs. 9,2 (8,3 - 10,7) pg/ml,  $p = 0,64$ ] nisu zabilježene. Zanimljivo, kod oboljelih od PV, serumske razine IL-18 pozitivno koreliraju s BMI statusom ( $\rho = 0,458$ ,  $p = 0,049$ ,  $n = 19$ ), a promjene CCL27 vrijednosti združene populacije uzoraka (PV + CTRL) pozitivno su vezane uz serumske razine upalnog biljega hsCRP ( $\rho = 0,4$ ,  $p = 0,033$ ,  $n = 32$ ). Povezanost CCL27 i/ili IL-18 s dobi, spolom, težinom bolesti, CMV IgG titrom ili seropozitivnosti, međutim, nije zabilježena.

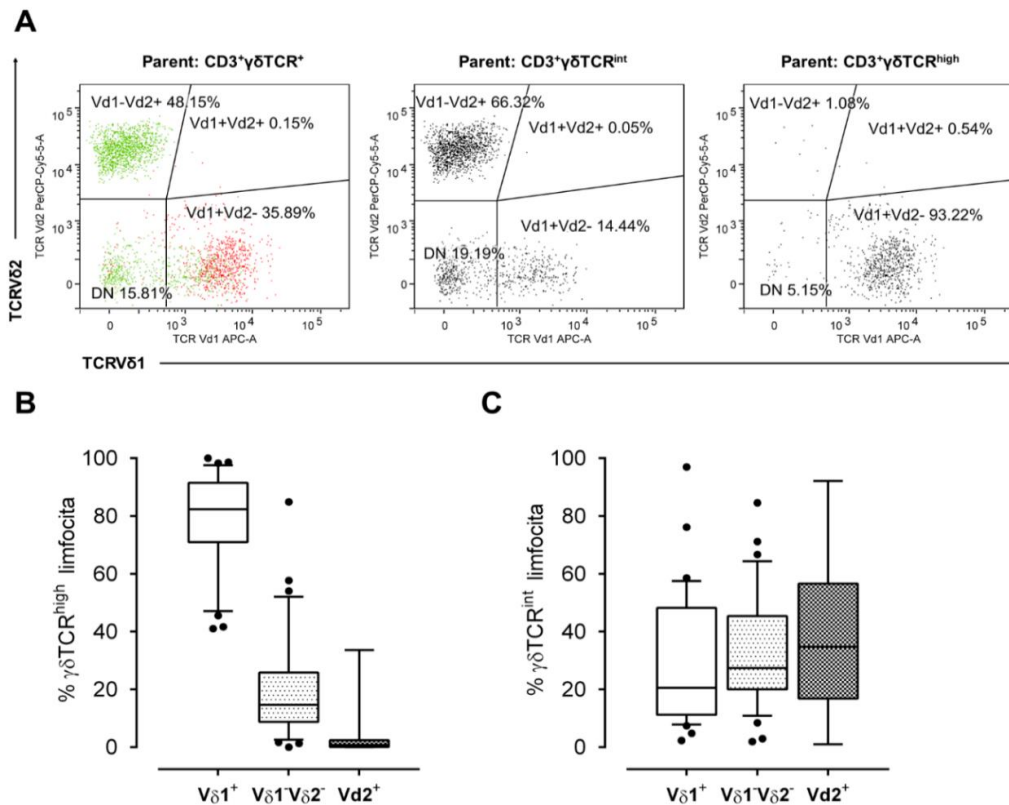
### 5.4 Utjecaj CMV i BMI statusa te razine citokina i kemokina u serumu na relativne udjele i fenotip perifernih CD3<sup>+</sup> $\gamma\delta$ TCR<sup>+</sup> populacija

U perifernoj krvi subpopulacije  $\gamma\delta$  T limfocita mogu se međusobno razlikovati na temelju različite ekspresije  $\gamma\delta$ TCR receptora i CD3 koreceptorskih molekula (172). Sukladno navedenom, CD3<sup>+</sup> $\gamma\delta$ TCR<sup>high</sup>  $\gamma\delta$  T stanice izražavaju veći broj  $\gamma\delta$ TCR molekula, s manjom površinskom ekspresijom CD3. Suprotni obrasci ekspresije vidljivi su kod CD3<sup>+</sup> $\gamma\delta$ TCR<sup>int</sup> subpopulacije (Slika 5.2. C i D). Slijedom navedenog, u perifernoj krvi većine naših ispitanika mogle su se razlikovati najmanje dvije subpopulacije  $\gamma\delta$  T stanica, tj. veća frakcija koju čine CD3<sup>+</sup> $\gamma\delta$ TCR<sup>int</sup> stanice te manja frakcija koju čine CD3<sup>+</sup> $\gamma\delta$ TCR<sup>high</sup> stanice (Slika 5.2. i tablica 5.8.). Dodatne, individualne razlike u distribuciji  $\gamma\delta$  T subpopulacija bile su vidljive kao višestruki difuzni obrasci bojenja i prikazane su na Slici 5.2. E. Štoviše, unutar CD3<sup>+</sup> $\gamma\delta$ TCR<sup>high</sup> i CD3<sup>+</sup> $\gamma\delta$ TCR<sup>int</sup> subpopulacija moguće je primijetiti više staničnih podrazreda koji se međusobno razlikuju na temelju različitog repertoara  $\delta$ -lanca  $\gamma\delta$  T staničnog receptora. U našim uzorcima, unutar CD3<sup>+</sup> $\gamma\delta$ TCR<sup>int</sup> populacije, kvantitativno veći udio činile su V $\delta$ 2<sup>+</sup> stanice, brojčano nadmašujući V $\delta$ 1<sup>+</sup> i V $\delta$ 1<sup>-</sup>V $\delta$ 2<sup>-</sup> podskupine (Slika 5.3. A i C). Suprotno tome, V $\delta$ 1<sup>+</sup> stanice dominirale su unutar CD3<sup>+</sup> $\gamma\delta$ TCR<sup>high</sup> stanične populacije (Slika 5.3. A i B).



**Slika 5.2. Reprezentativni primjer analize  $\gamma\delta^+$  limfocita T iz periferne krvi ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze i kontrolne skupine ispitanika metodom protočne citometrije.**

*Prikaz strategije susljednog otvaranja prozora te postavljanja gate-ova s ciljem izdvanja  $\gamma\delta^+$  limfocita T. A) Jednostruke stanice (tzv. singlets) izdvojene su analizom FSC-A i FSC-H parametara. Među singletsima izdvojene su žive stanice na temelju bojenja FVD, a na temelju veličine stanica i njihove granuliranosti (forward scatter area (FSC-A) i side scatter area (SSC-A) izdvojeni su potom limfociti. B) Periferne linije limfocita T definirane kao  $CD3^+$  stanice unutar cijelog odjeljka limfocita. C), D), E)  $\gamma\delta$  limfociti prvo su definirani na temelju izraženosti/ekspresije CD3 i TCR $\gamma\delta$  staničnih biljega, potom na temelju izražaja pan- $\gamma\delta$  podijeljeni su u dvije subpopulacije  $\gamma\delta$  T limfocita :  $CD3^+\gamma\delta TCR^{int}$  i  $CD3^+\gamma\delta TCR^{high}$  T limfocite. Panel C) i E) prikazuje individualne razlike u distribuciji subpopulacija  $\gamma\delta$  T limfocita. FVD – fiksabilna boja za vijabilnost (od engl. fixable viability dye); TCR – T stanični receptor (engl. T cell receptor); FITC – fluoresceinski izotiocijanatom (engl. fluorescein isothiocyanate) označeno protutijelo usmjereno na CD3 , PE-Cy7 – od engl. phycoerythrin coupled with cyanine dye (Cy7) označeno protutijelo usmjereno na  $\gamma\delta TCR$ . Sve analize provedene su na protočnom citometru BD FACS Canto II I analizirane primjenom Flow Logic programa.*



**Slika 5.3. Reprezentativni primjer analize subpopulacija  $\gamma\delta^+$  limfocita T iz periferne krvi te zastupljenost  $V\delta 1^+$ ,  $V\delta 2^+$  i  $V\delta 1^-V\delta 1^-$  subpopulacija unutar  $TCR\gamma\delta$  staničnog odjeljka ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze i kontrolne skupine ispitanika metodom protočne citometrije te prikaz njihovih relativnih frekvencija.**

*A) Prikaz strategije analize subpopulacija  $\gamma\delta$  T limfocita ovisno o prisutnosti  $V\delta 1$  i  $V\delta 2$  staničnih biljega;  $V\delta 1^+$ ,  $V\delta 2^+$  i  $V\delta 1^-V\delta 1^-$  limfociti T analizirani su unutar  $CD3^+ \gamma\delta TCR^{int}$  i  $CD3^+ \gamma\delta TCR^{high}$  staničnog odjeljka **B) Pravokutnim/kutijastim ili „box – plot“ dijagramom prikazane su frekvencije  $V\delta 1^+$ ,  $V\delta 2^+$  i  $V\delta 1^-V\delta 1^-$  limfocita T unutar **B)  $\gamma\delta TCR^{high}$  i **C)  $\gamma\delta TCR^{int}$  staničnog odjeljka u perifernoj krvi združenog uzorka (PV i CTRL). Rezultati su prikazani medijanima s interkvartilnim rasponom (IQR). Medijan predstavlja horizontalnu liniju unutar svakog „box – plota“. Interkvartilni rasponi (IQR)  $IQR_3$  i  $IQR_1$ , označeni su gornjom i donjom linijom „box – plota“, a  $1.5 \times IQR$  predstavljen je vertikalnim linijama. Ekstremne vrijednosti prikazane su crnim točkama. Razlike između skupina određene su primjenom Mann-Whitney testa; \* Prag značajnosti definiran je kao dvostrani  $p < 0,05$ ; N (PV (16) + CTRL (18)) = 34 ispitanika. TCR – T stanični receptor (engl. T cell receptor); APC – fluorescentnim proteinom označeno protutijelo usmjereno na  $V\delta 1^+$ , PerCP – od engl. peridinin chlorophyll protein označeno protutijelo usmjereno na  $V\delta 2^+$ . Sve analize provedene su na protočnom citometru BD FACS Canto II I analizirane primjenom Flow Logic programa*******

#### 5.4.1 Utjecaj CMV i BMI statusa na frekvenciju CD3<sup>+</sup>γδTCR<sup>+</sup> stanica i TCRδ subpopulacija u perifernoj krvi

Nakon analize fenotipskih obilježja γδ T limfocita u perifernoj krvi svih ispitanika, analizirani su čimbenici koji utječu na njihovu frekvencijsku dinamiku. Među prvima, promatrani su učinci CMV seropozitivnosti, CMV IgG titra i BMI statusa.

U združenom uzorku (PV+CTRL) CMV seropozitivnih ispitanika, u odnosu na CMV seronegativne osobe, zabilježen je povećani udio CD3<sup>+</sup>γδTCR<sup>high</sup> stanica (Tablica 5.7.). Slični učinci prethodne CMV infekcije, međutim, nisu uočeni na razini CD3<sup>+</sup>γδTCR<sup>int</sup> odjeljka (Tablica 5.7.).

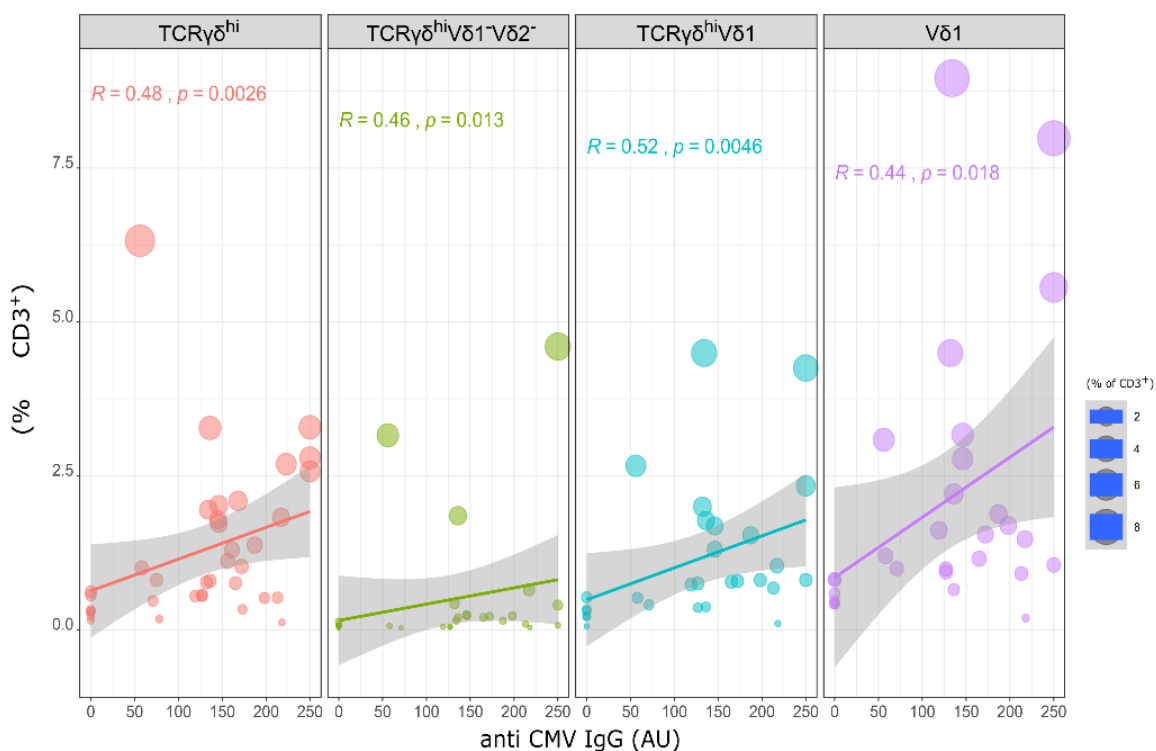
**Tablica 5.7. Utjecaj citomegalovirus serološkog statusa na relativne udjele CD3<sup>+</sup>γδTCR<sup>high</sup> i CD3<sup>+</sup>γδTCR<sup>int</sup> stanica periferne krvi u združenom uzorku ispitanika %CD3<sup>+</sup>TCRγδ<sup>+</sup> limfocita**

N (PV+CTRL)	CMV IgG+	CMV IgG-	Mann-Whitney P
	31	6	
CD3 <sup>+</sup> TCRγδ <sup>high</sup>	0,85 (0,55 – 1,77)	0,16 (0,08 – 0,21)	0.0024
CD3 <sup>+</sup> TCRγδ <sup>int</sup>	2,68 (1,46 – 4,02)	2,13 (0,72 – 3,85)	0.484

PV- skupina ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze; CTRL – skupina kontrolnih, po dobi i spolu uparenih ispitanika; N – broj ispitanika; CMV IgG<sup>+</sup> – cytomegalovirus seropozitivni; CMV IgG<sup>-</sup> – cytomegalovirus seronegativni.

Podaci su prikazani kao medijani s interkvartilnim rasponom (IQR), razlike između skupina testirane su Mann-Whitney U-testom, a p<0,05 se smatralo statistički značajno.

Zabilježeni porast CD3<sup>+</sup>γδTCR<sup>high</sup> stanične populacije kod CMV seropozitivnih ispitanika, odraz je povećanja udjela Vδ1<sup>+</sup> stanica koje, pak, pozitivno koreliraju s povećanjem serumskih vrijednosti CMV IgG titra (Slika 5.4.). Zanimljivo, osim Vδ1<sup>+</sup> stanica, s povišenim vrijednostima CMV IgG protutijela pozitivno koreliraju i periferni udjeli Vδ1<sup>-</sup>Vδ2<sup>-</sup> podskupine CD3<sup>+</sup>γδTCR<sup>high</sup> (Slika 5.4.), što potvrđuje ranije navode koji pokazuju da CMV odgovor kod ljudi nije ograničen na Vδ1<sup>+</sup> populaciju γδ T limfocita (43).

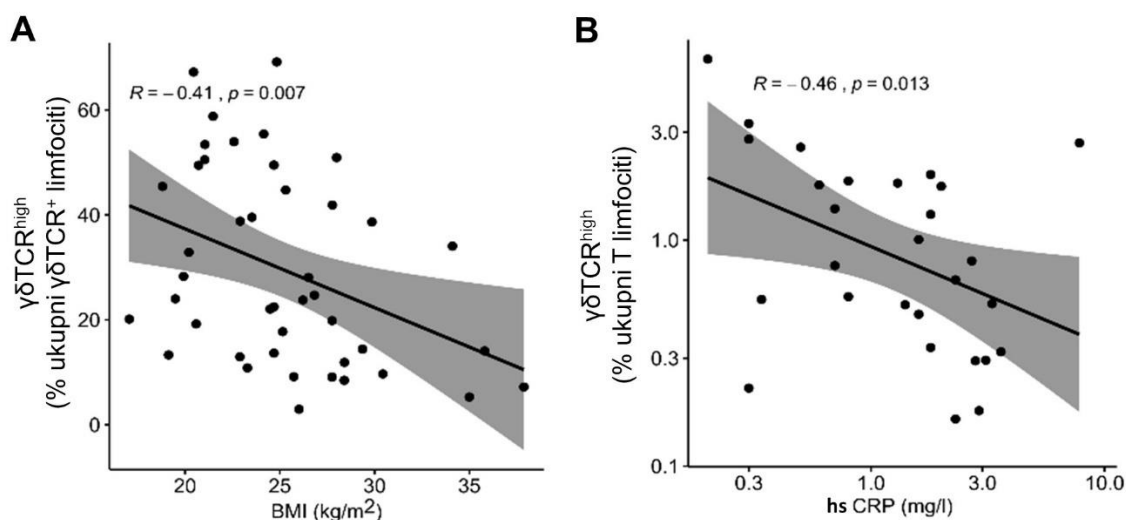


**Slika 5.4. Utjecaj citomegalovirus serološkog statusa na zastupljenost  $\gamma\delta$  T subpopulacija u perifernoj krvi svih ispitanika**

*Prikaz udjela  $V\delta 1^+$  i  $V\delta 1^-V\delta 2^-$  subpopulacija unutar  $CD3^+ \gamma\delta TCR^{high}$  staničnog odjeljka u perifernoj krvi združenog uzorka (PV i CTRL skupine ispitanika) prema CMV statusu.  $R$  predstavlja Spearmanov koeficijent korelacije. Veličina točke odražava postotak stanica koje izražavaju izražene/ekspimirane stanične biljege, dok boja kodira identitet tipa stanice unutar grupe. Zasjenjena regija pokazuje 95 % interval pouzdanosti. Linija unutar zasjenjene regije predstavlja linearni regresijski pravac. PV- skupina ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze; CTRL – skupina kontrolnih, po dobu i spolu uparenih ispitanika; TCR - T stanični receptor (engl. T cell receptor); anti CMV IgG- – protutijelo klase IgG usmjereno na citomegalovirus.*

Osim CMV statusa, u sljedećem koraku promatrani su učinci BMI vrijednosti i upalnog opterećenja u akutnoj fazi (vrijednosti hsCRP-a), na periferne udjele  $CD3^+ \gamma\delta TCR^+$  stanica. Slijedom navedenog, uočeno je da frekvencija  $CD3^+ \gamma\delta TCR^{high}$  subpopulacije u perifernoj krvi opada s povećanjem BMI (Slika 5.5. A) i serumskim razinama hsCRP (Slika 5.5. B). S druge strane, oscilacije BMI i CRP vrijednosti nisu bile vezane uz promjene relativnih udjela  $CD3^+ \gamma\delta TCR^{int}$  stanica.

Ukupno gledajući, zabilježeni korelacijski obrasci potvrđuju važan utjecaj CMV, BMI i hsCRP statusa u oblikovanju cirkulirajućih udjela  $CD3^+\gamma\delta TCR^{high}$  stanica, što je u skladu s ranije opisanom obrambenom ulogom  $\gamma\delta$  T staničnih linija prilikom CMV infekcije (185) te fiziološkim ulogama  $\gamma\delta$  T limfocita u kontroli homeostaze i termogeneze u masnom tkivu (173).



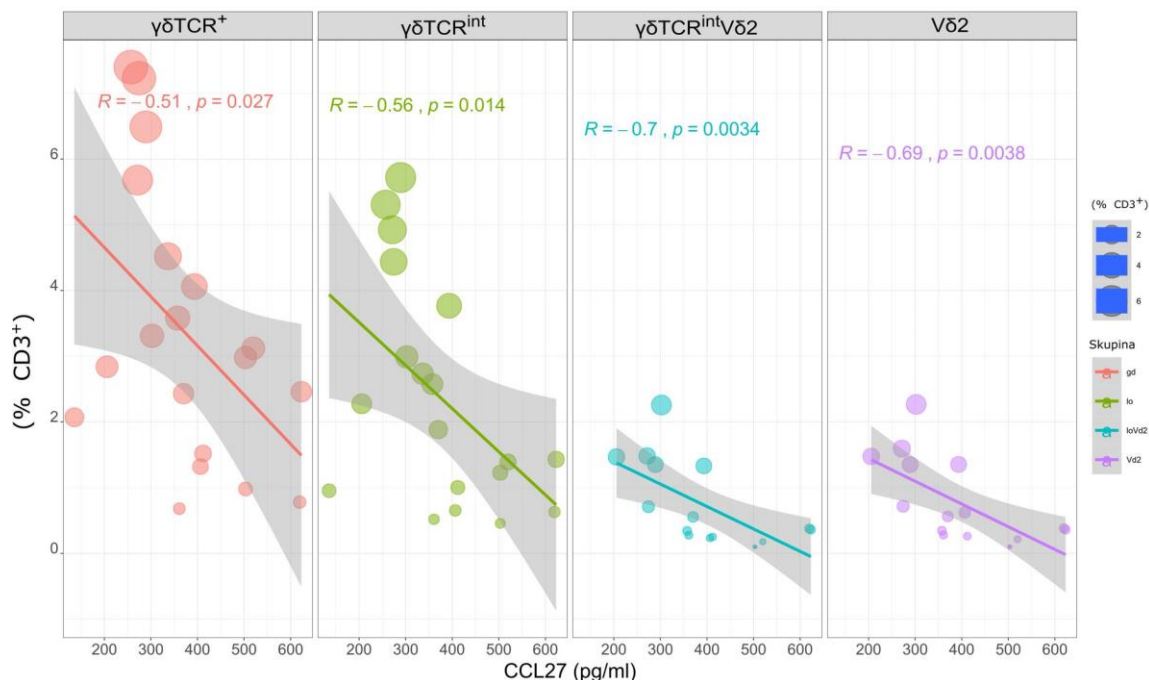
**Slika 5.5. Utjecaj indeksa tjelesne mase i visoko osjetljivog C-reaktivnog proteina na udjele cirkulirajućih  $CD3^+\gamma\delta TCR^{high}$  T stanica u združenom uzorku ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze i kontrolne skupine ispitanika**

*Prikaz povezanosti promjene perifernih udjela  $CD3^+\gamma\delta TCR^{high}$  staničnog odjeljka združenog uzorka (PV i CTRL skupine ispitanika) s promjenama BMI i hsCRP vrijednosti. R predstavlja Spearmanov koeficijent korelacije. Crna linija predstavlja linearni regresijski pravac. Zasjenjena regija pokazuje 95 % interval pouzdanosti. BMI --indeks tjelesne mase (engl. body mass index); hsCRP - visoko osjetljivi C reaktivni protein (engl. high-sensitivity C reactive protein); TCR - T stanični receptor (engl. T cell receptor);*

#### 5.4.2 Utjecaj serumske razine ispitivanih citokina i kemokina na frekvenciju $CD3^+\gamma\delta TCR^+$ stanica i TCR $\delta$ podskupina u perifernoj krvi

U sljedećem koraku analiziran je utjecaj razine ispitivanih serumskih citokina i kemokina, na kvantitativne i fenotipske karakteristike  $\gamma\delta$  T staničnog odjeljka oboljelih od vulgarne psorijaze (PV) i kontrolne skupine ispitanika (CTRL).

Kod oboljelih od vulgarne psorijaze (PV) brojnost perifernih  $CD3^+\gamma\delta TCR^+$  i  $CD3^+\gamma\delta TCR^{int}$  populacija negativno je korelirala s porastom serumske razine CCL27, ponajviše kao posljedica smanjenja broja  $V\delta 2^+$  subpopulacije (Slika 5.6.).

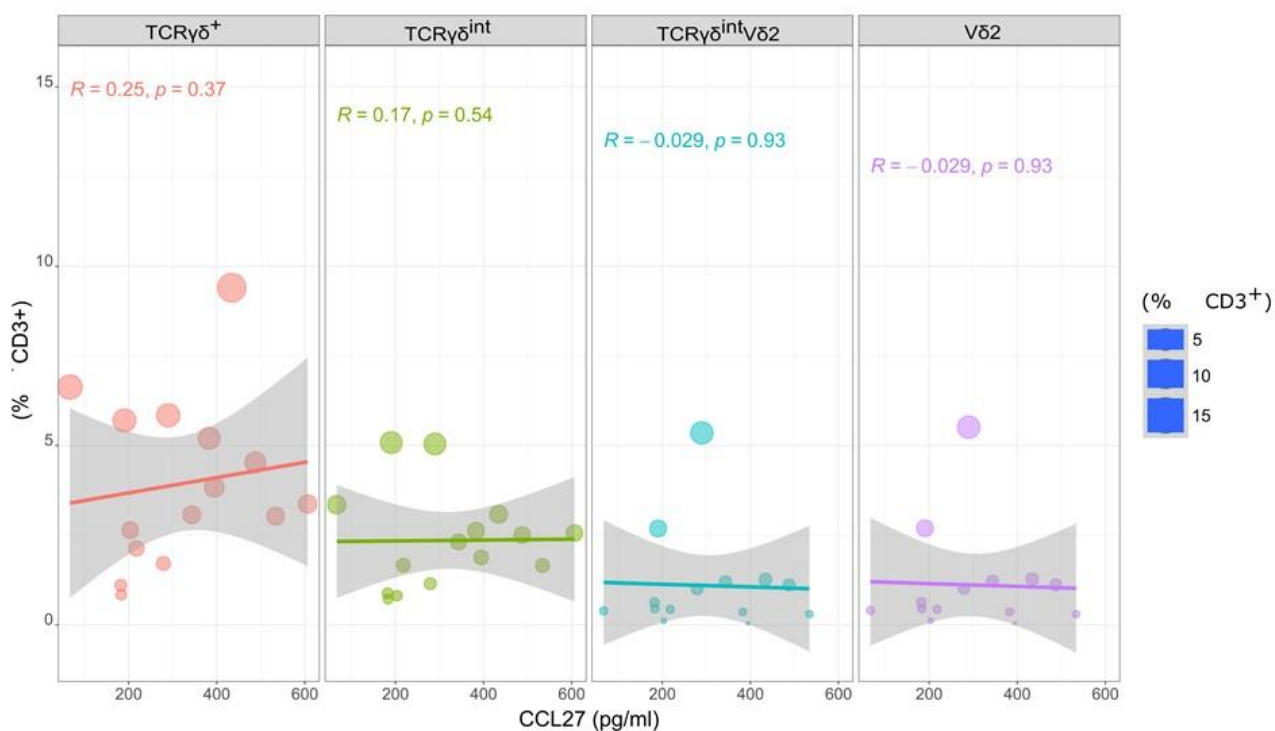


**Slika 5.6. Utjecaj serumskih razina CCL27 kemokina na zastupljenost  $CD3^+\gamma\delta TCR^+$  staničnog odjeljka te TCR $\delta$  subpopulacija u perifernoj krvi ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze**

*Prikaz povezanosti serumskih vrijednosti CCL27 s promjenom udjela  $CD3^+\gamma\delta TCR^+$ ,  $CD3^+\gamma\delta TCR^{int}$ ,  $CD3^+\gamma\delta TCR^{int}V\delta 2^+$  te  $V\delta 2^+$  stanica u perifernoj krvi ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze (PV). R predstavlja Spearmanov koeficijent korelacije. Veličina točke odražava postotak stanica koje izražavaju izražene/eksprimirane stanične biljege, dok boja kodira identitet tipa stanice unutar grupe. Zasjenjena regija pokazuje 95% interval pouzdanosti. Linija unutar zasjenjene regije predstavlja linearni regresijski pravac. TCR - T stanični receptor (engl. T cell receptor); CCL27 - kemokinski ligand s C-C motivom (engl. C-C motif chemokine ligand) 27.*

Istovremeno, u skupini zdravih ispitanika (CTRL), periferni udjeli  $CD3^+\gamma\delta TCR^+$ ,  $CD3^+\gamma\delta TCR^{int}$ ,  $CD3^+\gamma\delta TCR^{int}V\delta 2^+$  i  $V\delta 2^+$  stanica nisu bili vezani uz serumske promjene CCL27 (Slika 5.7.).

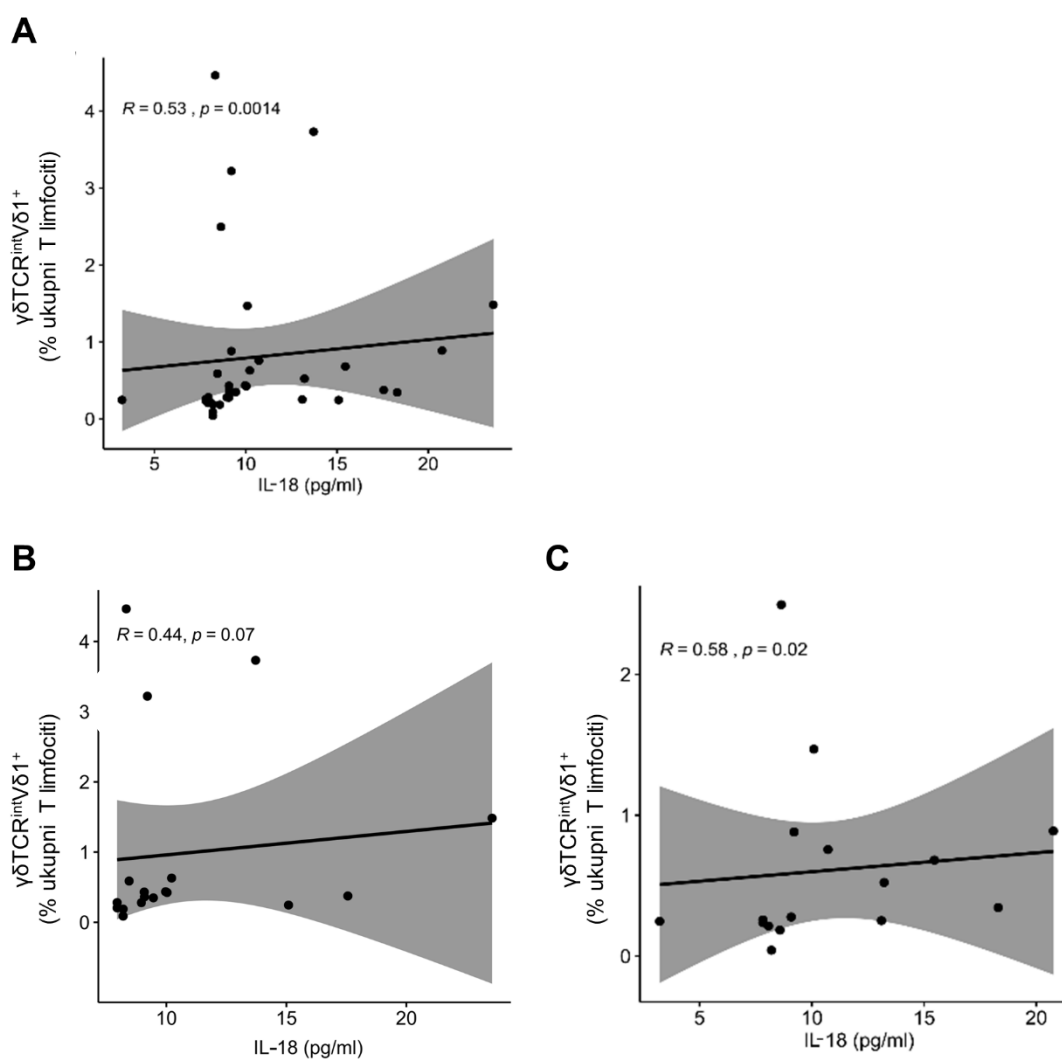




**Slika 5.7.** Utjecaj serumskih razina CCL27 kemokina na zastupljenost  $CD3^+\gamma\delta TCR^+$  staničnog odjeljka te  $TCR\delta$  subpopulacija u perifernoj krvi kontrolne skupine ispitanika

Prikaz povezanosti serumskih vrijednosti CCL27 s promjenom udjela  $CD3^+\gamma\delta TCR^+$ ,  $CD3^+\gamma\delta TCR^{int}$ ,  $CD3^+\gamma\delta TCR^{int}V\delta 2^+$  te  $V\delta 2^+$  stanica u perifernoj krvi kontrolne skupine ispitanika (CTRL).  $R$  predstavlja Spearmanov koeficijent korelacije. Veličina točke odražava postotak stanica koje izražavaju izražene/eksprimirane stanične biljege, dok boja kodira identitet tipa stanice unutar grupe. Zasjenjena regija pokazuje 95 % interval pouzdanosti. Linija unutar zasjenjene regije predstavlja linearni regresijski pravac. TCR - T stanični receptor (engl. T cell receptor).

S druge strane, periferni udjeli  $CD3^+\gamma\delta TCR^{int}V\delta 1^+$  stanica pozitivno su korelirali sa serumskim razinama IL-18, neovisno o case-control statusu ispitanika (Slika 5.8. A). Sličan trend povezanosti zabilježen je također i u samostalnom uzorku oboljelih (Slika 5.8. B), odnosno zdravih, kontrolnih ispitanika (Slika 5.8. C).



**Slika 5.8. Utjecaj serumskih vrijednosti IL-18 na udjele cirkulirajućih  $\text{CD}3^+\gamma\delta\text{TCR}^{\text{int}}\text{V}\delta 1^+$  limfocita T stanica**

Prikaz utjecaja serumskih razina IL-18 na udio  $\text{CD}3^+\gamma\delta\text{TCR}^{\text{int}}\text{V}\delta 1^+$  stanica u perifernoj krvi **A**) združenog uzorka (PV i CTRL skupine ispitanika), **B**) oboljelih od vulgarne psorijaze (PV), **C**) zdravih kontrolnih ispitanika (CTRL).  $R$  predstavlja Spearmanov koeficijent korelacije. Crna linije predstavlja linearni regresijski pravac. Zasjenjena regija pokazuje 95 % interval pouzdanosti. TCR - T stanični receptor (engl. T cell receptor).

Navedeni rezultati pokazuju da serumske razine citokina i kemokina specifično oblikuju periferne udjele  $\text{CD}3^+\gamma\delta\text{TCR}^{\text{int}}$  i  $\text{CD}3^+\gamma\delta\text{TCR}^{\text{high}}$  subpopulacija, pri čemu su CCL27 ovisni mehanizmi primjetni kod oboljelih, ali ne i kod zdravih ispitanika.

5.5 Utjecaj psorijaze na promjene udjela različitih perifernih  $\gamma\delta$  T subpopulacija

Nakon analize koja je potvrdila učinke različitih bioloških čimbenika u pozadini kvantitativnih i kvalitativnih promjena perifernih  $\gamma\delta$  T stanica, potencijalne promjene vezane uz psorijazu, testirane su usporedbom oboljelih i zdravih ispitanika usklađenih po spolu, dobi, BMI i CMV statusu.

Najprije je provedena usporedba relativnih udjela  $CD3^+\gamma\delta TCR^{high}$  i  $CD3^+\gamma\delta TCR^{int}$  stanica zdravih i oboljelih ispitanika. Rezultati su prikazani u Tablici 5.8., a značajne razlike nisu zabilježene.

**Tablica 5.8. Periferni udjeli  $CD3^+TCR\gamma\delta^+$  T limfocita u skupini ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze i kontrolnoj skupini ispitanika**

	PV	CTRL	Mann-Whitney P
<b>N (M/Ž omjer)</b>	<b>21 (14/7)</b>	<b>22 (16/6)</b>	<b>0.75 **</b>
<b><math>CD3^+TCR\gamma\delta^{high}</math></b>			
% $CD3^+$	0.76 (0.42-1.74)	0.78 (0.32-1.97)	0.761
% $CD3^+TCR\gamma\delta^+$	28.1 (15.5-46.2)	23 (12.4-46.4)	0.671
<b><math>CD3^+TCR\gamma\delta^{int}</math></b>			
% $CD3^+$	2.27 (0.98-4.68)	2.53 (1.53-5.1)	0.536
% $CD3^+TCR\gamma\delta^+$	71.9 (53.8-84.3)	77 (53.6-87.6)	0.671

PV- skupina ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze; CTRL – skupina kontrolnih, po dobi i spolu uparenih ispitanika; N – broj ispitanika; M – muški ispitanici; Ž – ženski ispitanici.

Podaci su prikazani kao medijani s interkvartilnim rasponom (IQR), razlike između skupina testirane su Mann-Whitney U-testom ili, a  $p < 0,05$  se smatralo statistički značajnim.

U nastavku, analizom numeričkih profila cirkulirajućih  $CD3^+\gamma\delta TCR^{high}V\delta 2^+$  i  $CD3^+\gamma\delta TCR^{int}V\delta 1^-\delta 2^-$  stanica, primijećen je njihov koordinirani porast u krvi oboljelih od PV [Spearmanov koeficijent  $\rho$  (PV) = 0,52,  $p = 0,04$ ,  $N = 16$ ]. Štoviše, u usporedbi s muškarcima kontrolne skupine,  $CD3^+\gamma\delta TCR^{high}V\delta 2^+$  subpopulacija bila je značajno „proširena“ unutar  $\gamma\delta$  T staničnog odjeljka muških oboljelih ispitanika (Tablica 5.9.). Zabilježena se razlika, međutim, nije zadržala na razini usporedbe ukupne populacije zdravih i oboljelih ispitanika (Tablica 5.10.) Broj ženskih ispitanika bio je, nažalost, nedovoljan za jednako značajnu usporedbu.

**Tablica 5.9. Zastupljenost V $\delta$ 1<sup>+</sup>, V $\delta$ 2<sup>+</sup> i V $\delta$ 1<sup>-</sup>V $\delta$ 2<sup>-</sup> subpopulacija limfocita u populacijama perifernih  $\gamma\delta$ TCR<sup>high</sup> i  $\gamma\delta$ TCR<sup>int</sup> T stanica kod muških ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze i kontrolne skupine muških ispitanika**

% CD3 <sup>+</sup> TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> limfocita			
N (M)	PV (%)	CTRL (%)	Mann-Whitney P
	14	14	
<b>CD3<sup>+</sup>TCR<math>\gamma\delta</math><sup>high</sup></b>			
V $\delta$ 1 <sup>+</sup> V $\delta$ 2 <sup>-</sup>	26,6 (10,5-29,4)	24,1 (9,4-34,5)	0,872
V $\delta$ 1 <sup>-</sup> V $\delta$ 2 <sup>+</sup>	0,25 (0,09-0,68)	0,08 (0-0,23)	0,04
V $\delta$ 1 <sup>-</sup> V $\delta$ 2 <sup>-</sup>	3,4 (1,6-5,6)	3,5 (1,5-7,3)	1
<b>CD3<sup>+</sup>TCR<math>\gamma\delta</math><sup>int</sup></b>			
V $\delta$ 1 <sup>+</sup> V $\delta$ 2 <sup>-</sup>	16,8 (5,9-32,8)	13,2 (8,9-34,7)	0,836
V $\delta$ 1 <sup>-</sup> V $\delta$ 2 <sup>+</sup>	18,5 (9-35,6)	29 (14,5-54,3)	0,346
V $\delta$ 1 <sup>-</sup> V $\delta$ 2 <sup>-</sup>	21,1 (15,3-30,5)	15 (8,5-22,4)	0,069

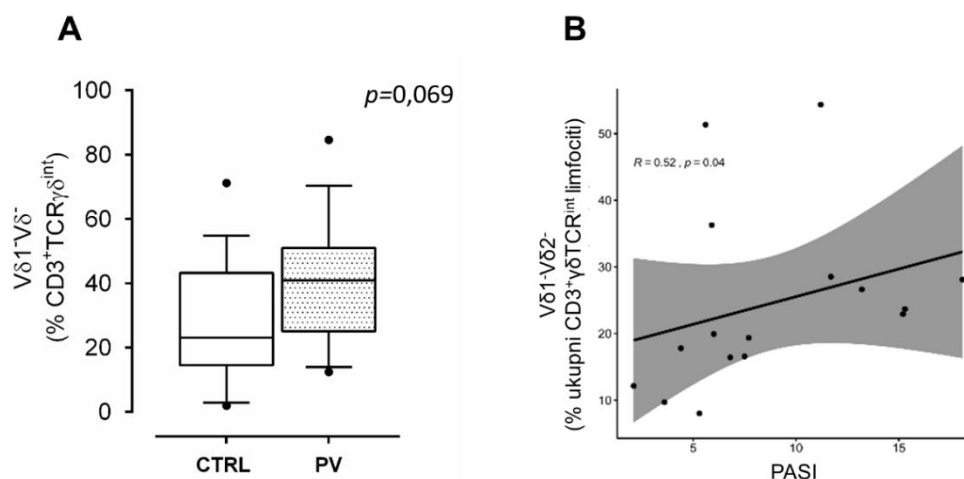
PV- skupina ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze; CTRL – skupina kontrolnih, po dobu i spolu uparenih ispitanika; N – broj ispitanika.  
Podaci su prikazani kao medijani s interkvartilnim rasponom (IQR), razlike između skupina testirane su Mann-Whitney U-testom ili, a p<0,05 se smatralo statistički značajno.

**Tablica 5.10. Zastupljenost V $\delta$ 1<sup>+</sup>, V $\delta$ 2<sup>+</sup> i V $\delta$ 1<sup>-</sup>V $\delta$ 2<sup>-</sup> subpopulacija limfocita u populacijama perifernih  $\gamma\delta$ TCR<sup>high</sup> i  $\gamma\delta$ TCR<sup>int</sup> T stanica kod oboljelih od vulgarne psorijaze i kontrolne skupine ispitanika**

%CD3 <sup>+</sup> TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> limfocita			
N (M/Ž)	PV (%)	CTRL (%)	Mann-Whitney P
	16 (14/2)	18 (14/4)	
<b>CD3<sup>+</sup>TCR<math>\gamma\delta</math><sup>high</sup></b>			
V $\delta$ 1 <sup>+</sup> V $\delta$ 2 <sup>-</sup>	27 (13,3-30)	22,8 (9,4-34,5)	0,5
V $\delta$ 1 <sup>-</sup> V $\delta$ 2 <sup>+</sup>	0,24 (0,09-0,56)	0,09 (0-0,35)	0,104
V $\delta$ 1 <sup>-</sup> V $\delta$ 2 <sup>-</sup>	3,6 (1,8-6,7)	4,1 (1,6-7,3)	0,93
<b>CD3<sup>+</sup>TCR<math>\gamma\delta</math><sup>int</sup></b>			
V $\delta$ 1 <sup>+</sup> V $\delta$ 2 <sup>-</sup>	17,3 (6,3-31,6)	13,1 (9-30,7)	0,77
V $\delta$ 1 <sup>-</sup> V $\delta$ 2 <sup>+</sup>	16,6 (8-34,6)	29 (11,2-52)	0,221
V $\delta$ 1 <sup>-</sup> V $\delta$ 2 <sup>-</sup>	21,4 (16,5-28,4)	16,9 (8,5-24,9)	0,116

PV- skupina ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze; CTRL – skupina kontrolnih, po dobu i spolu uparenih ispitanika; N – broj ispitanika; M – muški ispitanici; Ž – ženski ispitanici.  
Podaci su prikazani kao medijani s interkvartilnim rasponom (IQR), razlike između skupina testirane su Mann-Whitney U-testom ili, a p<0,05 se smatralo statistički značajno.

Uz porast perifernih udjela  $CD3^+\gamma\delta TCR^{high}V\delta 2^+$  stanica kod muških oboljelih ispitanika, na razini ukupne populacije oboljelih od PV, zabilježeno je i neznatno povećanje  $CD3^+\gamma V\delta 1^-\delta 2^-\gamma\delta TCR^{int}$  subpopulacije (Slika 5.9. A), najvjerojatnije kao odraz pozitivne korelacije uočene između brojnosti  $CD3^+\gamma V\delta 1^-\delta 2^-\gamma\delta TCR^{int}$  stanica i razvoja teže kliničke slike u oboljelih (Slika 5.9. B).



**Slika 5.9. Udio  $CD3^+\gamma V\delta 1^-\delta 2^-\gamma\delta TCR^{int}$  limfocita T u perifernoj krvi muških ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze i kontrolne skupine muških ispitanika te utjecaj težine bolesti na iste**

**A)** Pravokutnim/kutijastim ili „box – plot“ dijagramom prikazane su frekvencije  $CD3^+\gamma V\delta 1^-\delta 2^-\gamma\delta TCR^{int}$  limfocita T u perifernoj krvi PV i CTRL skupine ispitanika muškog spola dobivene metodom protočne citometrije. Rezultati su prikazani medijanima s interkvartilnim rasponom (IQR). Medijan predstavlja horizontalnu liniju unutar svakog „box – plota“. Interkvartilni rasponi (IQR) IQR3i IQR1, označeni su gornjom i donjom linijom „box – plota“, a  $1.5 \times IQR$  predstavljen je vertikalnim linijama. Ekstremne vrijednosti prikazane su crnim točkama. Razlike između skupina određene su primjenom Mann-Whitney testa; \* Prag značajnosti definiran je kao dvostrani  $p < 0,05$ ;  $N(PV)=14$  i  $N(CTRL)=14$  ispitanika. **B)** Prikaz utjecaja PASI vrijednosti na udjele subpopulacija  $CD3^+\gamma V\delta 1^-\delta 2^-\gamma\delta TCR^{int}$  staničnog odjeljka u perifernoj krvi muških PV ispitanika R predstavlja Spearmanov koeficijent korelacije. Crna linije predstavlja linearni regresijski pravac. Zasjenjena regija pokazuje 95% interval pouzdanosti. TCR - T stanični receptor (engl. T cell receptor); PV- skupina ispitanika oboljela od vulgarne psorijaz; CTRL- kontrolna skupina ispitanika; PASI - indeks zahvaćenosti kože i težine kliničke slike (Psoriasis Area Severity Index).

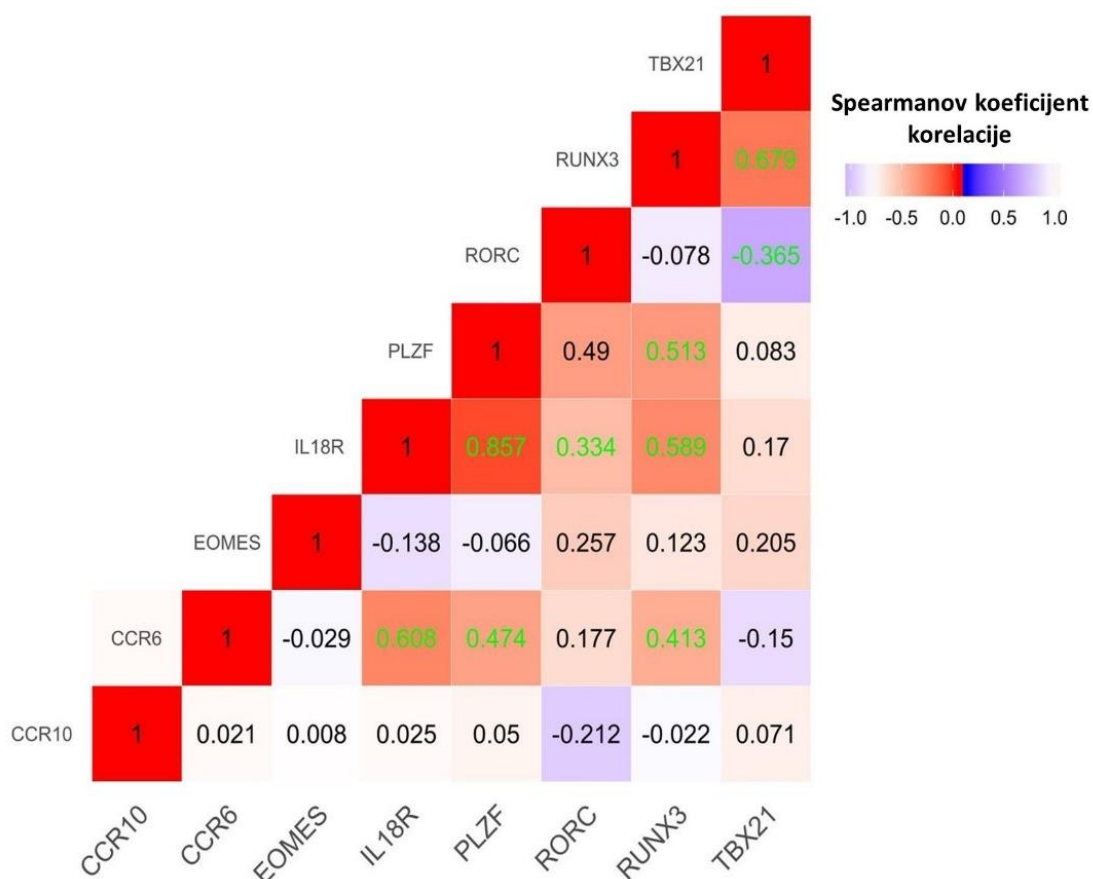
Važno je napomenuti da se vrijednosti dobi ( $p = 1$ ), BMI ( $p = 0,74$ ) i CMV IgG titra nisu značajno razlikovale između muških kontrola i oboljelih ispitanika [median (IQR): 141 (76 - 217) vs 123 (0 - 153) AU / ml , CTRL (n = 14) vs PV (n = 10),  $p = 0,177$ ]. Značajne razlike u udjelu drugih subpopulacija  $\gamma\delta$  staničnog odjeljka između oboljelih i zdravih ispitanika nisu zabilježene.

#### 5.6 Utjecaj promjene staničnih udjela $\gamma\delta$ T subpopulacija na transkripcijski profil sortiranih $\gamma\delta$ T stanica u oboljelih i zdravih ispitanika

U svrhu jasnijeg uvida u mehanizam promjena u pozadini bioloških značajki krvnih  $\gamma\delta$  T stanica u psorijazi, istražili smo transkripcijske profile sortiranih  $\gamma\delta$  T populacija, preciznije izražaj gena u kontroli razvoja urođenih imunskih obilježja (*ZBTB16*, *RUNX3*, *IL18R*), upalnog odgovora tipa 17 (*CCR6*, *RORC*), i tipa 1 te citotoksičnog (*RUNX3*, *TBX21*, *EOMES*) i migracijskog kapaciteta (*CCR6*, *CCR10*).

Usporednom analizom ekspresijskih obrazaca uočeno je da izražaj gena *IL18R* i *ZBTB16* slijedi sličan obrazac (Slika 5.10 i Slika 5.11.) te da su njihovi izražajni profili u  $\gamma\delta$  T stanicama oboljelih od PV, u usporedbi s profilima  $\gamma\delta$  T limfocita zdravih kontrola, koordinirano smanjeni (Slika 5.12.). Uz *IL18R* i *ZBTB16*,  $\gamma\delta$  T stanice oboljelih od PV, imale su i značajno smanjene udjele *RUNX3* transkripata (Slika 5.13.).

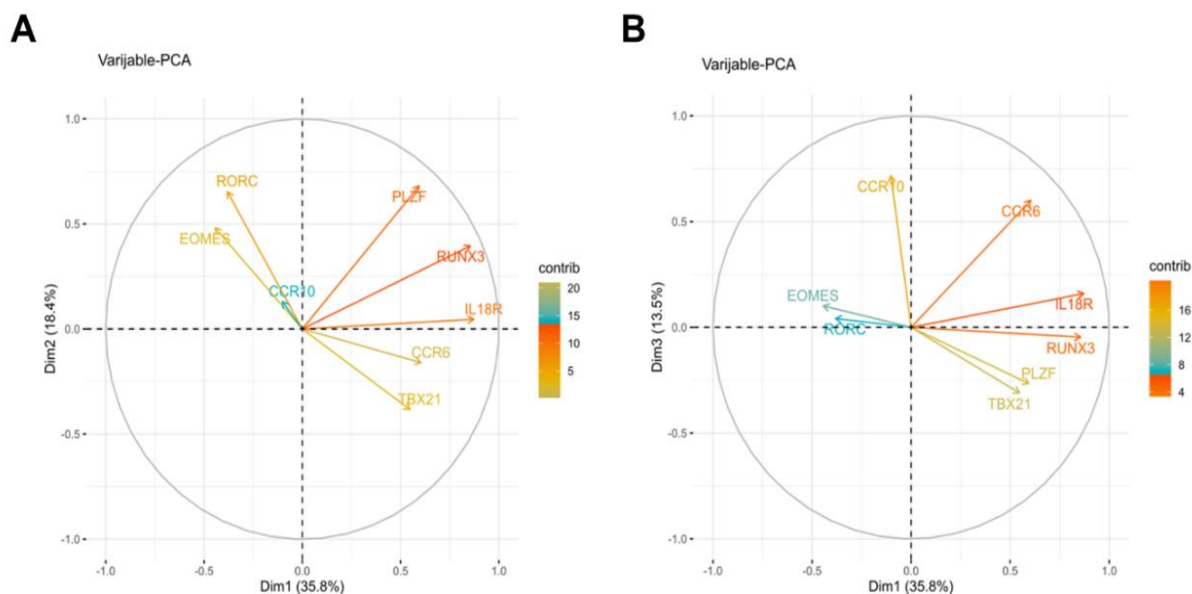
Smanjena ekspresija gena *IL18R*, *ZBTB16* i *RUNX3* pozitivno korelira s izražajnim profilima gena *CCR6*, *RORC* i *TBX21*, a između *RORC* i *TBX21* zabilježeni su inverzni korelacijski obrasci (Slika 5.10. i Slika 5.11.). Analizom izražajnih profila drugih gena, značajne razlike nisu zabilježene (Slika 5.13.).



**Slika 5.10. Međugenski korelacijski obrasci zabilježeni u sortiranim  $\gamma\delta$  T stanicama zdravih ispitanika**

Analiza genske ekspresije učinjena je s pomoću RT-qPCR metode. Prikaz međugenskih korelacijskih obrazaca prikazan je toplinskom kartom (Spearmanov koeficijent korelacije, CTRL). Statistički značajne korelacije (dvostrani  $P < 0,05$ ) označene su zelenom bojom. Sve RT-qPCR reakcije učinjene su s pomoću Applied Biosystems QuantStudio 5 i analizirane primjenom QuantStudio Design & Analysis Software v 1.5.1.

CTRL- kontrolna skupina ispitanika; CCR- kemokinski receptor s C-C motivom (engl. C-C motif chemokine receptor); EOMES - od engl. Eomesodermin; IL (interleukin) 18; PLZF - od engl. promyelocytic leukemia zinc finger; RORC - od engl. retinoic-acid-receptor--related Orphan Receptor C; RUNX3 - od engl. runt-related transcription factor 3; T-bet - od engl. T-box expressed in T cells koji se naziva još TBX21- od engl. T-box transcription factor.

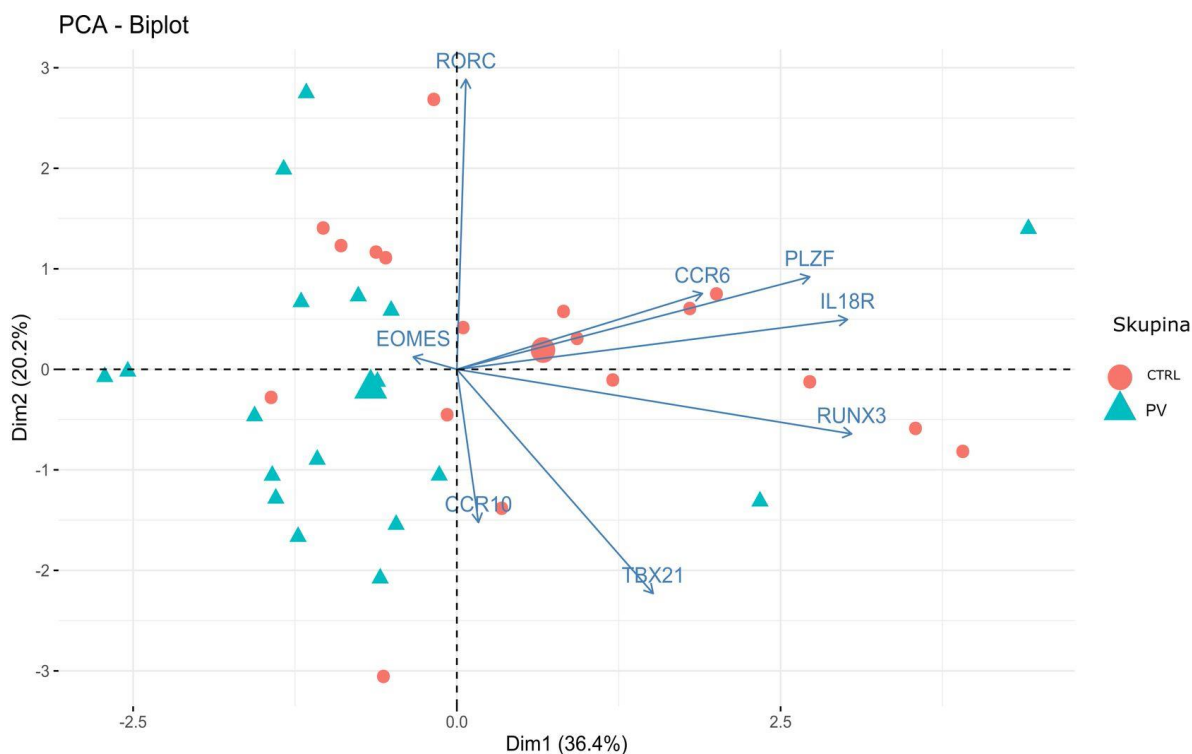


**Slika 5.11. Transkripcijski profil  $\gamma\delta$  T staničnog odjeljka u perifernoj krvi ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze i kontrolne skupine ispitanika**

Vektorski prikaz analize glavnih komponenti (PCA, od engl. *Principal Component Analysis*;) izražaj ispitivanih gena u združenom uzorku ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze (PV) i kontrolne skupine/skupine zdravih ispitanika (CTRL). Transkripcijski profili gena koji pozitivno koreliraju usmjereni su na istu stranu grafikona.

CCR- kemokinski receptor s C-C motivom (engl. *C-C motif chemokine receptor*); EOMES - od engl. *Eomesodermin*; IL (interleukin) 18; PLZF - od engl. *promyelocytic leukemia zinc finger*; RORC - od engl. *retinoic-acid-receptor--related Orphan Receptor C*; RUNX3 - od engl. *runt-related transcription factor 3*; T-bet - od engl. *T-box expressed in T cells* koji se naziva još TBX21- od engl. *T-box transcription factor*.

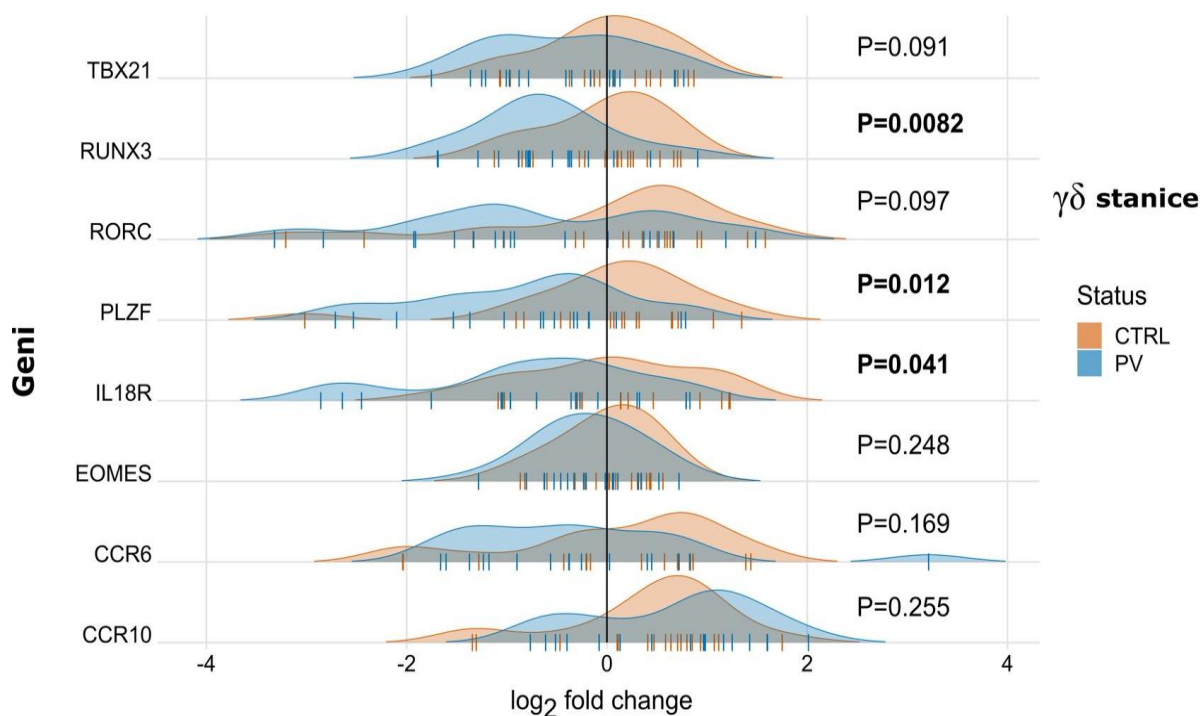




**Slika 5.12.** Usporedni prikaz razlike među skupinama i korelacijskih odnosa genske ekspresije u sortiranim  $\gamma\delta$  T stanicama ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze i kontrolne skupine ispitanika

Vektorski prikaz analize glavnih komponenti (PCA, od engl. *Principal Component Analysis*;) izražaja ispitivanih gena kod ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze (PV) i kontrolne skupine/skupine zdravih ispitanika (CTRL). Transkripcijski profili gena koji pozitivno koreliraju usmjereni su na istu stranu grafikona. Rezultat prikazuje stupanj diskriminacije između usporednih skupina. Crvena točka predstavlja pojedinca kontrolne skupine ispitanika, dok zeleni pravokutnik predstavlja pojedinca oboljelog od vulgarne psorijaze (PV).

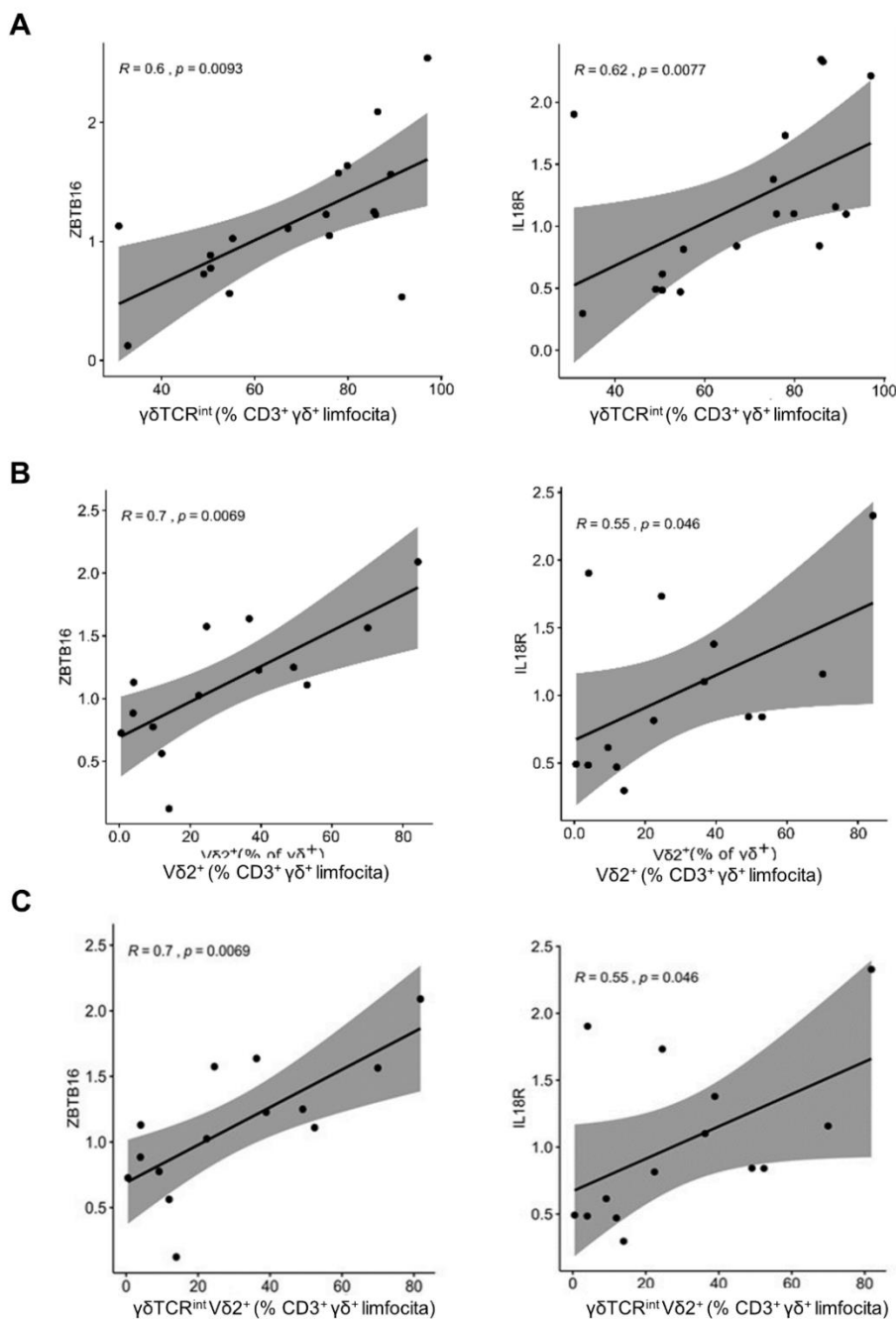
CCR- kemokinski receptor s C-C motivom (engl. *C-C motif chemokine receptor*); EOMES - od engl. *Eomesodermin*; IL (interleukin) 18; PLZF - od engl. *promyelocytic leukemia zinc finger*; RORC - od engl. *retinoic-acid-receptor--related Orphan Receptor C*; RUNX3 - od engl. *runt-related transcription factor 3*; T-bet - od engl. *T-box expressed in T cells* koji se naziva još TBX21- od engl. *T-box transcription factor*.



**Slika 5.13. Usporedba razlike u ekspresiji ispitivanih gena sortiranih  $\gamma\delta$  T stanica ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze i kontrolne skupine ispitanika**

Vizualizacija izražaja gena  $\gamma\delta$  T staničnog odjeljka ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze (PV) i zdravih ispitanika (CTRL) primjenom „Ridgeline“ grafičkog prikaza. Uz diferencijalno izražene prijepise ( $P < 0,05$ , dvostrani Mann-Whitneyev test), P vrijednosti su podebljane. Svaki "|" oblik točke predstavlja rezultat mjerenja u jednom ispitaniku. Sve RT-qPCR reakcije učinjene su s pomoću Applied Biosystems QuantStudio 5 i analizirane primjenom QuantStudio Design & Analysis Software v 1.5.1. CCR- kemokinski receptor s C-C motivom (engl. C-C motif chemokine receptor); EOMES - od engl. Eomesodermin; IL (interleukin) 18; PLZF - od engl. promyelocytic leukemia zinc finger; RORC - od engl. retinoic-acid-receptor-related Orphan Receptor C; RUNX3 - od engl. runt-related transcription factor 3; T-bet - od engl. T-box expressed in T cells koji se naziva još TBX21- od engl. T-box transcription factor.

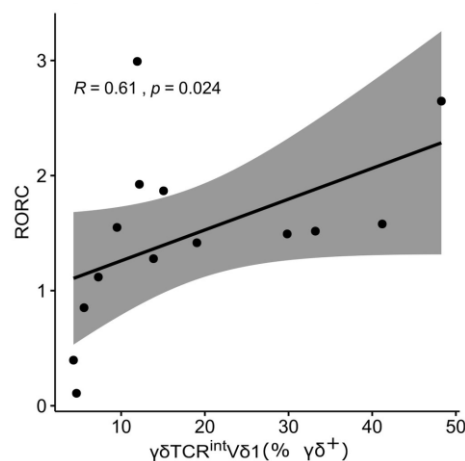
S obzirom na heterogeni sastav perifernog  $\gamma\delta$  T staničnog odjeljka, koji se kako je opisano u poglavlju 5.4., različito oblikuje pod utjecajem istovjetnih bioloških čimbenika, bilo je za očekivati da će različiti udjeli sortiranih  $\gamma\delta$  T subpopulacija, modulirati izražaj ispitivanih gena. Sukladno očekivanjima, na uzorku zdravih ispitanika, ekspresija gena *ZBTB16* i *IL18R*, pozitivno je korelirala s perifernim udjelima  $CD3^+\gamma\delta TCR^{int}$  (Slika 5.14. A) populacije, posebice s frekvencijom perifernih  $V\delta^+$  (Slika 5.14. B) i  $\gamma\delta TCR^{int} V\delta^+$  (Slika 5.14. C) stanica.



**Slika 5.14. Povezanost promjene relativnih udjela perifernih  $\gamma\delta$  T subpopulacija s razinom ekspresije gena *ZBTB16* i *IL18R* u sortiranim  $\gamma\delta$  T stanicama zdravih ispitanika**

*Prikaz povezanosti promjene perifernih udjela  $CD3^+\gamma\delta TCR^{int}$ ,  $V\delta 2^+$  i  $CD3^+\gamma\delta TCR^{int} V\delta 2^+$  i subpopulacija s promjenom ekspresije gena *ZBTB16* i *IL18R* u sortiranim  $\gamma\delta$  T stanicama zdravih ispitanika. *R* predstavlja Spearmanov koeficijent korelacije. Crna linija predstavlja linearni regresijski pravac. Zasjenjena regija pokazuje 95% interval pouzdanosti *ZBTB16* – od engl. Zinc finger and BTB domain-containing protein 16 iliti PLZF; *IL*(interleukin) 18; TCR - T stanični receptor (engl. T cell receptor).*

Za razliku od gena *ZBTB16* i *IL18R* čiji je broj prijepisa rastao s porastom  $CD3^+\gamma\delta TCR^{int}$ ,  $CD3^+\gamma\delta TCR^{int} V\delta 2^+$  i  $V\delta 2^+$  populacija, ekspresija gena *RORC* koordinirano se povećavala s relativnim udjelom  $CD3^+\gamma\delta TCR^{int} V\delta 1^+$  podskupine stanica (Slika 5.15.), što ukazuje na potencijalno različite uloge ovih transkripcijskih čimbenika (engl. *transcriptional factors*, TFs) u oblikovanju različitih  $\gamma\delta$  T staničnih odjeljaka.



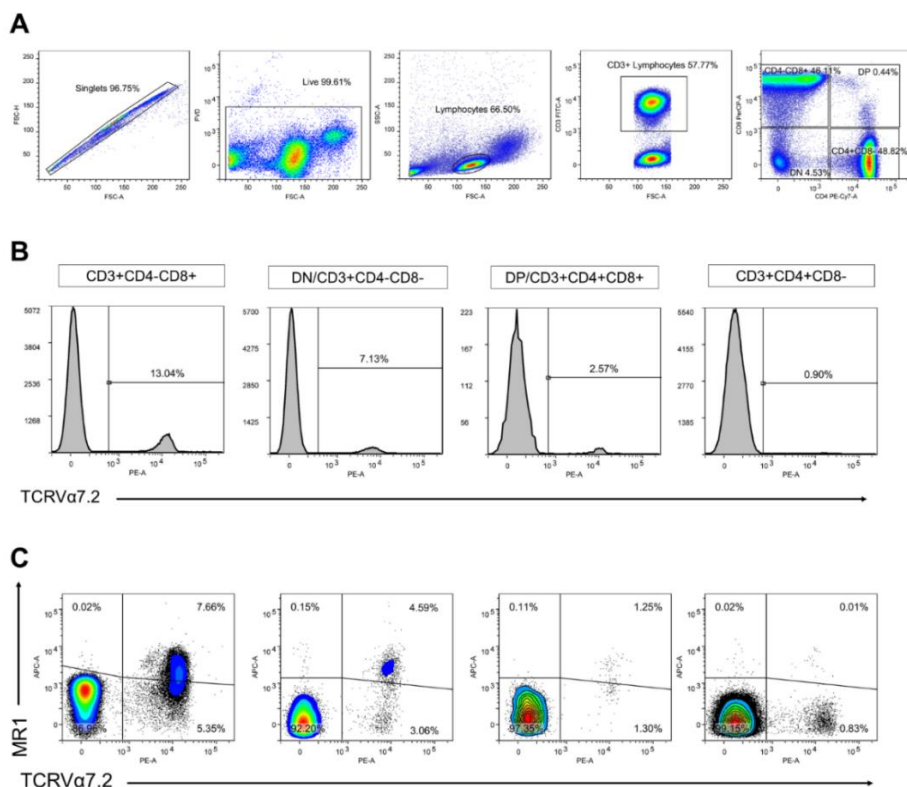
**Slika 5.15. Povezanost promjene relativnih udjela  $CD3^+\gamma\delta TCR^{int}V\delta 1^+$  stanica s razinom ekspresije gena *RORC* u sortiranim  $\gamma\delta$  T stanicama zdravih ispitanika**

*Prikaz povezanosti promjene perifernih udjela  $CD3^+\gamma\delta TCR^{int}V\delta 1$  staničnog odjeljaka s promjenom ekspresije gena *RORC* u sortiranim  $\gamma\delta$  T stanicama zdravih ispitanika. *R* predstavlja Spearmanov koeficijent korelacije. Crna linija predstavlja linearni regresijski pravac. Zasjenjena regija pokazuje 95% interval pouzdanosti. TCR - T stanični receptor (engl. *T cell receptor*); *RORC* - od engl. *retinoic-acid-receptor--related Orphan Receptor C*.*

Zaključno, prikazani rezultati ukazuju na značajne promjene koje se u PV događaju već u ranim razvojnim stadijima, a vezane su uz reorganizaciju brojčanih udjela i transkriptoma perifernih  $\gamma\delta$  T subpopulacija.

### 5.7 Veličina odjeljaka $CD4^+$ i DP MAIT stanica u perifernoj krvi muških ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze

Heterogenost citoma, prethodno zabilježena kod  $\gamma\delta$  T stanica, uočena je i unutar MAIT staničnog odjeljaka.



**Slika 5.16. Reprezentativni primjer analize MAIT stanica iz periferne krvi ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze i kontrolne skupine ispitanika metodom protočne citometrije.**

*Prikaz strategije susljednog otvaranja prozora te postavljanja gate-ova s ciljem izdvajanja MAIT stanica. A) Jednostruke stanice (tzv. singlets) izdvojene su analizom FSC-A i FSC-H parametara. Među singlet stanicama, žive su izdvojene s pomoću bojenja FVD, a limfociti su identificirani na temelju veličine i granuliranosti (forward scatter area (FSC-A) i side scatter area (SSC-A)). Periferne linije limfocita T definirane kao CD3<sup>+</sup> stanice, razdvojene su na temelju površinske ekspresije CD4 i CD8 staničnih biljega i podijeljene u četiri osnovna razreda CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, DP ili DN. B) i C) koja su nadalje analizirana s obzirom na ekspresiju MR1-teramera i TCRVa7.2 receptora. FVD – fiksabilna boja za vijabilnost (od engl. fixable viability dye); DP - dvostruko pozitivni; DN - dvostruko negativni; PE-Cy7 - od engl. phycoerythrin coupled with cyanine dye (Cy7) označeno protutijelo usmjereno na CD4; PerCP - od engl. peridinin chlorophyll protein označeno protutijelo usmjereno na CD8; TCR - T stanični receptor (engl. T cell receptor); PE - fluorescentnim proteinom porijeklom iz crvenih algi (engl. phycoerythrin) označeno protutijelo usmjereno na TCRVa7.2; APC - fluorescentnim proteinom porijeklom iz crvenih algi (engl. allophycocyanin) označeno protutijelo usmjereno na MR1. Sve analize provedene su na protočnom citometru BD FACS Canto II i analizirane primjenom Flow Logic programa.*

U namjeri da se precizno identificiraju sve MAIT subpopulacije, imunofenotipizacija protočnom citometrijom učinjena je nakon obilježavanja stanica s MR1-5-OP-RU tetramerom u kombinaciji s CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> i TCRV $\alpha$ 7.2 monoklonalnim protutijelima. Na osnovi dobivenih rezultata imunofenotipizacije, identificirana su četiri osnovna razreda MAIT stanica (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, DP ili DN) (Slika 5.16. A i B) koji su nadalje analizirani s obzirom na ekspresiju MR1-teramera i TCRV $\alpha$ 7.2 receptora, slijedom čega su unutar svakog razreda identificirane sljedeće podvrste: MR1-5-OP-RU-tet<sup>+</sup>TCRV $\alpha$ 7.2<sup>+</sup>(MAIT) stanice, MR1- tet<sup>+</sup>TCRV $\alpha$ 7.2<sup>-</sup> (atipične MR1-reaktivne T stanice) (208), MR1<sup>-</sup>tet-TCRV $\alpha$ 7.2<sup>+</sup> i MR1-tet<sup>-</sup>TCRV $\alpha$ 7.2<sup>-</sup>stanice. Zabilježeni udjeli kanonskih MR1-tet<sup>+</sup>TCRV $\alpha$ 7.2<sup>+</sup> i atipičnih MR1-tet<sup>+</sup>TCRV $\alpha$ 7.2<sup>-</sup> podvrsta unutar svakog razreda prikazani su u Tablici 5.11.

**Tablica 5.11. Zastupljenost kanonskih i atipičnih perifernih T stanica spregnutih s MR1 u perifernoj krvi ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze i kontroloj skupini ispitanika**

N (M/Ž)	PV (%)	CTRL (%)	Mann-Whitney P
	<b>21 (14/7)</b>	<b>22 (16/6)</b>	<b>0.75 **</b>
<b>CD3<sup>+</sup>MR1-tet<sup>+</sup>TCRV<math>\alpha</math>7.2<sup>+</sup></b>			
<b>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup></b>	0.14 (0.04-0.28)	0.13 (0.08-0.38)	0.636
<b>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup></b>	1.6 (0.9-2.5)	2.1 (1.2-3.6)	0.22
<b>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup></b>	0.03 (0.009-0.05)	0.04 (0.02-0.08)	0.106
<b>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup></b>	0.01 (0.006-0.026)	0.02 (0.006-0.13)	0.17
<b>Svi</b>	1.8 (1.1-3.1)	2.3 (1.3-4.2)	0.185
<b>CD3<sup>+</sup>MR1-tet<sup>+</sup>TCRV<math>\alpha</math>7.2<sup>-</sup></b>			
<b>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup></b>	0.003 (0.0007-0.0084)	0.005 (0.003-0.011)	0.091
<b>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup></b>	0.025 (0.013-0.034)	0.026 (0.015-0.059)	0.504
<b>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup></b>	0.0022 (0.001-0.0042)	0.0014(0.0006-0.0028)	0.324
<b>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup></b>	0.024 (0.014-0.034)	0.023 (0.01-0.038)	0.706
<b>Svi</b>	0.06 (0.04-0.084)	0.06 (0.034-0.12)	0.504

PV - skupina ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze; CTRL – skupina kontrolnih, po dobi i spolu uparenih ispitanika; N – broj ispitanika; M – muški ispitanici; Ž – ženski ispitanici.

Podaci su prikazani kao medijani s interkvartilnim rasponom (IQR), razlike između skupina testirane su Mann-Whitney U-testom ili, a p<0,05 se smatralo statistički značajno.

Cirkulirajuće MR1<sup>-</sup>tet<sup>+</sup>TCRV $\alpha$ 7.2<sup>+</sup> T stanice zdravih ispitanika najčešće su izražavale CD8<sup>+</sup> ili DN koreceptorski profil, dok je samo manjina pripadala skupini DP ili CD4<sup>+</sup> MAIT stanica (Slika 5.16. C i Tablica 5.11.). U odnosu na ženske ispitanice, muški ispitanici imali su značajno smanjeni udio MR1-tet<sup>+</sup>TCRV $\alpha$ 7.2<sup>+</sup> stanica unutar CD8<sup>+</sup> frakcije perifernih MAIT stanica (Tablica 5.12.), što se podudara s prethodnim izvješćima o višim udjelima MAIT stanica kod žena u odnosu na muškarce jednake dobi (154).

**Tablica 5.12. Udio MR1-tet<sup>+</sup>TCRV $\alpha$ 7.2<sup>+</sup> stanica unutar CD8<sup>+</sup> frakcije perifernih MAIT stanica nakon raspodjele po spolu u združenom uzorku ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze i kontrolne skupine ispitanika**

N	PV (%) + CTRL (%)		Mann-Whitney P
	M (30)	Ž (13)	
	<b>CD3<sup>+</sup>MR1-tet<sup>+</sup>TCRV<math>\alpha</math>7.2<sup>+</sup></b>		
	4,3 (2,6 - 6)	6,4 (3,5 - 12)	0.049

PV - skupina ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze; CTRL – skupina kontrolnih, po dobi i spolu uparenih ispitanika; N – broj ispitanika; M – muški ispitanici; Ž – ženski ispitanici.

Podaci su prikazani kao medijani s interkvartilnim rasponom (IQR), razlike između skupina testirane su Mann-Whitney U-testom, a  $p < 0,05$  se smatralo statistički značajno.

Analizom relativnih udjela MAIT stanica kod zdravih i oboljelih ispitanika, značajne razlike nisu zabilježene (podaci nisu prikazani). Međutim, u odnosu na zdrave muške ispitanike, kod oboljelih osoba muškog spola, uočeno je značajno smanjenje frekvencije CD4<sup>+</sup> MR1-tet<sup>+</sup>TCRV $\alpha$ 7.2<sup>+</sup> i DP MR1-tet<sup>+</sup>TCRV $\alpha$ 7.2<sup>+</sup> (Tablica 5.13.) stanica unutar frakcije CD3<sup>+</sup> T limfocita.

Uz to, zabilježena je i inverzna korelacija između relativnih udjela DP MR1<sup>+</sup>TCRV $\alpha$ 7.2<sup>+</sup> i CD3<sup>+</sup> $\gamma$ V $\delta$ 1- $\delta$ 2<sup>-</sup>TCR limfocita [ $\rho$  (PV + CTRL) = - 0,39,  $p = 0,024$ , N = 34, PV + CTRL ], sugerirajući istodobnu promjenu dviju različitih prirodnih populacija vezanih uz PV.

Usporednom analizom preostalih staničnih MAIT podvrsta u ukupnom ili po spolu stratificiranom uzorku (muški ispitanici) oboljelih i zdravih ispitanika, značajna razlika nije zabilježena.

**Tablica 5.13. Promjene relativnih udjela MR1- tet<sup>+</sup>TCRV $\alpha$ 7.2<sup>+</sup> stanica u perifernoj krvi muških ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze i kontrolne skupine muških ispitanika**

N (M)	PV (%)	CTRL (%)	Mann-Whitney P
	14	16	
<b>CD3<sup>+</sup>MR1-tet<sup>+</sup>TCRV<math>\alpha</math>7.2<sup>+</sup></b>			
<b>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup></b>	0,007 (0,005-0,025)	0,034 (0,012-0,135)	0.017
<b>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup></b>	0,015 (0,008-0,032)	0,038 (0,022- 0,096)	0.032

PV - skupina ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze; CTRL – skupina kontrolnih, po dobi i spolu uparenih ispitanika; N – broj ispitanika; M – muški ispitanici.

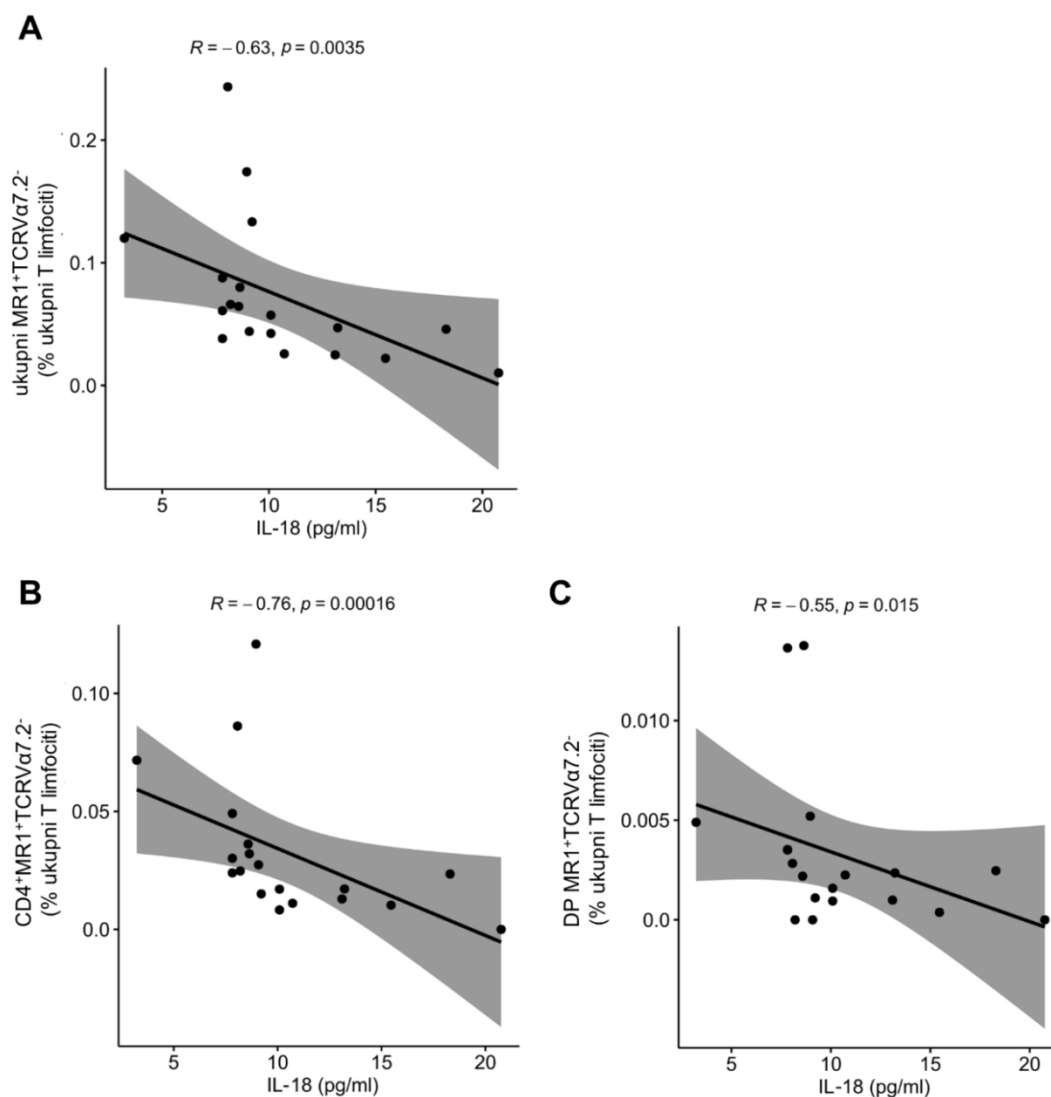
Podaci su prikazani kao medijani s interkvartilnim rasponom (IQR), razlike između skupina testirane su Mann-Whitney U-testom, a  $p < 0,05$  se smatralo statistički značajno.

#### 5.8 Udio atipičnih MR1-spregnutih MAIT stanica u perifernoj krvi ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze

U sljedećem koraku, učinjena je analiza perifernih udjela atipičnih MR1-spregnutih MAIT stanica koje ne izražavaju klasičnu varijantu TCR  $\alpha$ -lanca, pa su slijedom navedenog nazvane atipičnim ili MR1-tet<sup>+</sup>TCRV $\alpha$ 7.2<sup>-</sup> stanicama. Sukladno ranijim izvještajima vezanim uz ljudsku populaciju atipičnih MR1-spregnutih MAIT stanica (150), većina cirkulirajućih MR1-tet<sup>+</sup>TCRV $\alpha$ 7.2<sup>-</sup> T stanica u našim uzorcima zdravih kontrola (Tablica 5.11.) bile su CD8<sup>+</sup> ili CD4<sup>+</sup> koreceptorskog statusa, a samo je manjina izražavala DN ili DP profil.

Značajna razlika u relativnom udjelu atipičnih MAIT stanica između oboljelih i zdravih ispitanika nije zabilježena. Međutim, periferne frekvencije atipičnog CD3<sup>+</sup> MR1- tet<sup>+</sup>TCRV $\alpha$ 7.2<sup>-</sup> odjeljka kod oboljelih ispitanika značajno su se smanjivale s porastom serumske razine IL-18 (Slika 5.17. A), pri čemu su CD4<sup>+</sup> (Slika 5.17. B) i DP (Slika 5.17. C) podskupine atipičnih MR1-tet<sup>+</sup>TCRV $\alpha$ 7.2<sup>-</sup> T linija bile najvećim dijelom odgovorne za primijećeni učinak. Povezanost promjene relativnih udjela atipičnih MAIT linija s dobi, spolom, CMV ili BMI statusom, međutim nije zabilježena (podaci nisu prikazani).





**Slika 5.17.** Utjecaj serumskih vrijednosti IL-18 na promjenu udjela atipičnih MR1-spregnutih Va7.2<sup>+</sup> T stanica u perifernoj krvi ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze

*Prikaz utjecaja serumskih razina IL-18 na udjele atipičnih MR1-spregnutih Va7.2<sup>+</sup> T stanicama u perifernoj krvi oboljelih od vulgarne psorijaze A) unutar CD3<sup>+</sup>, B) CD4<sup>+</sup> i C) DP staničnog odjeljka. R predstavlja Spearmanov koeficijent korelacije. Crna linije predstavlja linearni regresijski pravac. Zasjenjena regija pokazuje 95% interval pouzdanosti. TCR - T stanični receptor (engl. T cell receptor); IL(interleukin) 18; MR1 - molekula povezana s MHC I (engl. Major Histocompatibility Complex I-related gene protein).*

## 5.9 Transkripcijski profil cirkulirajućih MR1-tet<sup>+</sup>TCRV $\alpha$ 7.2<sup>+</sup> MAIT stanica u oboljelih od vulgarne psorijaze

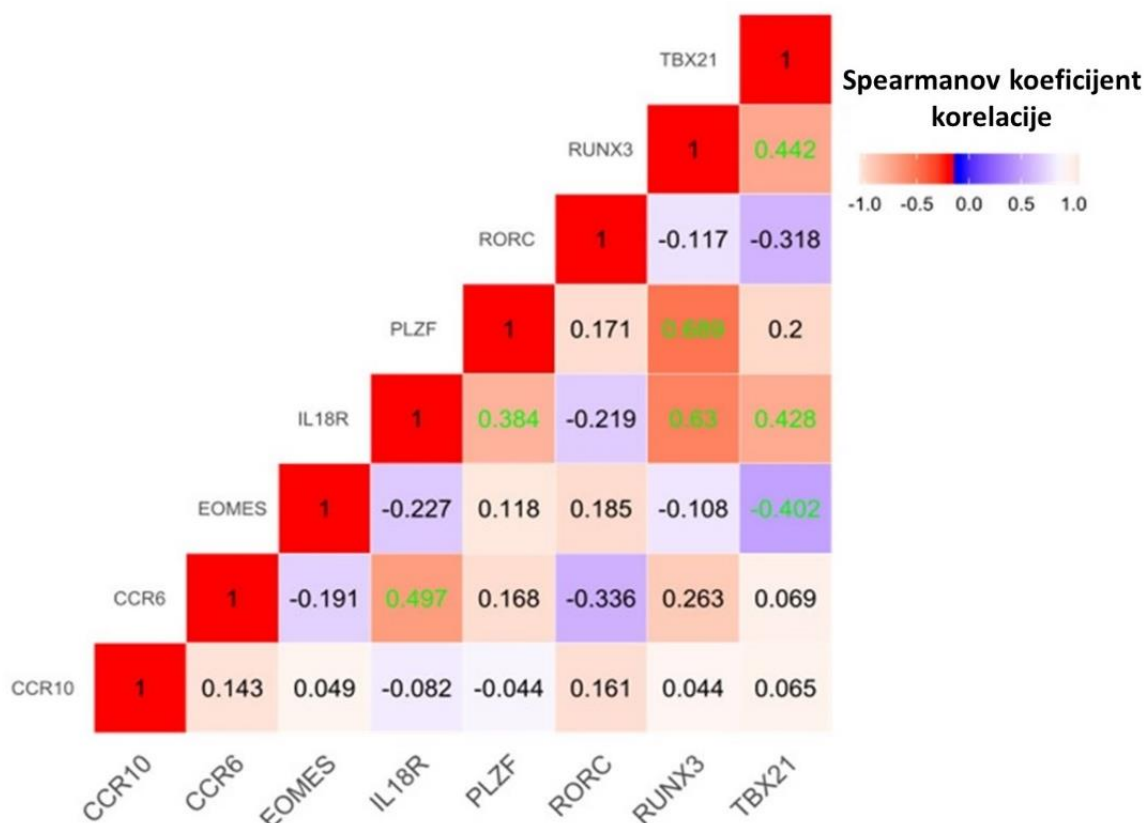
Za analizu transkripcijskog profila MAIT stanica, odabrani su uzorci RNA izolirani iz sortiranih, klasičnih CD3<sup>+</sup>MR1-tet<sup>+</sup>TCRV $\alpha$ 7.2<sup>+</sup> MAIT limfocita. S obzirom na razvojne i funkcionalne sličnosti MAIT i  $\gamma\delta$  T stanica (207), istražili smo iste ciljane gene *ex vivo* primjenom RT-qPCR metode (Slika 5.18.). Nalik na međugenske korelacijske obrasce zabilježene kod  $\gamma\delta$  T stanica, ekspresija gena vezanih uz razvoj prirođenih obilježja (*ZBTB16*, *RUNX3*, *IL18R*) pozitivno je korelirala s ekspresijom gena *TBX21* i *CCR6* (Slika 5.18. i Slika 5.19.)

Među diferencijalno izraženim genima (Slika 5.20), bili su transkripti čiji produkti sudjeluju u kontroli tip 17 imunskog odgovora (*RORC*, *CCR6*), udomljavanju MAIT stanica u upalnim tkivima (*CCR6*), razvoju memorijskog fenotipa i citotoksičnog kapaciteta (*EOMES*). Sukladno nabrojanom, u usporedbi s transkripcijskim profilom MAIT stanica zdravih kontrola, MAIT stanice oboljelih od vulgarne psorijaze imale su značajno povećanu ekspresiju gena *RORC*, uz značajno snižene udjele *EOMES* transkripata, ukazujući na međusobno isključive regulacijske učinke koji se uspostavljaju između ova dva transkripcijska čimbenika prilikom diferencijacije Tc17 limfocita i T stanica čija je aktivacija vezana uz prepoznavanje specifičnih metabolita bakterijske sinteze riboflavina (209, 210)

Zanimljivo, ekspresija *CCR6* kemokinskog receptora, koji kontrolira izlazak prirođenih T limfocitnih linija iz timusa i usmjerava ih ka tkivima, bila je snižena u MAIT stanicama oboljelih od PV. Važnost ovog nalaza, kao i ulogu smanjene genske ekspresije *CCR6* u MR1-spregnutim MAIT stanicama kod PV oboljelih, tek treba razjasniti.

Značajne korelacije između transkripcijskih profila ispitivanih gena te dobi, spola, BMI ili CMV statusa, razine serumskih citokina i kemokina, PASI skale ili perifernih udjela CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> MAIT subpopulacija nisu zabilježene.

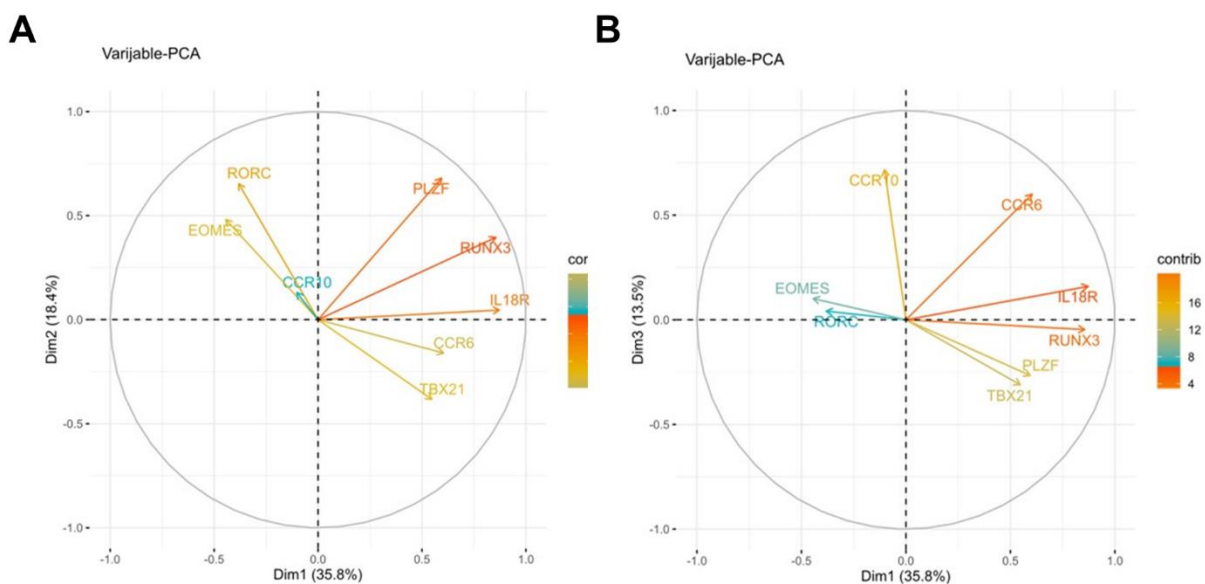
Zabilježeni podaci na razini transkriptoma perifernih prirođenih linija, ukazuju na značajne promjene koje se u ranim stadijima bolesti razvijaju paralelno, ali na način koji se bitno razlikuje između  $\gamma\delta$  i MAIT staničnih populacija.



**Slika 5.18.** Međugenski korelacijski obrasci zabilježeni u sortiranim MAIT stanicama zdravih ispitanika

Analiza genske ekspresije učinjena je s pomoću RT-qPCR metode. Prikaz međugenskih korelacijskih obrazaca prikazan je toplinskom kartom (Spearmanov koeficijent korelacije, CTRL). Statistički značajne korelacije (dvostrani  $P < 0,05$ ) označene su zelenom bojom. Sve RT-qPCR reakcije učinjene su s pomoću Applied Biosystems QuantStudio 5 i analizirane primjenom QuantStudio Design & Analysis Software v 1.5.1.

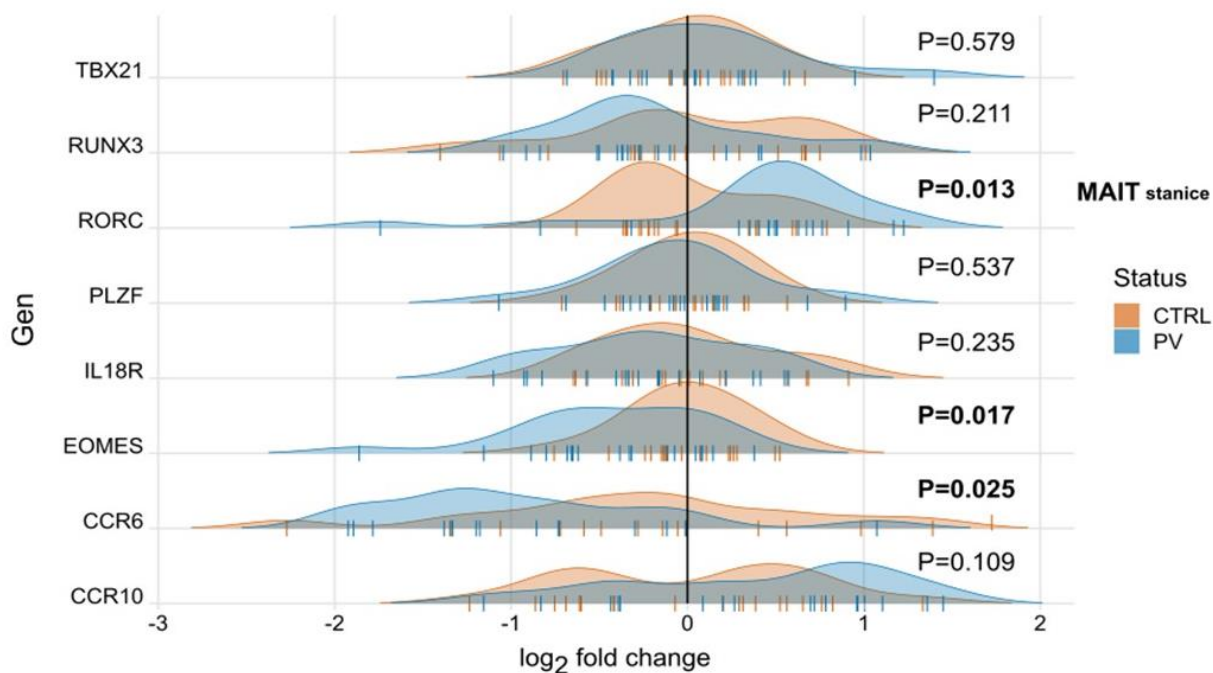
CTRL- kontrolna skupina ispitanika; CCR- kemokinski receptor s C-C motivom (engl. C-C motif chemokine receptor); EOMES - od engl. Eomesodermin; IL (interleukin) 18; PLZF - od engl. promyelocytic leukemia zinc finger; RORC - od engl. retinoic-acid-receptor--related Orphan Receptor C; RUNX3 - od engl. runt-related transcription factor 3; T-bet - od engl. T-box expressed in T cells koji se naziva još TBX21- od engl. T-box transcription factor.



**Slika 5.19. Transkripcijski profil MAIT staničnog odjeljka u perifernoj krvi ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze i kontrolne skupine ispitanika**

Vektorski prikaz analize glavnih komponenti (PCA, od engl. *Principal Component Analysis*;) izražaj ispitivanih gena u združenom uzorku ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze (PV) i kontrolne skupine/skupinezdravih ispitanika (CTRL). Transkripcijski profili gena koji pozitivno koreliraju usmjereni su na istu stranu grafikona.

CCR- kemokinski receptor s C-C motivom (engl. *C-C motif chemokine receptor*); EOMES - od engl. *Eomesodermin*; IL (interleukin) 18; PLZF - od engl. *promyelocytic leukemia zinc finger*; RORC - od engl. *retinoic-acid-receptor--related Orphan Receptor C*; RUNX3 - od engl. *runt-related transcription factor 3*; T-bet - od engl. *T-box expressed in T cells* koji se naziva još TBX21- od engl. *T-box transcription factor*.



**Slika 5.20. Usporedba razlike u ekspresiji ispitivanih gena sortiranih MAIT stanica ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze i kontrolne skupine ispitanika**

Vizualizacija izražaja gena MAIT staničnog odjeljka ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze (PV) i zdravih ispitanika (CTRL) primjenom „Ridgeline“ grafičkog prikaza. Uz diferencijalno izražene prijepise ( $P < 0,05$ , dvostrani Mann-Whitneyev test),  $P$  vrijednosti su podebljane. Svaki „|“ oblik točke predstavlja rezultat mjerenja u jednom ispitaniku. Sve RT-qPCR reakcije učinjene su s pomoću Applied Biosystems QuantStudio 5 i analizirane primjenom QuantStudio Design & Analysis Software v 1.5.1.

CCR- kemokinski receptor s C-C motivom (engl. C-C motif chemokine receptor); EOMES - od engl. Eomesodermin; IL (interleukin) 18; PLZF - od engl. promyelocytic leukemia zinc finger; RORC - od engl. retinoic-acid-receptor--related Orphan Receptor C; RUNX3 - od engl. runt-related transcription factor 3; T-bet - od engl. T-box expressed in T cells koji se naziva još TBX21- od engl. T-box transcription factor.

## 6 RASPRAVA

Unatoč brojnim studijama na animalnim modelima, specifični udjeli i migracijski obrasci humanih  $\gamma\delta$  T limfocita i MR1<sup>+</sup> populacija, kao i povezanost promjene njihovih frekvencija s težinom i obilježjima vulgarne psorijaze još uvijek su nedovoljno razjašnjeni. Jednako tako u potpunosti je nepoznato kako promjene linijski specifičnih transkripcijskih čimbenika i površinskih receptora MAIT i  $\gamma\delta$  T stanica utječu na inicijaciju i progresiju oboljenja.

U okviru ove doktorske disertacije prikazani su periferni udjeli, fenotipska raznolikost i transkripcijski profili površinskih receptora i transkripcijskih čimbenika u kontroli razvoja i funkcije  $\gamma\delta$  i MR1-spregnutih T stanica, koji se već, kod terapijski naivnih, blago do srednje teško oboljelih pacijenata od psorijaze značajno razlikuju u odnosu na zdrave ispitanike. Uočeni su i značajni učinci dobi, BMI statusa te prethodne izloženosti CMV infekciji, koji uz psorijazu, značajno oblikuju periferni sastav i udio pojedinih subpopulacija  $\gamma\delta$  T i MAIT stanica.

Dobiveni rezultati ukazuju na važnost interpretacije kvantitativnih i kvalitativnih promjena različitih, cirkulirajućih MAIT i  $\gamma\delta$  T limfocita unutar kliničkog konteksta, uzimajući u obzir niz egzogenih i endogenih čimbenika koji moduliraju njihov sastav u perifernoj krvi. Jedino na taj način moguće je na adekvatan, nepristran način protumačiti zabilježene razlike između oboljelih i zdravih ispitanika te procijeniti ulogu MAIT i  $\gamma\delta$  T limfocita u nastanku i razvoju imunološki posredovanih bolesti, u ovom slučaju psorijaze.

### 6.1 Osvrt na odabir ispitanika te usklađenost ispitivanih skupina s obzirom na demografske, kliničko-antropometrijske i biokemijske karakteristike

Detaljna anamneza te upitnik, kojeg su svi ispitanici ispunili, omogućili su adekvatan probir ispitanika prema prethodno navedenim uključnim i isključnim kriterijima. Analiza demografskih, kliničko-antropometrijskih i biokemijskih obilježja oboljelih od PV i CTRL ispitanika potvrdila je usklađenost skupina prema dobi, spolu, BMI statusu i vrijednostima izmjerenih laboratorijskih parametara (hsCRP, SE, KKS, jetrenih i bubrežnih parametara). Također, usporedbom biljega akutne infekcije ili ranijeg kontakta s HBV, HCV i CMV virusima, i bakterijom *M. tuberculosis*, statistički značajnih razlika između PV i CTRL ispitanika nije bilo. Iz navedenog, vidljiva je koherentnost između uspoređenih skupina čime je isključen poznati, potencijalno zbunjujući utjecaj spola, dobi, BMI, te virusnih i bakterijskih infekcija na pojavu i interpretaciju razlika zabilježenih između PV i CTRL skupine.

## 6.2 Utjecaj spola, CMV statusa i PV statusa ispitanika na udjele cirkulirajućih CD3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> i CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> limfocita T

Promatrajući CD3<sup>+</sup> limfocite samo na osnovi izraženosti glikoproteina CD4 i CD8, kod oboljelih od PV zabilježen je povećan broj perifernih CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> limocita T, dok je udio CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> stanica bio snižen u odnosu na zdrave kontrole. Udio CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> limfocita T također je bio povećan u PV ispitanika muškog spola, dok je u združenom uzorku (PV + CTRL) porast CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> udjela zabilježen u CMV seropozitivnih osoba.

Do sada su učinjena brojna istraživanja uloge T limfocita u psorijazi. Slijedom navedenog, Langewouters i suradnici proučavali su povezanost težine PV s perifernim udjelima i sastavom T limfocitnih populacija i NKT stanica (211). Uočili su statistički značajno povećanje obje T limfocitne populacije, posebice porast udjela CD4<sup>+</sup> stanica kod osoba sa srednje teškim do teškim oblikom psorijaze (PASI ≥ 12), uz nepromijenjen omjer relativnih udjela CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> limfocita (211). Povećan udio CD4<sup>+</sup> limfocita bio je međutim praćen, statistički nepotvrđenim, smanjenjem CD8<sup>+</sup> limfocita kod osoba s blagim oblikom bolesti (211), što je nalik numeričkoj dinamici CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> stanica koja je zabilježena u našoj populaciji ispitanika s blagim oblikom oboljenja (PASI Me: 7.7 (5.5-12.5)). U odnosu na istraživanje Langewouters i suradnika (211), u studiji predmetne doktorske disertacije, skupine PV i CTRL ispitanika bile su nešto veće i stoga potencijalno kadre zabilježiti ne samo značajne razlike u frekvenciji perifernih CD4<sup>+</sup>, već i CD8<sup>+</sup> T stanica. Pri interpretaciji rezultata treba, također, uzeti u obzir i utjecaj spola na sastav perifernog T staničnog odjeljka, koji je kod zdravih osoba ženskog spola obogaćen udjelom CD4<sup>+</sup> T stanica, a kod zdravih muškaraca udjelom CD8<sup>+</sup> limfocita (212). U tom kontekstu, s obzirom na predominaciju muških ispitanika u našim dobno i spolno usklađenim PV i CTRL skupinama, zabilježeno povećanje CD4<sup>+</sup> i smanjenje CD8<sup>+</sup> razreda naglašava ulogu PV u oblikovanju perifernih T limfocitnih populacija. Primjenom višeparametrijske protočne citometrije Kagami i suradnici također su u PV oboljelih zabilježili povećane numeričke vrijednosti CD4<sup>+</sup> stanica koje izražavaju specifični površinski CCR6<sup>+</sup>IL-23R<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup> i unutarstanični citokinski IL17A<sup>+</sup>IL-22<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> profil (118). Sukladno ranijim nalazima, smanjenje perifernih udjela CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> u našim PV ispitanicima potencijalno odražava njihovo povećano udomljavanje u koži (121, 211, 212), iako i drugi biološki čimbenici poput virusnih infekcija (215) mogu utjecati na njihove periferne udjele, kako je demonstrirano na združenom uzorku (PV + CTRL) CMV seropozitivnih osoba koje, u odnosu na CMV seronegativne ispitanike, posjeduju povećane udjele CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T limfocita.

### 6.3 Citokinska i kemokinska „mreža“

Analizirajući serumske razine citokina, kemokina i kemokinskih liganada (IL-17A / F, IL-23, IL-18, CCL20 i CCL27) kod ispitanika s blagim oblikom bolesti i zdravih kontrola, značajne razlike među skupinama nisu zabilježene, što potvrđuje slabu vezu između ispitivanih serumskih citokina i promjena na koži, što je u skladu s rezultatima drugih studija, čak i u uzorku ispitanika s težim oblicima vulgarne psorijaze (216 – 219).

### 6.4 Relativni udjeli, fenotipska raznolikost i čimbenici koji oblikuju odjeljak $\gamma\delta$ T stanica u krvi oboljelih od vulgarne psorijaze

$\gamma\delta$  T limfociti čine glavninu IL-17<sup>+</sup> imunskih populacija koje naseljavaju dermalne slojeve lezijske kože (200). Te se dermalne populacije održavaju lokalnom proliferacijom (220), primaju „upute“ od prekursorskih stanica u cirkulaciji (221) i imaju sposobnost migracije koja im omogućava sudjelovanje u upalnim procesima na udaljenim mjestima (222). Cjeloviti repertoar  $\gamma\delta$  T stanica ljudske kože i krvi još uvijek nije utvrđen. Nedavno je, međutim, u ljudskim  $\gamma\delta$  T krvnim populacijama uočeno nekoliko različitih  $\gamma\delta$  T zajednica, koje se mogu razlikovati temeljem  $\gamma\delta$ TCR i CD3 površinske ekspresije ( $\gamma\delta^{\text{int}}$  i  $\gamma\delta^{\text{hi}}$ ), vrste  $\delta$ -lanca T staničnog receptora (V $\delta$ 2<sup>+</sup> i V $\delta$ 2<sup>-</sup>), proizvodnji upalnih citokina (Th1-nalik, Th17-nalik) i transkripcijskom profilu (PLZF<sup>hi</sup> vs PLZF<sup>lo</sup>GATA3<sup>+</sup>T-bet<sup>lo</sup>) (172). Međutim, uloga navedenih heterogenih  $\gamma\delta$  subpopulacija u razvoju PV nerazjašnjena je.

Analizom  $\gamma\delta$ TCR i CD3 površinskih biljega, najprije su jasno definirane najmanje dvije  $\gamma\delta$  T subpopulacije; veća frakcija CD3<sup>+</sup> $\gamma\delta$ TCR<sup>int</sup> stanica s umjerenim izražajem  $\gamma\delta$ TCR molekula te manji udio CD3<sup>+</sup> $\gamma\delta$ TCR<sup>hi</sup> limfocitnih vrsta s visokom površinskom ekspresijom  $\gamma\delta$ TCR. S obzirom na izbor  $\delta$  lanca, većina CD3<sup>+</sup> $\gamma\delta$ TCR<sup>int</sup> stanica izražavala je V $\delta$ 2 lanac, a CD3<sup>+</sup> $\gamma\delta$ TCR<sup>hi</sup> stanice dominantno su koristile V $\delta$ 1. Zabilježena raspodjela  $\delta$  lanaca unutar različitih  $\gamma\delta$  T staničnih odjeljaka bila je velikim dijelom u skladu s istraživanjem Venkena i suradnika (172).

Analizom čimbenika koji potencijalno mogu utjecati na brojčane oscilacije i preraspodjelu  $\gamma\delta$  T subpopulacija u perifernoj krvi, uočena je značajna povezanost između perifernih udjela CD3<sup>+</sup> $\gamma\delta$ TCR<sup>hi</sup> stanica te CMV i BMI statusa. Sukladno navedenom, kod CMV seropozitivnih osoba, u odnosu na CMV seronegativne ispitanike, zabilježeno je povećanje CD3<sup>+</sup> $\gamma\delta$ TCR<sup>hi</sup> subpopulacije, čija se brojnost pak smanjivala porastom BMI vrijednosti. Važno



je naglasiti i rezultat koji uz,  $\delta 1^+$  subpopulacije, potvrđuje ulogu i  $\delta 1^- \delta 2^-$  T stanica u obrani od CMV infekcije. Iz navedenih rezultata vidljivo je da susret s CMV virusom predstavlja jedan od važnih čimbenika koji oblikuju numeričke udjele pojedinih limfocitnih subpopulacija uključujući i odjeljak  $\gamma\delta$  T stanica. Rezultati ovog istraživanja sukladni su rezultatima Kallemejin i suradnika (185) te Knight i suradnika (223) koji opisuju povećane udjele  $\delta 1^+$  te  $\delta 1^- \delta 2^-$  T stanica u CMV seropozitivnih osoba koje svojom životnom dobi podsjećaju na našu skupine ispitanika. U prilog antiviralne uloge  $\gamma\delta$  T staničnog odjeljka govori i studija koja opisuje oligoklonalnu ekspanziju  $V\gamma 9^- V\delta 1^+$ ,  $V\gamma 9^- V\delta 2^+$  i  $V\gamma 9^- V\delta 3^+$  stanica prilikom in uterine CMV infekcije fetusa (224). Zanimljivo, neonatalna CMV infekcija uzrokuje ekspanziju i  $V\gamma 8^+ V\delta 1^+$  stanica koje nisu detektirane izvan neonatalnog razdoblja (190).

Osim CMV infekcije, perifernim udjelima  $\gamma\delta$  T stanica upravljaju i sterilni upalni uvjeti koji se razvijaju kod pretilih osoba. U tom kontekstu, inverzna korelacija zabilježena između  $CD3^+ \gamma\delta TCR^{hi}$  stanica i BMI indeksa u skladu je s opisanom ulogom  $\gamma\delta$  T stanica u masnom tkivu (173). Izuzev utjecaja CMV statusa i BMI vrijednosti, zabilježen je i utjecaj akutnog upalnog opterećenja (vrijednosti hsCRP-a) koje su negativno korelirale s udjelom  $CD3^+ \gamma\delta TCR^{hi}$  stanica.

Nakon analize bioloških čimbenika koji utječu na preraspodjelu perifernih  $\gamma\delta$  T subpopulacija, analizirane su razlike u brojčanim udjelima  $\gamma\delta$  T stanica u odnosu na zdravi, odnosno oboljeli status ispitanika. Slijedom navedenog, u odnosu na zdrave kontrole, kod oboljelih od psorijaze zabilježen je povećan udio rijetkih cirkulirajućih,  $CD3^+ \gamma TCR^{hi} V\delta 2^-$  i  $CD3^+ \gamma V\delta 1^- \delta 2^- TCR^{int}$  T stanica. Važno je napomenuti da se skupine oboljelih i zdravih ispitanika nisu razlikovale u odnosu na ranije opisane čimbenike (dob, CMV i BMI status te spol), koji utječu na numeričku dinamiku  $\gamma\delta$  T stanica. Povećani udjeli  $CD3^+ \gamma V\delta 1^- \delta 2^- TCR^{int}$  u perifernoj krvi oboljelih pozitivno koreliraju s PASI vrijednostima i vjerojatno dijelom odražavaju promjene vezane uz progresiju psorijaze. Zanimljivo je napomenuti statistički značajnu razliku u serumskim vrijednostima hsCRP koja se pojavljuje usporedbom dijela populacije oboljelih i zdravih ispitanika. CRP je upalni biomarker čiju proizvodnju u hepatocitima potiče IL-6 (225), jedan od inicijalnih proupalnih citokina u psorijazi, koji također pozitivno korelira s PASI vrijednostima (226).

Zabilježene promjene frekvencijskih udjela  $CD3^+ \gamma\delta TCR^{hi} V\delta 2^-$  i  $CD3^+ \gamma\delta TCR^{int} V\delta 1^- \delta 2^-$  subpopulacija kod oboljelih nisu u skladu s istraživanjem Laggner i suradnika (196), koji su zabilježili smanjenje udjela  $V\gamma 9 V\delta 2^+$  stanica u perifernoj krvi osoba oboljelih od psorijaze. U njihovoj populaciji oboljelih, Laggner i suradnici primijetili su da

PASI vrijednosti inverzno koreliraju s frekvencijom  $V\gamma 9V\delta 2^+$  stanica u perifernoj krvi (196). Važno je, međutim, naglasiti da su u okviru studije Laggner i suradnikâ, bili obuhvaćeni terapijski obrađeni, stariji bolesnici s težom kliničkom slikom, bez podataka o CMV i BMI statusu, što otežava izravnu usporedbu rezultata. Guggino i suradnici, u krvi oboljelih od psorijatičnog artritisa bilježe pak ekspanziju perifernih  $\gamma\delta$  T stanica efekorskog memorijskog fenotipa koje izražavaju  $V\delta 2^+$  varijante T staničnog receptora (227). Smatra se da memorijske linije imunoloških stanica, konkretno  $\gamma\delta$  T stanica, sudjeluju u pojavi relapsa, odnosno povrata kožnih promjena na istim područjima nakon prestanka terapije (171). Razlike između rezultata pojedinih istraživanja, potencijalno se dijelom mogu objasniti razlikama u nezabilježenim varijacijama egzogenih i endogenih bioloških čimbenika koji zajedno s upalnim procesima vezanim uz bolest, upravljaju promjenama kvantitativnih udjela  $\gamma\delta$  T staničnog odjeljka. Varijabilnosti rezultata zasigurno pridonosi i izrazita heterogenost  $\gamma\delta$  T populacije, uključujući i  $V\gamma 9V\delta 2$  podvrstu, koju, sudeći po rezultatima RNA sekvenciranja pojedinačne stanice (engl. *single-cell RNA sequencing*, scRNA-seq), izgrađuje više transkripcijski i funkcijski različitih  $\gamma\delta 1$  i  $\gamma\delta 17$  stanica (228).

Naši rezultati također, ukazuju na potencijalno važnu ulogu, dosad neopisanih  $CD3^+\gamma V\delta 1^-\delta 2^-TCR^{int}$  T stanica u psorijazi, koje u ovom trenutku obuhvaćaju nedefinirani skup stanica, sastavljen od jedne ili više netestiranih vrsta  $\gamma\delta$  T staničnih linija. U tom kontekstu, važno je izdvojiti  $V\delta 3^+$  subpopulaciju, koja čini 0,2% cirkulirajućih  $\gamma\delta$  T stanica, i zajedno s  $V\delta 4^+$ ,  $V\delta 5^+$ ,  $V\delta 6^+$ ,  $V\delta 7^+$  i  $V\delta 8^+$  stanicama, potencijalno čini dio patogenog  $V\delta 1^-\delta 2^-$  odjeljka u psorijazi (171). Navedene stanice prepoznaju lipidne antigene u kompleksu s CD1d neklasičnim molekulama nalik MHC I varijantama prezentirajućih molekula te moduliraju imunološki odgovor oslobađajući Th1 (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), Th2 (IL-4, IL-10 ) i Th17 (IL-17) citokine ključne za nastanak i razvoj vulgarne psorijaze. Na ovaj način,  $V\delta 1^-\delta 2^-$  subpopulacije  $\gamma\delta$  T stanica pospješuju sazrijevanje DC (229) i potiču aktivaciju adaptivnih linija imunosti, a poznato je i da posreduju raznolike antivirusne i antitumorske učinke (230). Jasno razumijevanje najranijih promjena u  $\gamma\delta$  citomu u krvi oboljelih od psorijaze još uvijek nam, međutim, nedostaje i zahtijeva nastavak istraživanja heterogenih  $\gamma\delta$  T subpopulacija.

## 6.5 Relativni udjeli, fenotipska raznolikost i čimbenici koji oblikuju odjeljak MAIT stanica kod oboljelih od vulgarne psorijaze

Heterogeni fenotipski obrasci zabilježeni su i u populaciji MAIT stanica. U ukupnom ispitivanom uzorku zdravih ispitanika uočeni su očekivani frekvencijski udjeli MAIT subpopulacija; pa su tako CD8<sup>+</sup> i DN činili veće, a DP i CD4<sup>+</sup> manje numeričke frakcije perifernih MAIT linija (208).

Nakon preraspodjele svih ispitanika (PV+CTRL) u odnosu na spol, zabilježen je smanjeni udio perifernih CD8<sup>+</sup>MR1-tet<sup>+</sup>TCRV $\alpha$ 7.2<sup>+</sup> stanica kod osoba muškog spola, u usporedbi s ženskim ispitanicama iste dobi, što je u skladu s dosad zabilježenim spolno uvjetovanim numeričkim oscilacijama MAIT stanica (154).

Usporedbom zdravih i oboljelih ispitanika muškog spola, u perifernoj krvi oboljelih zabilježeno je značajno smanjenje rijetkih CD4<sup>+</sup>MR1-tet<sup>+</sup>TCRV $\alpha$ 7.2<sup>+</sup> i CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>MR1-tet<sup>+</sup>TCRV $\alpha$ 7.2<sup>+</sup> T stanica. Opisane razlike nisu uočene na razini ukupne populacije oboljelih i zdravih ispitanika, i nisu bile vezane uz promjene PASI vrijednosti. Humane MR1-spregnute  $\alpha\beta$  T stanice pokazuju funkcionalnu i kompozicijsku heterogenost (147,149,206) čime je imunološki odgovor podložan oblikovanju odnosno plastičnosti. U okviru ranijih studija MAIT su stanice istraživane u kontekstu psorijaze (163) i psorijatičnog artritisa (168), u uzorcima kože, odnosno sinovijalnoj tekućini, uz primjenu CD161 i IL-18R $\alpha$  surogat biljegâ koji relativno precizno odražavaju CD8<sup>+</sup> i DN MAIT populacije, ali su u potpunosti neprikladni za analize CD4<sup>+</sup> i DP MAIT vrsta (231). Slijedom navedenog, Tenuissen i suradnici pratili su promjene brojevanih udjela CD8<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>TCRV $\alpha$ 7.2<sup>+</sup> MAIT stanica u uzorcima kože oboljelih i zdravih ispitanika (163). Značajne razlike u brojnosti CD8<sup>+</sup> MAIT linija među skupinama nisu zabilježene (163), ali je točan broj, kao i stvarni doprinos ostalih MR1-spregnutih, tkivnih ili krvnih MAIT podskupina u PV ostao nerazjašnjen. S druge strane, kod oboljelih od psorijatičnog artritisa, tzv. bolesti unutar bolesti psorijaze, Raychaudhuri i suradnici bilježe smanjenu frekvenciju cirkulirajućih MAIT stanica, uz istovremeno povećanje frekvencije MAIT stanica u sinovijalnoj tekućini (168). Važno je napomenuti da se rezultati oba istraživanja temelje na imunofenotipizaciji MAIT stanica analizom površinske ekspresije TCRV $\alpha$ 7.2 zajedno s CD161 i IL-18R $\alpha$  surogat biljezima, koji neprecizno odražavaju udjele svih MAIT subpopulacija (231). Osim činjenice da se navedeni surogat biljezi pronalaze i na drugim T stanicama, njihova je površinska ekspresija podložna promjenama pod utjecajem normalnih fizioloških procesa te patoloških stanja. Primjerice, u perifernoj krvi žena reproduktivne dobi tijekom plodnih razdoblja zamijećen je povećani broj

TCRV $\alpha$ 7.2<sup>+</sup> subpopulacija T limfocita (154). Broj MAIT stanica, posebice kanonskih CD8<sup>+</sup> i DN (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) subpopulacija, također, opada sa starenjem (154, 232, 233), potencijalno kao posljedica fiziološke involucije timusa te izloženosti organizma djelovanju egzogenih čimbenika (npr. virusnih infekcija) (154,234). U skladu s navedenim, kao odgovor na razne (auto) upalne (165 – 167) i infektivne procese (235) kod odraslih je zabilježeno smanjenje kanonskih CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> i CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> MAIT frakcija. Uz navedeno, različiti stadiji diferencijacije MAIT stanica te stanja aktivacije također mogu utjecati na izražaj pojedinih surogat biljega (235 – 237). Slijedom opisanog, rezultati ranijih studija odražavaju dio promjena koje se događaju unutar MAIT odjeljka tijekom psorijaze ili psorijatičnog artritisa, bez jasnog osvrta na druge biološke čimbenike koji utječu na brojčanu dinamiku MAIT stanica u krvi ili koži. Rezultati ostvareni u okviru ove studije nadopunjavaju ranije spoznaje i pružaju dokaze o promjenama rijetkih cirkulirajućih CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>MR1-tet<sup>+</sup> i CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>MR1-tet<sup>+</sup> MAIT populacija kod muških oboljelih ispitanika, pri čemu veće numeričke frakcije MR1-spregnutih CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>MR1-tet<sup>+</sup> i CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>MR1-tet<sup>+</sup> MAIT stanica ostaju nepromijenjene, barem kod oboljelih s blažom kliničkom slikom.

Primjena MR1-5-OP-RU tetramera u analizi MAIT stanica pruža mogućnost precizne analize kanoničkih MAIT vrsta, ali i tzv. atipičnih MAIT populacija koje prepoznaju MR1 molekule koristeći pri tome alternativne varijante T staničnih receptora. Periferni udjeli ovih „atipičnih“ MR1-tet<sup>+</sup>, ali TCRV $\alpha$ 7.2<sup>-</sup> stanica nisu se značajno razlikovali kod oboljelih i zdravih ispitanika. Sukladno ranijim izvješćima, većina „atipičnih“ MAIT stanica izražavala je CD8 ili CD4 koreceptor, a manjina je izražavala DN ili DP koreceptorski profil (150). „Atipične“ MR1-tet<sup>+</sup>TCRV $\alpha$ 7.2<sup>-</sup> stanice najprije su opisali Gherardin i suradnici te uočili njihovu sposobnost prepoznavanja različitih antigena (238). Važno je, međutim, napomenuti da izostanak površinske ekspresije TCRV $\alpha$ 7.2 receptora može nastupiti i uslijed stimulacije kanoničkih MAIT stanica (239, 240), iako isto tek treba demonstrirati *in vivo*. Zanimljivo, manji podskup CD4<sup>+</sup> i TCRV $\alpha$ 7.2<sup>-</sup> stanica opisan kod novorođenčadi (241), pokazuje diferencijalnu proizvodnju citokina, alternativno sklapanje T staničnih receptora koji prepoznaju različite antigene (149), ali još uvijek nisu proučavani u kontekstu patogeneze humanih bolesti. Broj rijetkih kanonskih vrsta (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>MR1-tet<sup>+</sup> i CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>MR1-tet<sup>+</sup>) i „atipičnih“ MAIT stanica u krvi, međutim, uvijek je nizak (149,206), što ograničava konačnost naših rezultata; stoga bi njihovu funkcionalnu ulogu i status diferencijacije u PV trebalo dodatno istražiti. Nadalje, linija  $\gamma\delta$  T stanica također sadrži manji podskup MR1-reaktivnih V $\delta$ 1/ $\delta$ 3 stanica (152); prema tome, potrebna je modificirana strategija analize protočnom citometrijom da bi se

MR1- reaktivne linije  $\gamma\delta$  T stanica mogle razlikovati od  $\text{TCR}\beta^+\text{MR1-tet}^+\text{TCRV}\alpha 7.2^-$  subpopulacija, što zapravo ističe ograničenja ove studije.

#### 6.6 Korelacija citokina i kemokina sa subpopulacijama $\gamma\delta$ i MAIT staničnih odjeljaka PV ispitanika

Iako značajne razlike u vrijednostima istraživanih citokina i kemokina među skupinama nisu zabilježene, uočeno je da razine serumskih citokina sudjeluju u oblikovanju perifernih  $\gamma\delta$  i MAIT populacija. Slijedom navedenog, utvrđeno je da relativno smanjenje cirkulirajućih  $\gamma\delta\text{TCR}^{\text{int}}\text{V}\delta 2^+$  limfocita, i „atipičnih“  $\text{CD4}^+\text{CD8}^-\text{MR1-tet}^+\text{TCRV}\alpha 7.2^-$  i  $\text{CD4}^+\text{CD8}^+\text{MR1-tet}^+\text{TCRV}\alpha 7.2^-$  T stanica proporcionalno korelira s povećanjem razina CCL27 i IL-18 u serumu oboljelih od psorijaze.

Uzrok zabilježenih korelacijskih obrazaca može biti dvojak. Obrnuto proporcionalan odnos između navedenih cirkulirajućih populacija  $\gamma\delta\text{TCR}^{\text{int}}\text{V}\delta 2^+$  i atipičnih  $\text{CD4}^+\text{CD8}^\pm\text{MR1}$ -reaktivnih stanica i serumskih razina CCL27 i IL-18 može biti posljedica različite osjetljivosti navedenih linija na staničnu smrt (apoptozu) izazvanu trajnom aktivacijom stanica u upalnom mikrookolišu (242). Zabilježeni korelacijski odnosi mogu također odražavati djelovanje homeostatskih mehanizama preraspodjele imunskih subpopulacija koja su najkonkurentnija za odgovor na vezanje CCL27 ili IL18 (243).

Kod osoba oboljelih od psorijaze CCL27 (CTACK), zajedno s IL-18, je izrazito izražen u keratinocitima (111, 244, 245). Kemokin CCL27 ima ulogu kemoatraktanta odnosno pospješuje kemotaksiju i udomljavanje perifernih  $\text{CCR10}^+$   $\gamma\delta$  T stanica u miševa (246) i ljudi (196). IL-18 je dio IL-1 citokinske obitelji (247) koji u mišjim modelima djeluje na način da potiče ekspresiju CCR6 kemokinskih receptora i stimulira udomljavanje regulatornih Treg stanica u timusu (248). U humanim uzorcima oboljelih od sarkoidoze zabilježeni su slični obraci IL-18 djelovanja, koje stimulira ekspresiju CCR6 i posredno pospješuje udomljavanje  $\text{CCL20}^+$  stanica u plućno tkivo (249). CCR6 kemokinski je receptor koji veže CCL20 kemokinski ligand (109), čija je ekspresija izrazito povećana u psorijatično promijenjenim kožnim lezijama (250). Slijedom navedenog, važno je napomenuti da su Laggner i suradnici zabilježili smanjenje udjela perifernih  $\text{CCR10}^+$  i  $\text{CCR6}^+\text{V}\gamma 9\text{V}\delta 2$  stanica, potencijalno kao rezultat njihove migracije i nakupljanja u psorijatičnim kožnim lezijama (196).

## 6.7 Ekspresijski profili transkripcijskih čimbenika i površinskih receptora sortiranih $\gamma\delta$ T i MAIT staničnih linija koreliraju s biokemijskim, demografskim i kliničkim obilježjima oboljelih ispitanika

Analiza transkripcijskog profila sortiranih  $\gamma\delta$  T i MAIT populacija kod oboljelih od psorijaze dala je uvid u unutarstanične mehanizme koji potencijalno stoje u pozadini promjene funkcije i fenotipa ovih stanica. U usporedbi sa sortiranim  $\gamma\delta$  T stanicama zdravih osoba,  $\gamma\delta$  T limfociti oboljelih ispitanika pokazuju gubitak transkripcijskih biljega vezanih uz kontrolu prirođenog fenotipa i citotoksične funkcije. Štoviše, smanjena genska ekspresija *ZBTB16* i *IL18R* bila je pozitivno vezana uz promjene perifernih udjela  $CD3^+\gamma\delta TCR^{int}$ ,  $CD3^+\gamma\delta TCR^{int} V\delta 2^+$  i  $V\delta 2^+$  limfocita, potencijalno kao odraz njihova relativnog smanjenja kod oboljelih od PV.

Raznolikost perifernih MAIT vrsta potencijalno, također, stoji u pozadini promjena zabilježenih na razini transkriptoma jer se njihovi transkripcijski profili mijenjaju u ovisnosti o razvojnem stadiju, tkivnoj lokalizaciji, stupnju aktivnosti i ekspresiji CD4 i CD8 koreceptorskih molekula (210). U okviru ove studije, sortirane MAIT linije oboljelih od psorijaze izražavale su povećane razine gena *RORC* koji upravlja razvojem tip 17 MAIT linija, uz pridruženo smanjenje gena *EOMES* i *CCR6* koji sudjeluju u kontroli razvoja memorijskog fenotipa, citotoksičnog i migratornog kapaciteta.

Opisane promjene na razini transkriptoma utječu na razvoj fenotipskih obilježja i funkcionalnih karakteristika  $\gamma\delta$  i MAIT stanica u psorijazi, i stoga predstavljaju potencijalne terapijske mete.

Gen *ZBTB16* (od engl. *zinc finger BTB domain containing 16*) kodira transkripcijski čimbenik PLZF koji uz *RUNX3* i *IL18R* upravlja razvojem prirodnih T limfocitnih linija, uključujući MAIT i  $\gamma\delta$  T stanice (251). U okviru  $\gamma\delta$  T staničnog odjeljka, PLZF usmjerava diferencijaciju naivnih  $\gamma\delta$  T stanica u stanice tipa 2 i tipa 3 (228) te koordinira ekspresijom  $\delta 2$  lanaca u  $\gamma\delta^{int}$  podvrstama (172, 252). Suprotno, unutar  $\delta 1$  stanične subpopulacije ekspresija PLZF je značajno manje izražena (252). PLZF je ujedno neophodan za razvoj funkcionalnih obilježja i kanonskog MAIT fenotipa koji se razvija tijekom 3 razvojna stadija u timusu (236). PLZF se također nalazi u kontroli aktivacije MAIT i  $V\delta 2^+$  stanica jer izravno potiče ekspresiju gena koji kodiraju stanične receptore za IL-18 te IL-12 (153, 252, 253) te utječe na preživljavanje limfoidnih stanica (254). Izražaj *ZBTB16* vezan je uz ekspresiju *CCR6* kemokinskog receptora i *ROR $\gamma$ t* transkripcijskog čimbenika koji omogućavaju kemotaksiju i efektorsko djelovanje Th17 stanica na mjestima upale (255, 256).

Razvoj MAIT i  $V\delta^+$  stanica moduliran je i djelovanjem T-bet (kodiran *TBX21* genom) transkripcijskog čimbenika, ključnog u sintezi INF- $\gamma$  (255). Uz T-bet, za razvoj Th1 odgovora i citotoksičnog kapaciteta (produkciju INF- $\gamma$ , perforina i granzima B) nužna je i ekspresija gena *Runx3* (od engl. *runt-related transcription factor 3*) i *EOMES* (Eomesodermin) (258, 259). Izražaj gena *EOMES* vezan je uz rane aktivacijske događaje  $CD8^+$  i  $CD4^+CD8^-$  MAIT stanica (260) te uz procese citotoksičnog sazrijevanja i razvoja memorijskog fenotipa.

Smanjena ekspresija gena *ZBTB16*, *RUNX3* i *IL18R* u sortiranim  $\gamma\delta$  T stanicama oboljelih od psorijaze govori, dakle, u prilog smanjenja njihovih prirodnih obilježja, uz gubitak citotoksičnog i migracijskog kapaciteta. S obzirom na izravne uloge PLZF u regulaciji ekspresije gena *RUNX3* i *IL18R*, zabilježene promjene slijede očekivane koekspresijske obrasce (153). Smanjenje izraženosti navedenih TF zasigurno dijelom reflektira i promjene relativnih perifernih udjela  $CD3^+\gamma\delta TCR^{int}$ ,  $CD3^+\gamma\delta TCR^{int} V\delta^+$  i  $V\delta^+$  stanica koje izražavaju visoke razine PLZF (153).

Unutar MAIT staničnog odjeljka, ekspresija gena *RORC* i *CCR6* vezana je uz ontogenezu tipa 3 (MAIT17) stanica, njihovo udomljavanje u sluznicama i ranu aktivaciju putem T staničnog receptora (209, 260). Povećana ekspresija *RORC* u perifernim MAIT linijama potencijalno ukazuje na pojačani razvoj MAIT17 staničnih vrsta koje mogu imati patološku ulogu u PV. S druge strane, zabilježeno smanjenje *CCR6* ekspresije u sortiranim MAIT stanicama PV oboljelih može se potencijalno objasniti redukcijom perifernih  $CD4^+CD8^+MR1-tet^+TCRV\alpha 7.2^+$  i  $CD4^+CD8^-MR1-tet^+TCRV\alpha 7.2^+$  subpopulacija, koje izražavaju visoke razine *CCR6* (231). Zanimljivo, Bertrand i suradnici bilježe smanjenje *CCR6* ekspresije na MAIT stanicama oboljelih od diabetesa tipa I, imunološki posredovane bolesti koja se svrstava u isti spektar oboljenja kao i psorijaza (261). Smanjena ekspresija gena *EOMES* potencijalno reflektira smanjenje citotoksičnog potencijala perifernih MAIT stanica u PV ili preraspodjelu *EOMES^+* MAIT stanica iz krvi na mjesta upale u koži (262) Zabilježene promjene na razini transkriptoma sugeriraju, dakle, različito reprogramiranje MAIT i  $\gamma\delta$  T transkriptoma, koji su prisutni već u ranim razvojnim fazama psorijaze.

Procjene govore da unutar 1% psorijatično promijenjene kože može biti smješteno čak  $10^9$  različitih T stanica zajedno s  $0,4 \times 10^9$  T stanica koje se nalaze u cirkulaciji (12). Promatrajući navedeni podatak o brojčanom udjelu T staničnog odjeljka postavlja se pitanje o veličini udjela pojedinih subpopulacija te njihovoj ulozi u nastanku i razvoju psorijaze. U okviru ove doktorske disertacije dan je uvid u udjele prirodnih T stanica, MAIT i  $\gamma\delta$  limfocita koji, zahvaljujući svojoj efektorskoj plastičnosti i načinu aktivacije, posjeduju svojstva urođenog i

stečenog imunološkog sustava. MAIT i  $\gamma\delta$  stanice čine glavni izvor citokina IL-17 koji zajedno s IL-23, prema dosadašnjim spoznajama, čini središnju okosnicu upale u psorijazi (147, 263). Većina dosadašnjih istraživanja na navedenim subpopulacijama učinjena je na animalnim modelima (mišjim modelima) u strogo kontroliranim uvjetima, bez procjene učinaka brojnih genetičkih i okolišnih čimbenika koji oblikuju periferne udjele MAIT i  $\gamma\delta$  T stanica u ljudi. Istraživanja MAIT i  $\gamma\delta$  T stanica u animalnim modelima, štoviše, imaju svoja ograničenja jer izravne usporedbe dobivenih rezultata često nisu moguće radi različite brojnosti pojedinih populacija kod ljudi i miševa (MAIT stanice rijetke su kod miševa za razliku od ljudi; 10x manje) (264), nedostatka ekspresije gena *ZBTB16* u animalnim MAIT stanicama (265), prisutnosti specifičnih citolitičkih molekula u humanim, ali ne i mišjim MAIT stanicama te slaba proliferacija MAIT stanica *in vitro* (264). Vezano uz  $\gamma\delta$  stanični odjeljak, V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 stanična populacija nedostaje u mišjim modelima i pronalazimo je samo kod ljudi i viših primata (169). Prednosti ove doktorske disertacije vezane su također uz napredne metodološke pristupe u procesima imunofenotipizacije i sortiranja MAIT stanica pomoću MR1-5-OP-RU tetramera (149), analize transkripcijskog profila sortiranih  $\gamma\delta$  i MAIT stanica te iscrpne statističke analize potencijalnih učinaka velikog broja fizioloških i patoloških obilježja ispitanika.

Zabilježeni rezultati ukazuju na nužnost nastavka iscrpne karakterizacije ljudskih  $\gamma\delta$  i MAIT stanica kako bi se bolje precizirale potencijalno patogene vrste u pozadini PV. U međuvremenu, prikazani rezultati daju naslutiti da je  $\gamma\delta$  T stanična populacija u cirkulaciji nerazmjerno promijenjena već kod osoba s blagom kliničkom slikom PV. U prilog tome govori činjenica da dijelovi patološki promijenjene i nepromijenjene kože kod oboljelih pokazuju puno zajedničkih obilježja u epitelnom i imunološkom odjeljku (266–268), uključujući povećanu prisutnost određenih  $\gamma\delta$  podskupina (137).

Zaključno, istraživanje provedeno u okviru ove doktorske disertacije pokazalo je da osobe muškog spola s blago izraženom kliničkom slikom vulgarne psorijaze pokazuju značajno izmjenjene brojčane i transkripcijske profile rijetkih, nedovoljno proučavanih krvnih populacija  $\gamma\delta$  T stanica i MR1—reaktivnih limfocita. Također je pokazano da promjene na razini broja i fenotipa  $\gamma\delta$  T i MR1-spregnutih vrsta treba interpretirati kroz prizmu složenih demografskih, antropometrijskih i kliničkih obilježja oboljelih od vulgarne psorijaze.



## 6.8 Ograničenja istraživanja

U svrhu preciznijeg uvida u fenotip i funkcionalnu ulogu  $\gamma\delta$  i MAIT staničnih odjeljaka u psorijazi, bilo bi zanimljivo učiniti kontrolirano humano istraživanje različito pogođenih jednojajčanih blizanaca. U navedenim uvjetima, mogli bi bolje kontrolirati genetske i okolišne čimbenike koji mogu dovesti do imunoloških varijacija. Razjašnjavanje imunoloških promjena koje dovode do fenotipskog izražaja bolesti moglo bi pridonijeti prevenciji i terapiji psorijaze.

Poželjna je i provjera rezultata u proširenoj skupini ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze u različitim razvojnim fazama, stadijima regresije i relapsa što bi omogućilo širu sliku dinamike kvantitativnih i kvalitativnih karakteristika  $\gamma\delta$  i MAIT staničnih odjeljaka u ovisnosti o fenotipskim karakteristikama bolesti. Neophodna je također, neovisna replikacijska studija u populaciji s većim brojem ispitanica, a u svrhu analize potencijalnih učinaka ženskog spola na perifernu razdiobu MAIT i  $\gamma\delta$ T limfocitnih vrsta u PV. U okviru ovog istraživanja broj sudionika ženskog spola bio je naime premalen za smislenu usporedbu razlika između oboljelih i kontrolnih ispitanica, stoga problem tumačenja potencijalnih spolno specifičnih razlika u PV ostaje i dalje nedovoljno razjašnjen. Važno je međutim, spomenuti da je spolni dimorfizam prirodnih T limfocitnih vrsta u zdravih ljudi opisan u više studija (154, 170, 183). Štoviše, dobro je opisana i premoć muškog spola u vulgarnoj psorijazi kod odraslih, što podupire muško – ženske omjere zabilježene u okviru ove, ali i ranijih, veličinom podjednakih studija o cirkulirajućim udjelima  $\gamma\delta$  T limfocita (196) i  $CD161^+TCRV\alpha 7.2^+$  MAIT (163) stanica u vulgarnoj psorijazi. Osim perifernih  $\gamma\delta$  i MAIT linija, iste je vrste potrebno profilirati i u koži te procijeniti njihovu brojnost, funkcionalni status i receptorski repertoar. Unatoč navedenim ograničenjima, spoznaje dobivene provedenom analizom krvnih  $\gamma\delta$  i MAIT populacija mogu pospješiti nastavak istraživanja i omogućiti razvoj lako dostupnih dijagnostičkih biljega ili terapijskih ciljeva u svrhu razvoja individualiziranih kurativnih metoda.

## 7 ZAKLJUČAK

Provedeno istraživanje i dobiveni rezultati iznjedrili su sljedeće zaključke:

- u perifernoj krvi PV oboljelih, udjeli  $CD3^+CD8^+$  limfocita su smanjeni, a  $CD3^+CD4^+$  stanica povećani, posebice u oboljelih ispitanika muškog spola. Udio  $CD3^+CD8^+$  limfocita se pak povećava u CMV seropozitivnih osoba, neovisno o njihovom kliničkom statusu
- u perifernoj krvi razlikuju se najmanje dvije  $\gamma\delta$  T subpopulacije; veća frakcija  $CD3^+\gamma\delta TCR^{int}$  stanica, koje većinom izražavaju V $\delta$ 2 lanac, te manji udio  $CD3^+\gamma\delta TCR^{hi}$  limfocitnih vrsta s dominantno izraženim V $\delta$ 1 lancem
- promjene CMV, BMI i CRP statusa značajno oblikuju periferne udjele  $CD3^+\gamma\delta TCR^{hi}$  stanica, neovisno o kliničkom fenotipu ispitanika, dok frekvencije  $CD3^+\gamma\delta TCR^+$ ,  $CD3^+\gamma\delta TCR^{int}$ ,  $CD3^+\gamma\delta TCR^{int}V\delta 2^+$  i  $V\delta 2^+$  limfocita oboljelih, ali ne i zdravih ispitanika, opadaju s porastom serumske razine CCL27
- oboljeli muški ispitanici posjeduju povećane periferne udjele  $CD3^+\gamma\delta TCR^{hi}V\delta 2^+$  stanica, a frekvencija  $CD3^+\gamma\delta TCR^{int}V\delta 1^- \delta 2^-$  populacije pozitivno korelira s PASI skalom
- kanoničke  $MR1^+TCRV\alpha 7.2^+MAIT$  vrste zdravih ispitanika uglavnom izražavaju  $CD8^+$  i  $CD4^-CD8^-$  DN koreceptorski profil, dok su atipične  $MR1^+TCRV\alpha 7.2^-$  MAIT stanice većinom  $CD4^+$  i  $CD8^+$
- u odnosu na ženske ispitanice, osobe muškog spola iste dobi posjeduju smanjene udjele  $CD8^+MR1^+TCRV\alpha 7.2^+$  stanica, a oboljeli muški ispitanici u odnosu na zdrave muške kontrole imaju smanjenu frekvenciju  $CD4^+MR1^+TCRV\alpha 7.2^+$  i  $DP MR1^+TCRV\alpha 7.2^+ MAIT$
- u PV oboljelih, udjeli  $DP MR1^+TCRV\alpha 7.2^+$  i  $CD3^+\gamma\delta 1^- \delta 2^- TCR^{int}$  stanica negativno koreliraju, a frekvencija  $CD3^+\gamma\delta TCR^{int}V\delta 2^+$  limfocita i atipičnih  $CD4^+CD8^- MR1^+TRAV1-2^-$  i  $CD4^+CD8^+MR1^+TRAV1-2^-$  MAIT stanica smanjuje se s porastom serumske razine CCL27 i IL-18
- transkripcijski profil  $\gamma\delta$  T limfocita u PV oboljelih obilježava smanjena ekspresija gena vezanih uz kontrolu prirođenog fenotipa (*ZBTB16*), citotoksičnog (*RUNX3*) i migratornog kapaciteta (*IL18R*)
- smanjena genska ekspresija *ZBTB16* i *IL18R* pozitivno korelira s perifernim udjelima  $CD3^+\gamma\delta TCR^{int}$ ,  $CD3^+\gamma\delta TCR^{int}V\delta 2^+$  i  $V\delta 2^+$  limfocita, potencijalno kao odraz njihova relativnog smanjenja kod oboljelih od PV
- MAIT linije PV oboljelih pokazuju povećanu gensku ekspresiju *RORC*, ključnog regulatora fenotipa tipa 3, uz pridruženo smanjenje ekspresije gena *EOMES* i *CCR6* koji sudjeluju u kontroli memorijskog fenotipa, citotoksičnog i migratornog kapaciteta

## 8 SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Cilj je istraživanja bio utvrditi fenotip i funkcionalni status sluznicama pridruženih invarijantnih T (MAIT) limfocita i gamma delta ( $\gamma\delta$ ) T stanica u psorijazi, proučavajući njihove udjele u perifernoj krvi zajedno sa serumskim razinama IL-17, IL-23, IL-18, CCL20 i CCL27 i transkripcijskim profilima gena u kontroli kemokinskih receptora (*IL18R*, *CCR6*, *CCR10*, *SELPLG*) i transkripcijskih čimbenika koji vjerojatno upravljaju razvojem urođenog (*ZBTB16*), citotoksičnog/tip 1 (*RUNX3*, *EOMES*, *TBX21*) i tip 17 (*RORC*) odgovora u sortiranim MAIT i  $\gamma\delta$  T stanicama zdravih i oboljelih ispitanika. **Nacrt studije:** opažajno istraživanje parova. **Ispitanici:** Istraživanje je obuhvatilo 21-og punoljetnog ispitanika oboljelog od vulgarne psorijaze (PV) i 22 zdrave, po dobi i spolu podudarne, nesrodne osobe koje su činile kontrolnu skupinu. **Materijali i metode:** Demografski, kliničko– antropometrijski, biokemijski te podatci postojanja infektivnih biljega prikupljeni su zajedno s uzorcima krvi i seruma. Težina kliničke slike određena je s pomoću PASI ljestvice i DLQI upitnika. Imunofenotipizacija MAIT i  $\gamma\delta$  T stanica učinjena je metodom višeparametrijske protočne citometrije, uključujući specifično obilježavanje MAIT stanica s MR1-5-OP-RU tetramerom. Luminex tehnologija korištena je za mjerenje serumskih razina citokina i kemokina, a ciljani qRT-PCR učinjen je u svrhu analize transkripcijskih profila sortiranih  $\gamma\delta$  i MAIT stanica. Rezultati imunofenotipizacijskih i genotipizacijskih metoda analizirani su u odnosu na biokemijske, serološke, demografske i kliničke značajke ispitanika. **Rezultati:** Sastav perifernih MAIT i  $\gamma\delta$  T stanica značajno je varirao u odnosu na spol, anti-CMV titar, BMI, serumske razine CCL27 i IL-18, i klinički status ispitanika. Manja podskupina  $CD4^+CD8^+MR1\text{-tet}^+TCRV\alpha7.2^+$  i  $CD4^+CD8^-MR1\text{-tet}^+TCRV\alpha7.2^+$  MAIT stanica bila je značajno smanjena u perifernoj krvi muških PV ispitanika, u kojih je ujedno zabilježen veći udio  $V\delta2^+\gamma\delta$  T stanica s visokom ekspresijom  $\gamma\delta$ TCR receptora, te  $V\delta1^- \delta2^- \gamma\delta$  T stanica s manjom razinom  $\gamma\delta$ TCR ekspresije, dijelom kao odraz razvoja teže kliničke slike. Razine transkriptata *ZBTB16*, *IL18R* i *RUNX3* bile su značajno smanjene u perifernim  $\gamma\delta$  T stanicama PV pacijenata, dok su MAIT stanice imale različite transkripcijske promjene gena *RORC*, *EOMES* i *CCR6*. **Zaključak:** Rezultati ovog istraživanja opisuju ranije neprepoznate promjene humanih, cirkulirajućih MAIT i  $\gamma\delta$  T stanica i otkrivaju njihove promjene u sastavu u ovisnosti o spolu, CMV infekciji, BMI statusu, razinama serumskih citokina te razini upale. Štoviše, zabilježeni su i promijenjeni, divergentni transkripcijski profili sortiranih MAIT i  $\gamma\delta$  T stanica te povezani s razvojem psorijaze. **Ključne riječi:** citokini, gamma delta T limfociti, MR1, psorijaza, sluznicama pridružene invarijantne T stanice

## 9 SUMMARY

**Objectives:** The study aimed to determine the phenotype and functional status of mucosa-associated invariant T (MAIT) lymphocytes and gamma delta ( $\gamma\delta$ ) T cells in psoriasis, by studying their peripheral blood proportions, together with IL-17, IL-23, IL-18, CCL20 and CCL27 serum levels, gene expression profiles of chemokine/selectin receptors (*IL18R*, *CCR6*, *CCR10*, *SELPLG*) and transcription factors likely controlling innate (*ZBTB16*), cytotoxic/type 1 (*RUNX3*, *EOMES*, *TBX21*), and type 17 functions (*RORC*) in sorted MAIT and  $\gamma\delta$  T cells of healthy and affected examinees.. **Study design:** a case-control study. **Participants:** the study included 21 adult patients with psoriasis vulgaris (PV) and 22 age- and sex-matched, unrelated healthy controls. **Materials and methods:** Demographic, clinical – anthropometric, biochemical and data of infective load were collected along with blood and serum samples. Disease severity was determined according to PASI and DLQI questionnaire. Immunophenotyping of MAIT and  $\gamma\delta$  T cells was performed by multiparametric flow cytometry, including MAIT specific labeling with the 5-OP-RU loaded MR1-tetramer. Luminex technology was used for cytokine and chemokine serum level measurements, and targeted qRT-PCR was performed to determine transcription profile of flow-sorted  $\gamma\delta$  and MAIT cells. The results of immunophenotyping and genotyping methods were analyzed in relation to the biochemical, serological, demographic and clinical characteristics of the subjects **Results:** High interpersonal differences in  $\gamma\delta$  T and MAIT cell composition were observed in relation to sex, anti-CMV titer, BMI, CCL27, and IL-18 serum content and disease severity. A minor subset of canonical  $CD4^+CD8^+MR1\text{-tet}^+TCRV\alpha7.2^+$  and  $CD4^+CD8^-MR1\text{-tet}^+TCRV\alpha7.2^+$  T cells was the most significantly underrepresented community in male PV individuals, whereas  $V\delta2^+$   $\gamma\delta$  T cells expressing high  $\gamma\delta$ TCR and  $V\delta1^-\delta2^-$   $\gamma\delta$  T cells expressing intermediate  $\gamma\delta$ TCR levels were selectively enriched in affected males, partly reflecting disease severity. The transcript levels of *ZBTB16*, *IL18R*, and *RUNX3* were significantly reduced in peripheral  $\gamma\delta$  T cell compartments of PV patients, whereas MAIT cells exhibited differential transcriptional changes of *RORC*, *EOMES*, and *CCR6*. **Conclusion:** The result of this study demonstrates previously unrecognized skewing of human circulating MAIT and  $\gamma\delta$  T cell subsets, and reveals their compositional changes in relation to sex, CMV exposure, BMI, serum cytokine content, and inflammatory burden. Moreover, a divergent transcriptional profile of flow-sorted MAIT and  $\gamma\delta$  cells was described and related to early-stage psoriasis. **Keywords:** cytokines, gamma delta T lymphocytes, mucosal-associated invariant T cells, MR1, psoriasis

## 10 LITERATURA

1. Nestle FO, Kaplan DH, Barker J. Psoriasis. *N Engl J Med*. 2009 Jul 30;361(5):496–509.
2. Prey S, Paul C, Bronsard V, Puzenat E, Gourraud P-A, Aractingi S, i sur. Assessment of risk of psoriatic arthritis in patients with plaque psoriasis: a systematic review of the literature. *J Eur Acad Dermatol Venereol J Eu Acad Dermatol Venereol*. 2010 Apr;24 Suppl 2:31–5.
3. Rendon A, Schäkel K. Psoriasis Pathogenesis and Treatment. *Int J Mol Sci*. 2019 Mar 23;20(6).
4. de Oliveira M de FSP, Rocha B de O, Duarte GV. Psoriasis: classical and emerging comorbidities. *An Bras Dermatol*. 2015;90(1):9–20.
5. Ritchlin C, FitzGerald O. Psoriatic and Reactive Arthritis. A Companion to Rheumatology. 1. izd. Maryland Heights, Missouri: Mosby; 2007.
6. Willan R. On Cutaneous Diseases. Vol. I. Containing: Ord. I. Papulae, Ord. II. Squamae, Ord. III. Exanthemata, Ord. IV. Bullae. 1. američko izd. Philadelphia: Kimber and Conrad; 1809.
7. Rayer P.A Theoretical and Practical Treatise on the Diseases of the Skin. 2. izd. London: J.B. Bailliere. 1835.
8. Hebra F, Kaposi. Lehrbuch der Hautkrankheiten. 2. izd. *Stuttgart*: Ferdinand Euke; 1876.
9. Fry L. Psoriasis. *Br J Dermatol*. 1988;119(4):445–61.
10. Cowden A, Van Voorhees AS. Introduction: History of psoriasis and psoriasis therapy. U: Weinberg JM, urednik. Treatment of Psoriasis. 1. izd. *Birkhäuser*: Basel; 2008. str. 1-9.
11. Langley RGB, Krueger GG, Griffiths CEM. Psoriasis: epidemiology, clinical features, and quality of life. *Ann Rheum Dis*. 2005 Mar;64 Suppl 2:ii18-23; discussion ii24-25.
12. Krueger J, Bowcock A. Psoriasis pathophysiology: current concepts of pathogenesis. *Ann Rheum Dis*. 2005 Mar;64(Suppl 2):ii30–6.
13. Dobrić I, Pašić A. Eritematoskvamozne i papulozne dermatoze. U: Dobrić I. Dermatovenerologija. Zagreb: Grafoplast; 2005. str 167-181.
14. Ayala-Fontánez N, Soler DC, McCormick TS. Current knowledge on psoriasis and autoimmune diseases. *Psoriasis Auckl NZ*. 2016 Feb 22;6:7–32.
15. Sarac G, Koca TT, Baglan T. A brief summary of clinical types of psoriasis. *North Clin Istanb*. 2016 Jun 14;3(1):79–82.
16. Henseler T, Christophers E. Psoriasis of early and late onset: characterization of two types of psoriasis vulgaris. *J Am Acad Dermatol*. 1985 Sep;13(3):450–6.
17. Fredriksson T, Pettersson U. Severe psoriasis--oral therapy with a new retinoid. *Dermatologica*. 1978;157(4):238–44.

18. Feldman S, Krueger G. Psoriasis assessment tools in clinical trials. *Ann Rheum Dis.* 2005 Mar;64(Suppl 2):ii65–8.
19. Finlay AY, Khan GK. Dermatology Life Quality Index (DLQI)—a simple practical measure for routine clinical use. *Clin Exp Dermatol.* 1994;19(3):210–6.
20. Parisi R, Symmons DPM, Griffiths CEM, Ashcroft DM, Identification and Management of Psoriasis and Associated Comorbidity (IMPACT) project team. Global epidemiology of psoriasis: a systematic review of incidence and prevalence. *J Invest Dermatol.* 2013 Feb;133(2):377–85.
21. Michalek IM, Loring B, John SM. A systematic review of worldwide epidemiology of psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV.* 2017 Feb;31(2):205–12.
22. Parisi R, Iskandar IYK, Kontopantelis E, Augustin M, Griffiths CEM, Ashcroft DM; Global Psoriasis Atlas. National, regional, and worldwide epidemiology of psoriasis: systematic analysis and modelling study. *BMJ.* 2020 May 28;369:m1590.
23. Mueller W, Herrmann B. Cyclosporin A for psoriasis. *N Engl J Med.* 1979 Sep 6;301(10):555.
24. Raychaudhuri SK, Maverakis E, Raychaudhuri SP. Diagnosis and classification of psoriasis. *Autoimmun Rev.* 2014 Apr 1;13(4):490–5.
25. Cai Y, Fleming C, Yan J. New insights of T cells in the pathogenesis of psoriasis. *Cell Mol Immunol.* 2012 Jul;9(4):302–9.
26. Deng Y, Chang C, Lu Q. The Inflammatory Response in Psoriasis: a Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2016 Jun;50(3):377–89.
27. Solmaz D, Bakirci S, Kimyon G, Gunal EK, Dogru A, Bayindir O, i sur. Impact of Having Family History of Psoriasis or Psoriatic Arthritis on Psoriatic Disease. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2020 Jan;72(1):63–68.
28. Lønnberg AS, Skov L, Skytthe A, Kyvik KO, Pedersen OB, Thomsen SF. Heritability of psoriasis in a large twin sample. *Br J Dermatol.* 2013 Aug;169(2):412–6.
29. Li Q, Chandran V, Tsoi L, O’Rielly D, Nair RP, Gladman D, i sur. Quantifying Differences in Heritability among Psoriatic Arthritis (PsA), Cutaneous Psoriasis (PsC) and Psoriasis vulgaris (PsV). *Sci Rep.* 2020 Mar 18;10(1):4925.
30. Consortium TIPG. The International Psoriasis Genetics Study: Assessing Linkage to 14 Candidate Susceptibility Loci in a Cohort of 942 Affected Sib Pairs. *Am J Hum Genet.* 2003 Aug;73(2):430.
31. Allen MH, Ameen H, Veal C, Evans J, Ramrakha-Jones VS, Marsland AM, i sur. The major psoriasis susceptibility locus PSORS1 is not a risk factor for late-onset psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2005 Jan;124(1):103–6.
32. Tiala I, Suomela S, Huuhtanen J, Wakkinen J, Hölltä-Vuori M, Kainu K, i sur. The CCHCR1 (HCR) gene is relevant for skin steroidogenesis and downregulated in cultured psoriatic keratinocytes. *J Mol Med Berl Ger.* 2007 Jun;85(6):589–601.

33. Gudjonsson JE, Johnston A, Sigmundsdottir H, Valdimarsson H. Immunopathogenic mechanisms in psoriasis. *Clin Exp Immunol.* 2004 Jan;135(1):1–8.
34. Nair RP, Duffin KC, Helms C, Ding J, Stuart PE, Goldgar D, i sur. Genomewide Scan Reveals Association of Psoriasis with IL-23 and NF- $\kappa$ B Pathways. *Nat Genet.* 2009 Feb;41(2):199–204.
35. Goldminz AM, Au SC, Kim N, Gottlieb AB, Lizzul PF. NF- $\kappa$ B: an essential transcription factor in psoriasis. *J Dermatol Sci.* 2013 Feb;69(2):89–94.
36. Barrea L, Nappi F, Di Somma C, Savanelli MC, Falco A, Balato A, i sur. Environmental Risk Factors in Psoriasis: The Point of View of the Nutritionist. *Int J Environ Res Public Health.* 2016; 13(5):743
37. Carrascosa JM, Rocamora V, Fernandez-Torres RM, Jimenez-Puya R, Moreno JC, Coll-Puigserver N, i sur. Obesity and psoriasis: inflammatory nature of obesity, relationship between psoriasis and obesity, and therapeutic implications. *Actas Dermosifiliogr.* 2014 Feb;105(1):31–44.
38. Herron MD, Hinckley M, Hoffman MS, Papenfuss J, Hansen CB, Callis KP, i sur. Impact of obesity and smoking on psoriasis presentation and management. *Arch Dermatol.* 2005 Dec;141(12):1527–34.
39. Bremmer S, Van Voorhees AS, Hsu S, Korman NJ, Lebwohl MG, Young M, i sur. Obesity and psoriasis: from the Medical Board of the National Psoriasis Foundation. *J Am Acad Dermatol.* 2010 Dec;63(6):1058–69.
40. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest.* 1995 May;95(5):2409–15.
41. Azizian M, Mahdipour E, Mirhafez SR, Shoeibi S, Nematy M, Esmaily H, i sur. Cytokine profiles in overweight and obese subjects and normal weight individuals matched for age and gender. *Ann Clin Biochem.* 2016 Nov 1;53(6):663–8.
42. Centers for Disease Control and Prevention (US); National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion (US); Office on Smoking and Health (US). *How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease: A Report of the Surgeon General.* Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention (US); 2010. Dostupno na adresi: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53017/>. Datum pristupa: 21.12.2020.
43. Laniado-Laborín R. Smoking and Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). Parallel Epidemics of the 21st Century. *Int J Environ Res Public Health.* 2009 Jan;6(1):209–24.
44. Li LF, Chan RLY, Lu L, Shen J, Zhang L, Wu WKK, i sur. Cigarette smoking and gastrointestinal diseases: The causal relationship and underlying molecular mechanisms (Review). *Int J Mol Med.* 2014 Aug 1;34(2):372–80.

45. Barbhaiya M, Tedeschi SK, Lu B, Malspeis S, Kreps D, Sparks JA, i sur. Cigarette smoking and the risk of systemic lupus erythematosus, overall and by anti-double stranded DNA antibody subtype, in the Nurses' Health Study cohorts. *Ann Rheum Dis*. 2018;77(2):196–202.
46. Naldi L. Psoriasis and smoking: links and risks. *Psoriasis Auckl NZ*. 2016;6:65–71.
47. Li W, Han J, Choi HK, Qureshi AA. Smoking and risk of incident psoriasis among women and men in the United States: a combined analysis. *Am J Epidemiol*. 2012 Mar 1;175(5):402–13.
48. Pezzolo E, Naldi L. The relationship between smoking, psoriasis and psoriatic arthritis. *Expert Rev Clin Immunol*. 2019 Jan;15(1):41–8.
49. Armstrong AW, Armstrong EJ, Fuller EN, Sockolov ME, Voyles SV. Smoking and pathogenesis of psoriasis: a review of oxidative, inflammatory and genetic mechanisms. *Br J Dermatol*. 2011 Dec;165(6):1162–8.
50. Jordan CT, Cao L, Roberson EDO, Pierson KC, Yang C-F, Joyce CE, i sur. PSORS2 is due to mutations in CARD14. *Am J Hum Genet*. 2012 May 4;90(5):784–95.
51. Mo J-H, Chung Y-J, Hayashi T, Lee J, Raz E. The Role of Plasmacytoid and Myeloid Dendritic Cells in Induction of Asthma in a Mouse Model and the Effect of a TLR9 Agonist on Dendritic Cells. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2011 Jul;3(3):199–204.
52. Heeschen C, Jang JJ, Weis M, Pathak A, Kaji S, Hu RS, i sur. Nicotine stimulates angiogenesis and promotes tumor growth and atherosclerosis. *Nat Med*. 2001 Jul;7(7):833–9.
53. Jin Y, Yang S, Zhang F, Kong Y, Xiao F, Hou Y, i sur. Combined effects of HLA-Cw6 and cigarette smoking in psoriasis vulgaris: a hospital-based case-control study in China. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV*. 2009 Feb;23(2):132–7.
54. Farkas A, Kemény L. Psoriasis and alcohol: is cutaneous ethanol one of the missing links? *Br J Dermatol*. 2010 Apr;162(4):711–6.
55. Farkas A, Kemény L. Alcohol, liver, systemic inflammation and skin: a focus on patients with psoriasis. *Skin Pharmacol Physiol*. 2013;26(3):119–26.
56. Balak DM, Hajdarbegovic E. Drug-induced psoriasis: clinical perspectives. *Psoriasis Auckl NZ*. 2017 Dec 7;7: 87–94.
57. Dogra S, Kamat D. Drug-induced psoriasis. *Indian J Rheumatol*. 2019 Jan 12;14(5):37.
58. Kim GK, Del Rosso JQ. Drug-Provoked Psoriasis: Is It Drug Induced or Drug Aggravated? *J Clin Aesthetic Dermatol*. 2010 Jan;3(1):32–8.
59. Fry L, Baker BS. Triggering psoriasis: the role of infections and medications. *Clin Dermatol*. 2007 Dec;25(6):606–15.
60. Wolf R, Lo Schiavo A. Is transglutaminase the mediator between antimalarial drugs and psoriasis? *Int J Dermatol*. 1997 Jan;36(1):10–3.



61. Honda T, Kabashima K. Prostanoids and leukotrienes in the pathophysiology of atopic dermatitis and psoriasis. *Int Immunol*. 2019 Aug 23;31(9):589–95.
62. Wolf R, Tamir A, Brenner S. Psoriasis Related to Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors. *Dermatology*. 1990;181(1):51–3.
63. Soley B da S, Silva LM, Mendes DAGB, Báfica A, Pesquero JB, Bader M, i sur. B1 and B2 kinin receptor blockade improves psoriasis-like disease. *Br J Pharmacol*. 2020;177(15):3535–51.
64. Fits L van der, Mourits S, Voerman JSA, Kant M, Boon L, Laman JD, i sur. Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin Inflammation in Mice Is Mediated via the IL-23/IL-17 Axis. *J Immunol*. 2009 May 1;182(9):5836–45.
65. Ockenfels HM, Wagner SN, Keim-Maas C, Funk R, Nussbaum G, Goos M. Lithium and psoriasis: cytokine modulation of cultured lymphocytes and psoriatic keratinocytes by lithium. *Arch Dermatol Res*. 1996 Apr;288(4):173–8.
66. Petersein C, Sack U, Mergl R, Schönherr J, Schmidt F, Lichtblau N, i sur. Impact of lithium alone and in combination with antidepressants on cytokine production in vitro. *J Neural Transm*. 2014 Nov 7;
67. Halevy S, Livni E. Psoriasis and psoriasiform eruptions associated with propranolol--the role of an immunological mechanism. *Arch Dermatol Res*. 1991;283(7):472–3.
68. Ockenfels HM, Nussbaum G, Schultewolter T, Mertins K, Wagner SN, Goos M. Tyrosine phosphorylation in psoriatic T cells is modulated by drugs that induce or improve psoriasis. *Dermatol Basel Switz*. 1995;191(3):217–25.
69. Snast I, Reiter O, Atzmony L, Leshem YA, Hodak E, Mimouni D, i sur. Psychological stress and psoriasis: a systematic review and meta-analysis. *Br J Dermatol*. 2018 May;178(5):1044–55.
70. Picardi A, Abeni D. Stressful life events and skin diseases: disentangling evidence from myth. *Psychother Psychosom*. 2001 Jun;70(3):118–36.
71. Kim JE, Cho DH, Kim HS, Kim HJ, Lee JY, Cho BK, i sur. Expression of the corticotropin-releasing hormone-proopiomelanocortin axis in the various clinical types of psoriasis. *Exp Dermatol*. 2007 Feb;16(2):104–9.
72. Zbytek B, Mysliwski A, Slominski A, Wortsman J, Wei ET, Mysliwska J. Corticotropin-releasing hormone affects cytokine production in human HaCaT keratinocytes. *Life Sci*. 2002 Jan 18;70(9):1013–21.
73. Buske-Kirschbaum A, Kern S, Ebrecht M, Hellhammer DH. Altered distribution of leukocyte subsets and cytokine production in response to acute psychosocial stress in patients with psoriasis vulgaris. *Brain Behav Immun*. 2007 Jan;21(1):92–9.
74. Schmid-Ott G, Jaeger B, Boehm T, Langer K, Stephan M, Raap U, i sur. Immunological effects of stress in psoriasis. *Br J Dermatol*. 2009 Apr;160(4):782–5.

75. Leung DY, Gately M, Trumble A, Ferguson-Darnell B, Schlievert PM, Picker LJ. Bacterial superantigens induce T cell expression of the skin-selective homing receptor, the cutaneous lymphocyte-associated antigen, via stimulation of interleukin 12 production. *J Exp Med*. 1995 Feb 1;181(2):747–53.
76. Leung DY, Travers JB, Giorno R, Norris DA, Skinner R, Aelion J, i sur. Evidence for a streptococcal superantigen-driven process in acute guttate psoriasis. *J Clin Invest*. 1995 Nov;96(5):2106–12.
77. Prinz JC. Psoriasis vulgaris, streptococci and the immune system: a riddle to be solved soon? *Scand J Immunol*. 1997 Jun;45(6):583–6.
78. Miller RA. The Koebner phenomenon. *Int J Dermatol*. 1982 May;21(4):192–7.
79. Camargo CM dos S, Brotas AM, Ramos-e-Silva M, Carneiro S. Isomorphic phenomenon of Koebner: facts and controversies. *Clin Dermatol*. 2013 Dec;31(6):741–9.
80. Raychaudhuri SP, Raychaudhuri SK. Role of NGF and neurogenic inflammation in the pathogenesis of psoriasis. *Prog Brain Res*. 2004; 146:433–7.
81. Davidovici BB, Sattar N, Prinz JC, Jörg PC, Puig L, Emery P, i sur. Psoriasis and systemic inflammatory diseases: potential mechanistic links between skin disease and co-morbid conditions. *J Invest Dermatol*. 2010 Jul;130(7):1785–96.
82. Gisondi P, Fostini AC, Fossà I, Girolomoni G, Targher G. Psoriasis and the metabolic syndrome. *Clin Dermatol*. 2018 Feb;36(1):21–8.
83. Gelfand JM, Neimann AL, Shin DB, Wang X, Margolis DJ, Troxel AB. Risk of Myocardial Infarction in Patients With Psoriasis. *JAMA*. 2006 Oct 11;296(14):1735–41.
84. Ellinghaus D, Ellinghaus E, Nair RP, Stuart PE, Esko T, Metspalu A, i sur. Combined Analysis of Genome-wide Association Studies for Crohn Disease and Psoriasis Identifies Seven Shared Susceptibility Loci. *Am J Hum Genet*. 2012 Apr 6;90(4):636–47.
85. Fiorino G, Omodei PD. Psoriasis and Inflammatory Bowel Disease: Two Sides of the Same Coin? *J Crohns Colitis*. 2015 Sep 1;9(9):697–8.
86. Weigle N, McBane S. Psoriasis. *Am Fam Physician*. 2013 May 1;87(9):626–33.
87. Kannan S, Heller MM, Lee ES, Koo JY. The role of tumor necrosis factor-alpha and other cytokines in depression: what dermatologists should know. *J Dermatol Treat*. 2013 Apr;24(2):148–52.
88. Fraga NA de A, de Oliveira M de FP, Follador I, Rocha B de O, Rêgo VR. Psoriasis and uveitis: a literature review. *An Bras Dermatol*. 2012;87(6):877–83.
89. Brockbank J, Gladman D. Diagnosis and management of psoriatic arthritis. *Drugs*. 2002;62(17):2447–57.
90. Stuart PE, Nair RP, Tsoi LC, Tejasvi T, Das S, Kang HM, i sur. Genome-wide Association Analysis of Psoriatic Arthritis and Cutaneous Psoriasis Reveals Differences in Their Genetic Architecture. *Am J Hum Genet*. 2015 Dec 3;97(6):816–36.

91. Winchester R, Minevich G, Steshenko V, Kirby B, Kane D, Greenberg DA, i sur. HLA associations reveal genetic heterogeneity in psoriatic arthritis and in the psoriasis phenotype. *Arthritis Rheum.* 2012;64(4):1134–44.
92. Gupta R, Debbaneh MG, Liao W. Genetic Epidemiology of Psoriasis. *Curr Dermatol Rep.* 2014 Mar;3(1):61–78.
93. Bonneville M, O'Brien RL, Born WK. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol.* 2010 Jul;10(7):467–78.
94. Godfrey DI, Uldrich AP, McCluskey J, Rossjohn J, Moody DB. The burgeoning family of unconventional T cells. *Nat Immunol.* 2015 Nov;16(11):1114–23.
95. Yazdi AS, Röcken M, Ghoreschi K. Cutaneous immunology: basics and new concepts. *Semin Immunopathol.* 2016 Jan 1;38(1):3–10.
96. Nguyen AV, Soulika AM. The Dynamics of the Skin's Immune System. *Int J Mol Sci.* 2019 Apr 12;20(8).
97. Maranduca MA, Hurjui LL, Branisteanu DC, Serban DN, Branisteanu DE, Dima N, i sur. Skin - a vast organ with immunological function (Review). *Exp Ther Med.* 2020 Jul 1;20(1):18–23.
98. Tang D, Kang R, Coyne CB, Zeh HJ, Lotze MT. PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunol Rev.* 2012;249(1):158–75.
99. Newton K, Dixit VM. Signaling in Innate Immunity and Inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012 Jan 3;4(3):a006049.
100. Ganguly D, Chamilos G, Lande R, Gregorio J, Meller S, Facchinetti V, i sur. Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. *J Exp Med.* 2009 Aug 31;206(9):1983–94.
101. Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, Chatterjee B, Wang Y-H, Homey B, i sur. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature.* 2007 Oct 4;449(7162):564–9.
102. Lowes MA, Suárez-Fariñas M, Krueger JG. Immunology of psoriasis. *Annu Rev Immunol.* 2014;32: 227–55.
103. Albanesi C, Scarponi C, Pallotta S, Daniele R, Bosisio D, Madonna S, i sur. Chemerin expression marks early psoriatic skin lesions and correlates with plasmacytoid dendritic cell recruitment. *J Exp Med.* 2009 Jan 16;206(1):249–58.
104. Di Meglio P, Villanova F, Nestle FO. Psoriasis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014 Aug 1;4(8).
105. Chu C-C, Di Meglio P, Nestle FO. Harnessing dendritic cells in inflammatory skin diseases. *Semin Immunol.* 2011 Feb;23(1):28–41.

106. Li N, Yamasaki K, Saito R, Fukushi-Takahashi S, Shimada-Omori R, Asano M, i sur. Alarmin Function of Cathelicidin Antimicrobial Peptide LL37 through IL-36 $\gamma$  Induction in Human Epidermal Keratinocytes. *J Immunol*. 2014 Nov 15;193(10):5140–8.
107. Chiang CC, Cheng WJ, Korinek M, Lin CY, Hwang TL. Neutrophils in Psoriasis. *Front Immunol*. 2019 Oct 9;10: 2376.
108. Lin AM, Rubin CJ, Khandpur R, Wang JY, Riblett M, Yalavarthi S, i sur. Mast Cells and Neutrophils Release IL-17 through Extracellular Trap Formation in Psoriasis. *J Immunol*. 2011 Jul 1;187(1):490–500.
109. Bergen L, Petrovic A, Aarebrot A, Appel S. Current knowledge on autoantigens and autoantibodies in psoriasis. *Scand J Immunol*. 2020 Jul 22;92.
110. Berg EL, Yoshino T, Rott LS, Robinson MK, Warnock RA, Kishimoto TK, i sur. The cutaneous lymphocyte antigen is a skin lymphocyte homing receptor for the vascular lectin endothelial cell-leukocyte adhesion molecule 1. *J Exp Med*. 1991 Dec 1;174(6):1461–6.
111. Homey B, Alenius H, Müller A, Soto H, Bowman EP, Yuan W, i sur. CCL27-CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammation. *Nat Med*. 2002 Feb;8(2):157–65.
112. Fitzhugh DJ, Naik S, Caughman SW, Hwang ST. Cutting edge: C-C chemokine receptor 6 is essential for arrest of a subset of memory T cells on activated dermal microvascular endothelial cells under physiologic flow conditions in vitro. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2000 Dec 15;165(12):6677–81.
113. Schutyser E, Struyf S, Van Damme J. The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003 Oct;14(5):409–26.
114. Teunissen MBM, Munneke JM, Bernink JH, Spuls PI, Res PCM, Te Velde A, i sur. Composition of innate lymphoid cell subsets in the human skin: enrichment of NCR (+) ILC3 in lesional skin and blood of psoriasis patients. *J Invest Dermatol*. 2014 Sep;134(9):2351–60.
115. Detmar M, Brown LF, Claffey KP, Yeo KT, Kocher O, Jackman RW, i sur. Overexpression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in psoriasis. *J Exp Med*. 1994 Sep 1;180(3):1141–6.
116. Heidenreich R, Röcken M, Ghoreschi K. Angiogenesis drives psoriasis pathogenesis. *Int J Exp Pathol*. 2009 Jun;90(3):232–48.
117. Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2007 Oct;7(10):803–15.
118. Kagami S, Rizzo HL, Lee JJ, Koguchi Y, Blauvelt A. Circulating Th17, Th22, and Th1 cells are increased in psoriasis. *J Invest Dermatol*. 2010 May;130(5):1373–83.
119. Lowes MA, Kikuchi T, Fuentes-Duculan J, Cardinale I, Zaba LC, Haider AS, i sur. Psoriasis vulgaris lesions contain discrete populations of Th1 and Th17 T cells. *J Invest Dermatol*. 2008 May;128(5):1207–11.

120. Austin LM, Ozawa M, Kikuchi T, Walters IB, Krueger JG. The majority of epidermal T cells in Psoriasis vulgaris lesions can produce type 1 cytokines, interferon-gamma, interleukin-2, and tumor necrosis factor-alpha, defining TC1 (cytotoxic T lymphocyte) and TH1 effector populations: a type 1 differentiation bias is also measured in circulating blood T cells in psoriatic patients. *J Invest Dermatol.* 1999 Nov;113(5):752–9.
121. Res PC, Piskin G, de Boer OJ, van der Loos CM, Teeling P, Bos JD, Teunissen MB. Overrepresentation of IL-17A and IL-22 producing CD8 T cells in lesional skin suggests their involvement in the pathogenesis of psoriasis. *PLoS One.* 2010 Nov 24;5(11):e14108.
122. Boutet MA, Nerviani A, Gallo Afflitto G, Pitzalis C. Role of the IL-23/IL-17 Axis in Psoriasis and Psoriatic Arthritis: The Clinical Importance of Its Divergence in Skin and Joints. *Int J Mol Sci.* 2018 Feb 9;19(2):530.
123. Vignali DAA, Kuchroo VK. IL-12 Family Cytokines: Immunological Playmakers. *Nat Immunol.* 2012 Jul 19;13(8):722–8.
124. Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, et al. Novel p19 Protein Engages IL-12p40 to Form a Cytokine, IL-23, with Biological Activities Similar as Well as Distinct from IL-12. *Immunity.* 2000 Nov 1;13(5):715–25.
125. Parham C, Chirica M, Timans J, Vaisberg E, Travis M, Cheung J, et al. A Receptor for the Heterodimeric Cytokine IL-23 Is Composed of IL-12R $\beta$ 1 and a Novel Cytokine Receptor Subunit, IL-23R. *J Immunol.* 2002 Jun 1;168(11):5699–708.
126. Piskin G, Sylva-Steenland RMR, Bos JD, Teunissen MBM. In Vitro and In Situ Expression of IL-23 by Keratinocytes in Healthy Skin and Psoriasis Lesions: Enhanced Expression in Psoriatic Skin. *J Immunol.* 2006 Feb 1;176(3):1908–15.
127. Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity.* 2006 Jun;24(6):677–88.
128. Moseley TA, Haudenschild DR, Rose L, Reddi AH. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003 Apr;14(2):155–74.
129. Johansen C, Usher PA, Kjellerup RB, Lundsgaard D, Iversen L, Kragballe K. Characterization of the interleukin-17 isoforms and receptors in lesional psoriatic skin. *Br J Dermatol.* 2009;160(2):319–24.
130. Alwan W, Nestle FO. Pathogenesis and treatment of psoriasis: exploiting pathophysiological pathways for precision medicine. *Clin Exp Rheumatol.* 2015 Oct;33(5 Suppl 93):S2-6.
131. Ferrari SM, Ruffilli I, Colaci M, Antonelli A, Ferri C, Fallahi P. CXCL10 in psoriasis. *Adv Med Sci.* 2015 Sep 1;60(2):349–54.
132. Prasad SV, Fiedoruk K, Daniluk T, Piktel E, Bucki R. Expression and Function of Host Defense Peptides at Inflammation Sites. *Int J Mol Sci.* 2020 Jan;21(1):104.
133. Singh TP, Zhang HH, Borek I, Wolf P, Hedrick MN, Singh SP, et al. Monocyte-derived inflammatory Langerhans cells and dermal dendritic cells mediate psoriasis-like inflammation. *Nat Commun.* 2016 Dec 16;7(1):13581.

134. Nukui T, Ehama R, Sakaguchi M, Sonogawa H, Katagiri C, Hibino T, i sur. S100A8/A9, a key mediator for positive feedback growth stimulation of normal human keratinocytes. *J Cell Biochem.* 2008;104(2):453–64.
135. Benoit S, Toksoy A, Ahlmann M, Schmidt M, Sunderkötter C, Foell D, i sur. Elevated serum levels of calcium-binding S100 proteins A8 and A9 reflect disease activity and abnormal differentiation of keratinocytes in psoriasis. *Br J Dermatol.* 2006;155(1):62–6.
136. Boyman O, Hefti HP, Conrad C, Nickoloff BJ, Suter M, Nestle FO. Spontaneous development of psoriasis in a new animal model shows an essential role for resident T cells and tumor necrosis factor-alpha. *J Exp Med.* 2004 Mar 1;199(5):731–6.
137. Matos TR, O'Malley JT, Lowry EL, Hamm D, Kirsch IR, Robins HS, i sur. Clinically resolved psoriatic lesions contain psoriasis-specific IL-17-producing  $\alpha\beta$  T cell clones. *J Clin Invest.* 2017 Nov 1;127(11):4031–41.
138. Hinks TSC. Mucosal-associated invariant T cells in autoimmunity, immune-mediated diseases and airways disease. *Immunology.* 2016 May;148(1):1–12.
139. Miyake S. [MAIT cells in autoimmunity]. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi.* 2014;37(1):19–24.
140. Paul S, Shilpi, Lal G. Role of gamma-delta ( $\gamma\delta$ ) T cells in autoimmunity. *J Leukoc Biol.* 2015 Feb 1;97(2):259–71.
141. Porcelli S, Yockey CE, Brenner MB, Balk SP. Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood CD4-8- alpha/beta T cells demonstrates preferential use of several V beta genes and an invariant TCR alpha chain. *J Exp Med.* 1993 Jul 1;178(1):1-16.
142. Hinks TSC, Wallington JC, Williams AP, Djukanović R, Staples KJ, Wilkinson TMA. Steroid-induced Deficiency of Mucosal-associated Invariant T Cells in the Chronic Obstructive Pulmonary Disease Lung. Implications for Nontypeable Haemophilus influenzae Infection. *Am J Respir Crit Care Med.* 2016 Nov 15;194(10):1208–18.
143. Gibbs A, Leansyah E, Introini A, Paquin-Proulx D, Hasselrot K, Andersson E, i sur. MAIT cells reside in the female genital mucosa and are biased towards IL-17 and IL-22 production in response to bacterial stimulation. *Mucosal Immunol.* 2017 Jan;10(1):35–45.
144. Li J, Reantragoon R, Kostenko L, Corbett AJ, Varigos G, Carbone FR. The frequency of mucosal-associated invariant T cells is selectively increased in dermatitis herpetiformis. *Australas J Dermatol.* 2017 Aug;58(3):200–4.
145. Jeffery HC, van Wilgenburg B, Kurioka A, Parekh K, Stirling K, Roberts S, i sur. Biliary epithelium and liver B cells exposed to bacteria activate intrahepatic MAIT cells through MR1. *J Hepatol.* 2016 May;64(5):1118–27.
146. Magalhaes I, Pingris K, Poitou C, Bessoles S, Venteclef N, Kiaf B, i sur. Mucosal-associated invariant T cell alterations in obese and type 2 diabetic patients. *J Clin Invest.* 2015 Apr;125(4):1752–62.

147. Dusseaux M, Martin E, Serriari N, Péguillet I, Premel V, Louis D, i sur. Human MAIT cells are xenobiotic-resistant, tissue-targeted, CD161<sup>hi</sup> IL-17-secreting T cells. *Blood*. 2011 Jan 27;117(4):1250–9.
148. Toubal A, Nel I, Lotersztajn S, Lehuen A. Mucosal-associated invariant T cells and disease. *Nat Rev Immunol*. 2019 Oct;19(10):643–57.
149. Gherardin NA, Souter MN, Koay H-F, Mangas KM, Seemann T, Stinear TP, i sur. Human blood MAIT cell subsets defined using MR1 tetramers. *Immunol Cell Biol*. 2018 May; 96(5):507–25.
150. Godfrey DI, Koay H-F, McCluskey J, Gherardin NA. The biology and functional importance of MAIT cells. *Nat Immunol*. 2019 Sep;20(9):1110–28.
151. Xiao X, Cai J. Mucosal-Associated Invariant T Cells: New Insights into Antigen Recognition and Activation. *Front Immunol*. 2017 Nov 10;8: 1540.
152. Ussher JE, Klenerman P, Willberg CB. Mucosal-associated invariant T-cells: new players in anti-bacterial immunity. *Front Immunol*. 2014 Oct 8; 5:450.
153. Provine NM, Binder B, FitzPatrick MEB, Schuch A, Garner LC, Williamson KD, i sur. Unique and Common Features of Innate-Like Human V $\delta$ 2<sup>+</sup>  $\gamma$  $\delta$ T Cells and Mucosal-Associated Invariant T Cells. *Front Immunol*. 2018 Apr 23; 9:756.
154. Novak J, Dobrovolny J, Novakova L, Kozak T. The Decrease in Number and Change in Phenotype of Mucosal-Associated Invariant T cells in the Elderly and Differences in Men and Women of Reproductive Age. *Scand J Immunol*. 2014 Oct;80(4):271–5.
155. Pennell LM, Galligan CL, Fish EN. Sex affects immunity. *J Autoimmun*. 2012 May;38(2–3):J282-291.
156. Ammitzbøll C, Börnsen L, Romme Christensen J, Ratzner R, Romme Nielsen B, Søndergaard HB, i sur. Smoking reduces circulating CD26<sup>hi</sup>CD161<sup>hi</sup> MAIT cells in healthy individuals and patients with multiple sclerosis. *J Leukoc Biol*. 2017 May;101(5):1211-1220.
157. Chiba A, Murayama G, Miyake S. Mucosal-Associated Invariant T Cells in Autoimmune Diseases. *Front Immunol*. 2018 Jun 11;9: 1333–1333.
158. Carnero Contentti E, Farez MF, Correale J. Mucosal-Associated Invariant T Cell Features and TCR Repertoire Characteristics During the Course of Multiple Sclerosis. *Front Immunol*. 2019 Nov 20; 10:2690.
159. Serriari N-E, Eoche M, Lamotte L, Lion J, Fumery M, Marcelo P, i sur. Innate mucosal-associated invariant T (MAIT) cells are activated in inflammatory bowel diseases. *Clin Exp Immunol*. 2014 May;176(2):266–74.
160. Cho Y-N, Kee S-J, Kim T-J, Jin HM, Kim M-J, Jung H-J, i sur. Mucosal-Associated Invariant T Cell Deficiency in Systemic Lupus Erythematosus. *J Immunol*. 2014 Oct 15;193(8):3891–901.

161. Hinks TSC, Zhou X, Staples KJ, Dimitrov BD, Manta A, Petrossian T, i sur. Innate and adaptive T cells in asthmatic patients: Relationship to severity and disease mechanisms. *J Allergy Clin Immunol*. 2015 Aug 1;136(2):323–33.
162. Kwon Y-S, Cho Y-N, Kim M-J, Jin H-M, Jung H-J, Kang J-H, i sur. Mucosal-associated invariant T cells are numerically and functionally deficient in patients with mycobacterial infection and reflect disease activity. *Tuberc Edinb Scotl*. 2015 May;95(3):267–74.
163. Teunissen M, Yeremenko N, L P Baeten D, Chielie S, Spuls P, de Rie M, i sur. The IL-17A-Producing CD8(+) T Cell Population in Psoriatic Lesional Skin Comprises Mucosa-Associated Invariant T cells and Conventional T Cells. *J Invest Dermatol*. 2014 Jun 19;134.
164. Lukasik Z, Elewaut D, Venken K. MAIT Cells Come to the Rescue in Cancer Immunotherapy? *Cancers (Basel)*. 2020 Feb 11;12(2):413.
165. Miyazaki Y, Miyake S, Chiba A, Lantz O, Yamamura T. Mucosal-associated invariant T cells regulate Th1 response in multiple sclerosis. *Int Immunol*. 2011 Sep;23(9):529–35.
166. Rouxel O, Nel I, DaSilva J, Beaudoin L, Tard C, Kiaf B, i sur. Dual role of Mucosal-Associated Invariant T cells in type 1 diabetes. *Nat Immunol*. 2017 Dec;18(12):1321–31.
167. Toussiroit E, Saas P. MAIT cells: potent major cellular players in the IL-17 pathway of spondyloarthritis? *RMD Open*. 2018 Dec;4(2): e000821.
168. Raychaudhuri SK, Abria C, Mitra A, Raychaudhuri SP. Functional significance of MAIT cells in psoriatic arthritis. *Cytokine*. 2020 Jan; 125:154855.
169. Pang DJ, Neves JF, Sumaria N, Pennington DJ. Understanding the complexity of  $\gamma\delta$  T-cell subsets in mouse and human. *Immunology*. 2012;136(3):283–90.
170. Fonseca S, Pereira V, Lau C, Teixeira MDA, Bini-Antunes M, Lima M. Human Peripheral Blood Gamma Delta T Cells: Report on a Series of Healthy Caucasian Portuguese Adults and Comprehensive Review of the Literature. *Cells*. 2020 Mar 16;9(3).
171. Qi C, Wang Y, Li P, Zhao J. Gamma Delta T Cells and Their Pathogenic Role in Psoriasis. *Front Immunol*. 2021 Feb 25; 12:627139.
172. Venken K, Jacques P, Mortier C, Labadia ME, Decruy T, Coudenys J, i sur. ROR $\gamma$ t inhibition selectively targets IL-17 producing iNKT and  $\gamma\delta$ -T cells enriched in Spondyloarthritis patients. *Nat Commun*. 2019 Dec;10(1):9.
173. Kohlgruber AC, Gal-Oz ST, LaMarche NM, Shimazaki M, Duquette D, Koay H-F, i sur.  $\gamma\delta$  T cells producing interleukin-17A regulate adipose regulatory T cell homeostasis and thermogenesis. *Nat Immunol*. 2018 May;19(5):464–74.
174. Willcox CR, Mohammed F, Willcox BE. Resolving the mystery of pyrophosphate antigen presentation. *Nat Immunol*. 2013 Sep;14(9):886–7.
175. Hayday A, Vantourout P. A long-playing CD about the  $\gamma\delta$  TCR repertoire. *Immunity*. 2013 Dec 12;39(6):994–6.



176. Ribot JC, Ribeiro ST, Correia DV, Sousa AE, Silva-Santos B. Human  $\gamma\delta$  thymocytes are functionally immature and differentiate into cytotoxic type 1 effector T cells upon IL-2/IL-15 signaling. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2014 Mar 1;192(5):2237–43.
177. Michel M-L, Pang DJ, Haque SFY, Potocnik AJ, Pennington DJ, Hayday AC. Interleukin 7 (IL-7) selectively promotes mouse and human IL-17-producing  $\gamma\delta$  cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Oct 23;109(43):17549–54.
178. Moens E, Brouwer M, Dimova T, Goldman M, Willems F, Vermijlen D. IL-23R and TCR signaling drives the generation of neonatal V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells expressing high levels of cytotoxic mediators and producing IFN-gamma and IL-17. *J Leukoc Biol*. 2011 May;89(5):743–52.
179. Lawand M, Déchanet-Merville J, Dieu-Nosjean M-C. Key Features of Gamma-Delta T-Cell Subsets in Human Diseases and Their Immunotherapeutic Implications. *Front Immunol*. 2017; 8:761.
180. Brandes M, Willimann K, Moser B. Professional antigen-presentation function by human gammadelta T Cells. *Science*. 2005 Jul 8;309(5732):264–8.
181. Brandes M, Willimann K, Bioley G, Lévy N, Eberl M, Luo M, i sur. Cross-presenting human  $\gamma\delta$  T cells induce robust CD8+  $\alpha\beta$  T cell responses. *Proc Natl Acad Sci*. 2009 Feb 17;106(7):2307–12.
182. Dimova T, Brouwer M, Gosselin F, Tassignon J, Leo O, Donner C, i sur. Effector V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells dominate the human fetal  $\gamma\delta$  T-cell repertoire. *Proc Natl Acad Sci*. 2015 Feb 10;112(6): E556–65.
183. Caccamo N, Dieli F, Wesch D, Jomaa H, Eberl M. Sex-specific phenotypical and functional differences in peripheral human V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2 T cells. *J Leukoc Biol*. 2006 Apr;79(4):663–6.
184. Rosa SCD, Andrus JP, Perfetto SP, Mantovani JJ, Herzenberg LA, Herzenberg LA, i sur. Ontogeny of  $\gamma\delta$  T Cells in Humans. *J Immunol*. 2004 Feb 1;172(3):1637–45.
185. Kallemeijn MJ, Boots AMH, van der Klift MY, Brouwer E, Abdulahad WH, Verhaar JAN, i sur. Ageing and latent CMV infection impact on maturation, differentiation and exhaustion profiles of T-cell receptor gammadelta T-cells. *Sci Rep*. 2017 Jul 14;7(1):5509.
186. Khairallah C, Déchanet-Merville J, Capone M.  $\gamma\delta$  T Cell-Mediated Immunity to Cytomegalovirus Infection. *Front Immunol*. 2017 Feb 9;8: 105.
187. Roux A, Mourin G, Larsen M, Fastenackels S, Urrutia A, Gorochov G, i sur. Differential Impact of Age and Cytomegalovirus Infection on the  $\gamma\delta$  T Cell Compartment. *J Immunol*. 2013 Aug 1;191(3):1300–6.
188. Pitard V, Roumanes D, Lafarge X, Couzi L, Garrigue I, Lafon M-E, i sur. Long-term expansion of effector/memory V $\delta$ 2-gammadelta T cells is a specific blood signature of CMV infection. *Blood*. 2008 Aug 15;112(4):1317–24.

189. Déchanet J, Merville P, Lim A, Retière C, Pitard V, Lafarge X, i sur. Implication of  $\gamma\delta$  T cells in the human immune response to cytomegalovirus. *J Clin Invest*. 1999 May 15;103(10):1437–49.
190. Huygens A, Dauby N, Vermijlen D, Marchant A. Immunity to cytomegalovirus in early life. *Front Immunol*. 2014 Oct 30;5: 552.
191. Ito M, Kojiro N, Ikeda T, Ito T, Funada J, Kokubu T. Increased Proportions of Peripheral Blood  $\gamma\delta$  T Cells in Patients with Pulmonary Tuberculosis. *CHEST*. 1992 Jul 1;102(1):195–7.
192. Balbi B, Valle MT, Oddera S, Giunti D, Manca F, Rossi GA, i sur. T-lymphocytes with gamma delta+ V delta 2+ antigen receptors are present in increased proportions in a fraction of patients with tuberculosis or with sarcoidosis. *Am Rev Respir Dis*. 1993 Dec;148(6 Pt 1):1685–90.
193. Su D, Shen M, Li X, Sun L. Roles of  $\gamma\delta$  T cells in the pathogenesis of autoimmune diseases. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013: 985753.
194. Mabuchi T, Singh TP, Takekoshi T, Jia G, Wu X, Kao MC, i sur. CCR6 Is Required for Epidermal Trafficking of  $\gamma\delta$ -T Cells in an IL-23-Induced Model of Psoriasisiform Dermatitis. *J Invest Dermatol*. 2013 Jan 1;133(1):164–71.
195. Ness-Schwickerath KJ, Jin C, Morita CT. Cytokine requirements for the differentiation and expansion of IL-17A- and IL-22-producing human Vgamma2Vdelta2 T cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2010 Jun 15;184(12):7268–80.
196. Laggner U, Di Meglio P, Perera Gk, Hundhausen C, Lacy KE, Ali N, i sur. Identification of a novel pro-inflammatory human skin-homing V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell subset with a potential role in psoriasis. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2011 Sep 1;187(5):2783–93.
197. Kress E, Hedges JF, Jutila MA. Distinct gene expression in human Vdelta1 and Vdelta2 gammadelta T cells following non-TCR agonist stimulation. *Mol Immunol*. 2006 May;43(12):2002–11.
198. Davey MS, Willcox CR, Joyce SP, Ladell K, Kasatskaya SA, McLaren JE, i sur. Clonal selection in the human V $\delta$ 1 T cell repertoire indicates  $\gamma\delta$  TCR-dependent adaptive immune surveillance. *Nat Commun*. 2017 Mar 1;8(1):14760.
199. Mann CJ. Observational research methods. Research design II: cohort, cross sectional, and case-control studies. *Emerg Med J*. 2003 Jan 1;20(1):54–60.
200. Cai Y, Shen X, Ding C, Qi C, Li K, Li X, i sur. Pivotal Role of Dermal IL-17-Producing  $\gamma\delta$  T Cells in Skin Inflammation. *Immunity*. 2011 Oct 28;35(4):596–610.
201. Corbett AJ, Eckle SBG, Birkinshaw RW, Liu L, Patel O, Mahony J, i sur. T-cell activation by transitory neo-antigens derived from distinct microbial pathways. *Nature*. 2014 May;509(7500):361–5.
202. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif*. 2001 Dec;25(4):402–8.

203. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001 May 1;29(9): e45.
204. Reichert T1, DeBruyère M, Deneys V, Tötterman T, Lydyard P, Yuksel F i sur. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. *Clin Immunol Immunopathol*1991; 60(2):190-208.
205. Valiathan R, Deeb K, Diamante M, Ashman M, Sachdeva N, Asthana D. Reference ranges of lymphocyte subsets in healthy adults and adolescents with special mention of T cell maturation subsets in adults of South Florida. *Immunobiology* 2014;219(7):487-96
206. Ferguson TS. Rules for Rejection of Outliers. *Rev Inst Int Stat Rev Int Stat Inst.* 1961;29(3):29–43.
207. Lin LI-K. A Concordance Correlation Coefficient to Evaluate Reproducibility. *Biometrics.* 1989;45(1):255–68.
208. Koay H-F, Gherardin NA, Xu C, Seneviratna R, Zhao Z, Chen Z, i sur. Diverse MR1-restricted T cells in mice and humans. *Nat Commun.* 2019 Dec;10(1):2243.
209. Lee M, Lee E, Han SK, Choi YH, Kwon D, Choi H, i sur. Single-cell RNA sequencing identifies shared differentiation paths of mouse thymic innate T cells. *Nat Commun.* 2020 Aug 31;11(1):4367.
210. Legoux F, Gilet J, Procopio E, Echasserieau K, Bernardeau K, Lantz O. Molecular mechanisms of lineage decisions in metabolite-specific T cells. *Nat Immunol.* 2019 Sep;20(9):1244–55.
211. Langewouters AMG, van Erp PEJ, de Jong EMGJ, van de Kerkhof PCM. Lymphocyte subsets in peripheral blood of patients with moderate-to-severe versus mild plaque psoriasis. *Arch Dermatol Res.* 2008 Mar;300(3):107–13.
212. Kverneland AH, Streitz M, Geissler E, Hutchinson J, Vogt K, Boës D, i sur. Age and gender leucocytes variances and references values generated using the standardized ONE-Study protocol. *Cytometry A.* 2016;89(6):543–64.
213. Ortega C, Fernández-A S, Carrillo JM, Romero P, Molina IJ, Moreno JC, i sur. IL-17-producing CD8+ T lymphocytes from psoriasis skin plaques are cytotoxic effector cells that secrete Th17-related cytokines. *J Leukoc Biol.* 2009 Aug;86(2):435–43.
214. Prinz JC. Autoimmune aspects of psoriasis: Heritability and autoantigens. *Autoimmun Rev.* 2017 Sep 1;16(9):970–9.
215. Di Benedetto S, Derhovanessian E, Steinhagen-Thiessen E, Goldeck D, Müller L, Pawelec G. Impact of age, sex and CMV-infection on peripheral T cell phenotypes: results from the Berlin BASE-II Study. *Biogerontology.* 2015 Oct;16(5):631–43.
216. Bai F, Zheng W, Dong Y, Wang J, Garstka MA, Li R, i sur. Serum levels of adipokines and cytokines in psoriasis patients: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget.* 2017 Nov 1;9(1):1266–78.

217. Kyriakou A, Patsatsi A, Vyzantiadis TA, Sotiriadis D. Serum levels of TNF- $\alpha$ , IL-12/23p40, and IL-17 in plaque psoriasis and their correlation with disease severity. *J Immunol Res*. 2014;2014: 467541.
218. Arican O, Aral M, Sasmaz S, Ciragil P. Serum Levels of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, and IL-18 in Patients With Active Psoriasis and Correlation With Disease Severity. *Mediators Inflamm*. 2005 Oct 24;2005(5):273–9.
219. Michalak-Stoma A, Bartosińska J, Kowal M, Juskiewicz-Borowiec M, Gerkowicz A, Chodorowska G. Serum Levels of Selected Th17 and Th22 Cytokines in Psoriatic Patients. *Dis Markers*. 2013;35(6):625–31.
220. Sumaria N, Roediger B, Ng LG, Qin J, Pinto R, Cavanagh LL, i sur. Cutaneous immunosurveillance by self-renewing dermal gammadelta T cells. *J Exp Med*. 2011 Mar 14;208(3):505–18.
221. Nakamizo S, Egawa G, Tomura M, Sakai S, Tsuchiya S, Kitoh A, i sur. Dermal V $\gamma$ 4 +  $\gamma\delta$  T Cells Possess a Migratory Potency to the Draining Lymph Nodes and Modulate CD8 + T-Cell Activity through TNF- $\alpha$  Production. *J Invest Dermatol*. 2015 Apr;135(4):1007–15.
222. Ramírez-Valle F, Gray EE, Cyster JG. Inflammation induces dermal V $\gamma$ 4 +  $\gamma\delta$ T17 memory-like cells that travel to distant skin and accelerate secondary IL-17–driven responses. *Proc Natl Acad Sci*. 2015 Jun 30;112(26):8046–51.
223. Knight A, Madrigal AJ, Grace S, Sivakumaran J, Kottaridis P, Mackinnon S, i sur. The role of V $\delta$ 2-negative  $\gamma\delta$  T cells during cytomegalovirus reactivation in recipients of allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2010 Sep 23;116(12):2164–72.
224. Vermijlen D, Brouwer M, Donner C, Liesnard C, Tackoen M, Van Rysselberge M, i sur. Human cytomegalovirus elicits fetal  $\gamma\delta$  T cell responses in utero. *J Exp Med*. 2010 Apr 12;207(4):807–21.
225. Del Giudice M, Gangestad SW. Rethinking IL-6 and CRP: Why they are more than inflammatory biomarkers, and why it matters. *Brain Behav Immun*. 2018 May;70:61–75.
226. Farshchian M, Ansar A, Sobhan M, Hoseinpoor V. C-reactive protein serum level in patients with psoriasis before and after treatment with narrow-band ultraviolet B. *An Bras Dermatol*. 2016;91(5):580–3.
227. Guggino G, Ciccia F, Di Liberto D, Lo Pizzo M, Ruscitti P, Cipriani P, i sur. Interleukin (IL)-9/IL-9R axis drives  $\gamma\delta$  T cells activation in psoriatic arthritis patients. *Clin Exp Immunol*. 2016 Dec;186(3):277–83.
228. Tan L, Fichtner AS, Bubke A, Odak I, Schultze-Florey C, Koenecke C, i sur. A fetal wave of human type-3  $\gamma\delta$  T cells with restricted TCR diversity persists into adulthood. *bioRxiv*. 2020 Aug 14;2020.08.14.248146.
229. Mangan BA, Dunne MR, O'Reilly VP, Dunne PJ, Exley MA, O'Shea D, i sur. Cutting edge: CD1d restriction and Th1/Th2/Th17 cytokine secretion by human V $\delta$ 3 T cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2013 Jul 1;191(1):30–4.

230. Halary F, Pitard V, Dlubek D, Krzysiek R, de la Salle H, Merville P, i sur. Shared reactivity of V $\delta$ 2<sup>-</sup>  $\gamma\delta$  T cells against cytomegalovirus-infected cells and tumor intestinal epithelial cells. *J Exp Med*. 2005 May 16;201(10):1567–78.
231. Kurioka A, Jahun AS, Hannaway RF, Walker LJ, Fergusson JR, Sverremark-Ekström E, i sur. Shared and Distinct Phenotypes and Functions of Human CD161<sup>++</sup> V $\alpha$ 7.2<sup>+</sup> T Cell Subsets. *Front Immunol*. 2017 Aug 30;8: 1031.
232. Walker LJ, Tharmalingam H, Klenerman P. The Rise and Fall of MAIT Cells with Age. *Scand J Immunol*. 2014 Dec;80(6):462–3.
233. Chen P, Deng W, Li D, Zeng T, Huang L, Wang Q, i sur. Circulating Mucosal-Associated Invariant T Cells in a Large Cohort of Healthy Chinese Individuals From Newborn to Elderly. *Front Immunol*. 2019 Feb 19;10: 260.
234. Le Bourhis L, Mburu YK, Lantz O. MAIT cells, surveyors of a new class of antigen: development and functions. *Curr Opin Immunol*. 2013 Apr 1;25(2):174–80.
235. Leeansyah E, Ganesh A, Quigley MF, Sönnerborg A, Andersson J, Hunt PW, i sur. Activation, exhaustion, and persistent decline of the antimicrobial MR1-restricted MAIT-cell population in chronic HIV-1 infection. *Blood*. 2013 Feb 14;121(7):1124–35.
236. Koay H-F, Gherardin NA, Enders A, Loh L, Mackay LK, Almeida CF, i sur. A three-stage intrathymic development pathway for the mucosal-associated invariant T cell lineage. *Nat Immunol*. 2016 Nov;17(11):1300–11.
237. Koppejan H, Jansen DTSL, Hameetman M, Thomas R, Toes REM, van Gaalen FA. Altered composition and phenotype of mucosal-associated invariant T cells in early untreated rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2019 Jan 5;21(1):3.
238. Gherardin NA, Keller AN, Woolley RE, Le Nours J, Ritchie DS, Neeson PJ, i sur. Diversity of T Cells Restricted by the MHC Class I-Related Molecule MR1 Facilitates Differential Antigen Recognition. *Immunity*. 2016 Jan 19;44(1):32–45.
- 239 Salio M, Gasser O, Gonzalez-Lopez C, Martens A, Veerapen N, Gileadi U, i sur. Activation of Human Mucosal-Associated Invariant T Cells Induces CD40L-Dependent Maturation of Monocyte-Derived and Primary Dendritic Cells. *J Immunol*. 2017 Oct 15;199(8):2631–8.
240. Berkson JD, Slichter CK, DeBerg HA, Delaney MA, Woodward-Davis AS, Maurice NJ, i sur. Inflammatory Cytokines Induce Sustained CTLA-4 Cell Surface Expression on Human MAIT Cells. *ImmunoHorizons*. 2020 Jan 23;4(1):14–22.
241. Swarbrick GM, Gela A, Cansler ME, Null MD, Duncan RB, Nemes E, i sur. Postnatal Expansion, Maturation, and Functionality of MR1T Cells in Humans. *Front Immunol*. 2020 Sep 16;11:556695.
242. Chiba A, Tamura N, Yoshikiyo K, Murayama G, Kitagaichi M, Yamaji K, i sur. Activation status of mucosal-associated invariant T cells reflects disease activity and pathology of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 2017 Mar 14;19(1):58.

243. Loh L, Wang Z, Sant S, Koutsakos M, Jegaskanda S, Corbett AJ, i sur. Human mucosal-associated invariant T cells contribute to antiviral influenza immunity via IL-18–dependent activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Sep 6;113(36):10133–8.
244. Companjen AR, van der Velden VH, Vooys A, Debets R, Benner R, Prens EP. Human keratinocytes are major producers of IL-18: predominant expression of the unprocessed form. *Eur Cytokine Netw*. 2000 Sep;11(3):383–90.
245. Naik SM, Cannon G, Burbach GJ, Singh SR, Swerlick RA, Wilcox JN, i sur. Human keratinocytes constitutively express interleukin-18 and secrete biologically active interleukin-18 after treatment with pro-inflammatory mediators and dinitrochlorobenzene. *J Invest Dermatol*. 1999 Nov;113(5):766–72
246. Jin Y, Xia M, Sun A, Saylor CM, Xiong N. CCR10 is important for the development of skin-specific  $\gamma\delta$ T cells by regulating their migration and location. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2010 Nov 15;185(10):5723–31.
247. Yasuda K, Nakanishi K, Tsutsui H. Interleukin-18 in Health and Disease. *Int J Mol Sci*. 2019 Feb 2;20(3):649.
248. Peligero-Cruz C, Givony T, Seb e-Pedr os A, Dobeř J, Kadouri N, Nevo S, i sur. IL18 signaling promotes homing of mature Tregs into the thymus. *Elife*. 2020 Jul 20;9:e58213.
249. Facco M, Baesso I, Miorin M, Bortoli M, Cabrelle A, Boscaro E, i sur. Expression and role of CCR6/CCL20 chemokine axis in pulmonary sarcoidosis. *J Leukoc Biol*. 2007 Oct;82(4):946–55.
250. Homey B, Dieu-Nosjean MC, Wiesenborn A, Massacrier C, Pin JJ, Oldham E, i sur. Up-regulation of macrophage inflammatory protein-3 alpha/CCL20 and CC chemokine receptor 6 in psoriasis. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2000 Jun 15;164(12):6621–32.
251. Zhang S, Laouar A, Denzin LK, Sant'Angelo DB. Zbtb16 (PLZF) is stably suppressed and not inducible in non-innate T cells via T cell receptor-mediated signaling. *Sci Rep*. 2015 Jul 16;5: 12113.
252. Gutierrez-Arcelus M, Teslovich N, Mola AR, Polidoro RB, Nathan A, Kim H, i sur. Lymphocyte innateness defined by transcriptional states reflects a balance between proliferation and effector functions. *Nat Commun*. 2019 Dec;10(1):687.
253. Mao A-P, Constantinides MG, Mathew R, Zuo Z, Chen X, Weirauch MT, i sur. Multiple layers of transcriptional regulation by PLZF in NKT-cell development. *Proc Natl Acad Sci*. 2016 Jul 5;113(27):7602–7.
254. Parrado A, Robledo M, Moya-Quiles MR, Mar n LA, Chomienne C, Padua RA, i sur. The promyelocytic leukemia zinc finger protein down-regulates apoptosis and expression of the proapoptotic BID protein in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Feb 17;101(7):1898–903.
255. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, i sur. The Orphan Nuclear Receptor ROR $\gamma$ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17+ T Helper Cells. *Cell*. 2006 Sep 22;126(6):1121–33.

256. Singh SP, Zhang HH, Tsang H, Gardina PJ, Myers TG, Nagarajan V, i sur. PLZF Regulates CCR6 and is Critical for the Acquisition and Maintenance of the Th17 Phenotype in Human Cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2015 May 1;194(9):4350–61.
257. Yang R, Mele F, Worley L, Langlais D, Rosain J, Benhsaien I, i sur. Human T-bet Governs Innate and Innate-like Adaptive IFN- $\gamma$  Immunity against Mycobacteria. *Cell*. 2020 Dec 23;183(7):1826-1847.e31.
258. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*. 2000 Mar 17;100(6):655–69.
259. Pearce EL, Mullen AC, Martins GA, Krawczyk CM, Hutchins AS, Zediak VP, i sur. Control of effector CD8+ T cell function by the transcription factor Eomesodermin. *Science*. 2003 Nov 7;302(5647):1041–3.
260. Lamichhane R, Schneider M, Harpe SM de la, Harrop TWR, Hannaway RF, Dearden PK, i sur. TCR- or Cytokine-Activated CD8+ Mucosal-Associated Invariant T Cells Are Rapid Polyfunctional Effectors That Can Coordinate Immune Responses. *Cell Rep*. 2019 Sep 17;28(12):3061-3076.e5.
261. Bertrand L, Lehuen A. MAIT cells in metabolic diseases. *Mol Metab*. 2019 Sep 6;27(Suppl): S114–21.
262. Šahmatova L, Sügis E, Šunina M, Hermann H, Prans E, Pihlap M, i sur. Signs of innate immune activation and premature immunosenescence in psoriasis patients. *Sci Rep*. 2017 Aug 8;7(1):7553.
263. Pantelyushin S, Haak S, Ingold B, Kulig P, Heppner FL, Navarini AA, i sur. Ror $\gamma$ t+ innate lymphocytes and  $\gamma\delta$  T cells initiate psoriasiform plaque formation in mice. *J Clin Invest*. 2012 Jun;122(6):2252–6.
264. Sugimoto C, Fujita H, Wakao H. Mucosal-associated invariant T cells from induced pluripotent stem cells: A novel approach for modeling human diseases. *World J Stem Cells*. 2016 Apr 26;8(4):158–69.
265. Martin E, Treiner E, Duban L, Guerri L, Laude H, Toly C, i sur. Stepwise Development of MAIT Cells in Mouse and Human. *PLOS Biol*. 2009 Mar 10;7(3):e1000054.
266. Choy DF, Hsu DK, Seshasayee D, Fung MA, Modrusan Z, Martin F, i sur. Comparative transcriptomic analyses of atopic dermatitis and psoriasis reveal shared neutrophilic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Dec;130(6):1335-1343.e5.
267. Chiricozzi A, Suárez-Fariñas M, Fuentes-Duculan J, Cueto I, Li K, Tian S, i sur. Increased expression of IL-17 pathway genes in non-lesional skin of moderate-to-severe psoriasis vulgaris. *Br J Dermatol*. 2016 Jan;174(1):136–45.
268. Cabrijan L, Batinac T, Lenkovic M, Gruber F. The distinction between lesional and non-lesional skin in psoriasis vulgaris through expression of adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1. *Med Hypotheses*. 2009 Mar 1;72(3):327–9.

269. Gerdes LA, Janoschka C, Eveslage M, Mannig B, Wirth T, Schulte-Mecklenbeck A, i sur. Immune signatures of prodromal multiple sclerosis in monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020 Sep 1;117(35):21546–56.



## 11 ŽIVOTOPIS

**Osobni podatci:****Ime:** Vera Plužarić, dr. med.**Adresa (kućna):** Krstova ulica 56, 31 000 Osijek

tel. +385 95 832 1361

e-mail: [vera.pluzaric@hotmail.com](mailto:vera.pluzaric@hotmail.com)**Datum i mjesto rođenja:** 31. prosinca 1982. godine, Osijek**Obrazovanje:****2007.-danas** – Poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i Zdravstvo, Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**2017. (07. lipnja)** – položen specijalistički ispit iz dermatologije i venerologije**2012.-2013.** – Poslijediplomski specijalistički studij dermatovenerologije; KBC Zagreb, Klinika za kožne i spolne bolesti, Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**2011.-2017.** – specijalističko usavršavanje iz dermatologije i venerologije**2009.** – položeni stručni i državni ispit**2001.-2007.** – Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište J.J Strossmayera u Osijeku, studij medicine**1995.-2001.** – I. gimnazija, Osijek**1987.-1995.** – osnovno obrazovanje, Osnovna škola Retfala, Osijek**Radno iskustvo (zaposlenje):****2017.-danas** – specijalist dermatologije i venerologije; Zavod za dermatologiju i venerologiju KBC Osijek, Osijek, Hrvatska**2011.-2017.** – specijalizant dermatologije i venerologije; Zavod za dermatologiju i venerologiju KBC Osijek i Klinika za kožne i spolne bolesti, KBC Zagreb, Hrvatska**2009.-2011.** – doktor medicine; Zavod za transfuzijsku medicinu KBC Osijek, Hrvatska**2007.-2008.** – doktor medicine-liječnik pripravnik, KBC Osijek, Osijek, Hrvatska**Stipendije i nagrade:****2002/2003-2006/2007.** – Stipendija za studente Osječko-baranjske županije**2009. i 2010.** – potpora za poslijediplomski studij Osječko-baranjske županije

**Sudjelovanje i vođenje projekata:**

**2020.-2025.** – „NGS analiza transkriptoma MAIT i  $\gamma\delta$  T limfocita: fenotip, funkcija i raznolikost TCR klonova u pozadini razvoja vulgarne psorijaze“. Uspostavni istraživački projekti, HRZZ UIP-2019-04. Voditelj projekta: doc.dr.sc. Stana Tokić. Istraživač.

**2020.-2021.** – „NGS analiza raznolikosti TCR $\beta$  repertoara perifernih TCRV $\alpha$ 7.2+MR1+MAIT stanica kod oboljelih od vulgarne psorijaze“. Instrukcijski znanstveni projekt. Voditelj projekta: doc.dr.sc. Stana Tokić. Izvor financiranja Medicinski fakultet Osijek. Istraživač.

**2019.-2020.** – „Imunofenotipizacija transkripcijskog i citokinskog profila perifernih V1 i V2  $\gamma\delta$  T subpopulacija u oboljelih od vulgarne psorijaze“. Instrukcijski znanstveni projekt. Voditelj projekta: doc.dr.sc. Stana Tokić. Izvor financiranja Medicinski fakultet Osijek. Istraživač.

**2018.-2019.** – „Uloga microRNA transkriptoma MAIT i  $\gamma\delta$  T limfocita u razvoju i progresiji vulgarne psorijaze“. Instrukcijski znanstveni projekt. Voditelj projekta: doc.dr.sc. Stana Tokić. Izvor financiranja Medicinski fakultet Osijek. Istraživač.

**2018.** – „Fenotipizacija i funkcionalna uloga MAIT i  $\gamma\delta$  T limfocita u razvoju i progresiji vulgarne psorijaze,„ Sveučilišni znanstveni projekt. Voditelj projekta: doc.dr.sc. Stana Tokić. Izvor financiranja Sveučilište Josipa Juraja Strossmayera u Osijeku. Istraživač.

**Nastavne aktivnosti**

**2007.-2008.** – Demonstrator na kolegiju Mikrobiologija; Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek – Katedra za mikrobiologiju

**Organizacija znanstvenih skupova :**

**2007.** – 47. International Neuropsychiatric Pula Congress, član organizacijskoga tima, 13. – 16. lipanj. 2007., International Neuropsychiatric Congresses in cooperation Croatian Medical Association, Pula

**Znanstvena aktivnost:**

6 znanstvenih radova; 23 kongresna priopćenje

**Publikacije:**

1. Curic G, Gasic V, Pluzaric V, Smiljcic D. Genetic parameters of five new European Standard Set STR loci (D10S1248, D22S1045, D2S441, D1S1656, D12S391) in the population of eastern Croatia. Croat Med J. 2012 Oct;53(5):409-15.

2. Polić MV, Miskulin M, Solić K, Plužarić V, Sikora M, Atalić B. Imbalanced concentrations of serum lipids and lichen planus. *Coll Antropol.* 2014 Jun;38(2):595-9.
3. Polić MV, Plužarić V, Kuric I. Syphilitic hepatitis: rare or just unrecognized? *Acta Dermatovenerol Croat.* 2015;23(1):70-1.
4. Milić J, Škrlec I, Milić Vranješ I, Jakab J, Plužarić V, Heffer M. Importance of the big-five in the future medical specialty preference. *BMC Med Educ.* 2020 Jul 22;20(1):234.
5. Tolušić Levak M., Plužarić V., Krajina, I., Šola, M., Tokić, S., Delaš Aždajić, M., Brajčić, H., Muršić, I., Šitum, M. & Mihalj, M. Serum Levels of Homocysteine in Young Psoriasis Patients Naïve for Conventional Systemic and Biologic Therapy. *Rad Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti. Medicinske znanosti.* 2020; 543 (50-51); 17-24.
6. Plužarić V, Štefanić M, Mihalj M, Tolušić Levak M, Muršić I, Glavaš-Obrovac L, Petrek M, Balogh P, Tokić S. Differential Skewing of Circulating MR1-Restricted and  $\gamma\delta$  T Cells in Human Psoriasis Vulgaris. *Front Immunol.* 2020 Dec 3; 11:572924.

#### **Kongresna priopćenja :**

1. Plužarić V, Gašić V. Recurrent aphthous ulcers and polymorphism in corticotrophin releasing hormone receptor 1. 7th ISABS Conference in Forensic, Anthropologic and Medical Genetics and Mayo Clinic Lectures in Translational Medicine. 2011 June 20-24; Bol, Island of Brač, Croatia. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
2. Muršić I, Grgić M, Šustić N, Jukić Z, Plužarić V. Psychological approach to adolescent patients with dismorfofobia, 3. Hrvatski kongres psihodermatologije. 2012 Octobar 4-7; Split, Croatia. (domaća recenzija, sažetak, stručni)
3. Muršić I, Kuric I, Šustić N, Plužarić V, Biljan D. Pyoderma ulcerosa serpigiosa, case report. 5th Congress of Croatian Dermatologists with International Participation. 2014 May 8-11; Zagreb, Croatia. (međunarodna recenzija, sažetak, stručni)
4. Rnjak D, Plužarić V, Romić Z, Vrselja Z, Čurić G. Role of corticotropin-releasing hormone receptor 1 gene polymorphism in suicide victims. 9th ISABS Conference in Forensic, Anthropologic and Medical Genetics and Mayo Clinic Lectures in Translational Medicine. 2015 June 22-26; Bol, Island of Brač, Croatia. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
5. Muršić I, Šustić N, Vinaj M, Tolušić Levak M, Plužarić V. Commercials for cosmetic products for women in magazine *Ženski list* from year 1935.do 1938. godine. 4. hrvatski

- kongres psihodermatologije s međunarodnim sudjelovanjem. 2016 June 10-12; Zagreb, Croatia. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, stručni)
6. Muršić I, Marjanović K, Šustić N, Kuric I, Plužarić V, Tolušić Levak M. Dermatofibrosarcoma protuberans – a case report. 3rd Regional Congress of Dermatology & Venereology. 2016 September 8 – 11. Mostar, Bosnia and Herzegovina. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, stručni)
  7. Vekić Mužević M, Plužarić V, Šustić N, Muršić I, Šola M. Lupus tumidus-case report and review of the literature. International Society of Dermatology Regional Meeting; 2017 February 2-5; Dubrovnik, Croatia. (međunarodna recenzija, sažetak, stručni)
  8. Mursić I, Mursić D, Šola M, Vekić Mužević M, Pluzarić V. Propolis – prirodni lijekovi i vrlo potentan allergen. 1st Croatian Congress of Dermatopharmacy with International Participation; 2018 March 23-24; Zagreb, Croatia. (međunarodna recenzija, sažetak, stručni)
  9. Šola M, Pluzarić V, Vekić Mužević V. Use of benzathine benzylpenicillin in treatment of delayed breast cellulitis after breast-conservation cancer therapy. *Int J Womens Dermatol.* 2018 Dec 1;4(4):240–1. (međunarodna recenzija, sažetak, stručni)
  10. Plužarić V, Mihalj M, Tolušić Levak M, Šola M, Kovačević T, Vekić Mužević M. Roaccutane – when everything is not straightfoward – a case report. 6. kongres hrvatskih dermatovenerologa. 2018 October 4-7; Pula, Croatia. (poster, domaća recenzija, sažetak, stručni)
  11. Muršić I, Kovačević T, Biljan D, Plužarić V, Vekić Mužević M. Zosteriform lichen planus after herpes zoster: a case report, 6. kongres hrvatskih dermatovenerologa, 2018 October 4-7; Pula, Croatia. (poster, domaća recenzija, sažetak, stručni)
  12. Šola M, Pluzarić V, Biljan D, Kovačević T, Krajina I, Kuric I. Differential diagnosis of scalp lesions-are skin scalp lesions often misdiagnosed, 6. kongres hrvatskih dermatovenerologa. 2018 October 4-7; Pula, Croatia. (poster, domaća recenzija, sažetak, stručni)
  13. Tolušić Levak M, Mihalj M, Lovrić I, Plužarić V, Pauzar B, Bijelić N, Belovari T, Baus Lončar M, Horvat S, Mursić I. Localization of trefoil factor family protein 3 (TFF3) in the healthy human skin. 6. kongres hrvatskih dermatovenerologa, 2018 October 4-7; Pula, Croatia. (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni)
  14. Šola M, Plužarić M, Biljan D, Vekić Mužević M, Muršić I. Use of rituximab in a case of very severe pemphigus vulgaris resistant to all conventional therapy. 6. kongres

- hrvatskih dermatovenerologa. 2018 October 4-7; Pula, Croatia. (domaća recenzija, sažetak, stručni).
15. Sola M, Pluzaric V, Vekic Muzevic M. Successful Treatment of alopecia totalis in a teenager \_ case report. 24 th World Congress of Dermatology 2019 Milan, Italy (poster, međunarodna recenzija, sažetak, stručni)
  16. Sola M, Pluzaric V. Extremely severe pemphigus vulgaris – case report of a stolen life. 28 th EADV Congress 2019 October 9 – 13 Madrid, Spain (poster, međunarodna recenzija, sažetak, stručni)
  17. Mihalj M, Drenjenčević I, Stupin A, Perić L, Šola M, Plužarić V, Matijević T, Muršić, I. (2019) The potential of utilizing laser doppler flowmetry and serum levels of homocysteine for the assessment of cardiovascular risk in psoriasis patients. 92nd Hungarian Dermatological Society Congress and XVIII. Dermatology. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
  18. Šola M, Perić L, Stupin A, Krajina I, Muršić I, Tolušić Levak M, Plužarić V, Vekić Mužević M, Biljan D, Drenjančević I, Mihalj M. (2019) Vasodilatation in skin microcirculation of psoriasis patients receiving TNF-alpha-blocking therapy. U: 92nd Hungarian Dermatological Society Congress and XVIII. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
  19. Tokić S, Plužarić V, Mihalj M, Štefanić M, Balogh P, Petrek M, Glavaš-Obrovac Lj. Phenotyping and functional role of MAIT and  $\gamma\delta$ T peripheral blood lymphocytes in the development and progression of psoriasis vulgaris. Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology. “Crossroads in Life Sciences”, 2019 Lovran Croatia (međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
  20. Plužarić V, Štefanić M, Mihalj M, Balog P, Kocourkova L, Petrek M, Glavaš-Obrovac Lj, Radanović Šuk D, Tokić S. Transcriptional profiling of  $\gamma\delta$ T cells in peripheral blood of psoriasis vulgaris patients. 14th East-West Immunogenetics Conference (EWIC). 2020 Budapest, Hungary (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
  21. Herak P, Grgić Z, Čosić D, Plužarić V, Mihalj M, Štefanić M, Tokić S. Immunophenotyping of CD3+CD4+ and CD3+CD8+ peripheral blood lymphocytes in psoriasis vulgaris. 5th International Cholnoky Symposium 2019. Pecs, Hungary. (međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
  22. Tokić S, Štefanić M, Plužarić V, Mihalj M, Balogh P, Petrek M, Glavaš-Obrovac Lj. Prirodne linije limfocita t u psorijazi: uvid u imunofenotip, transkriptom i repertoar t

- staničnog receptora . 18. Ružička Days. 2020. Hrvatska (međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
23. Milić Vranješ I, Plužarić V, Kadivnik M, Košuta Petrović M, Černohorski K. A case report of pregnancy complicated by decidual polyp and pemphigus vulgaris. 6 th edition Birth Congress, Virtual congress (clinical challenges in labor and delivery a virtual experience) 2020 October 1-2-3, Valencia, Spain (poster, međunarodna recenzija, sažetak, stručni)

### **Znanstveno i stručno usavršavanje**

**Rujan 2020.** – Edukacija o radu na MiniSeq sekvenceru sljedeće generacije proizvođača Illuminia, Inc

**Veljača 2019.** – NIDA Clinical Trials Network GCP (Good Clinical Practice) training. Berlin. Njemačka

**Studeni 2018.** – Tečaj protočne citometrije; Medicinski fakultet u Osijeku. Hrvatska

**Studeni 2016.** – Tečaj trajne medicinske izobrazbe prve kategorije PDN Course of Continuing Medical Training of 1st Class "Emergency Dermatovenrology", Zagreb. Hrvatska.

**Rujan 2016.** – Genodermatoses & Rare Skin Disorders Network- Genodermatoses network training session; Zagreb. Hrvatska.

**Listopad-Studeni 2013.** – Online course in scientific writing; Stanford online

**Lipanj 2013.** – Tečaj. Uvod u dermatoskopiju. Klinika za kožne i spolne bolesti. KBC Sestre milosrdnice. Zagreb. Hrvatska

### **Ostale znanstvene i stručne aktivnosti:**

**Travanj 2019.** Festival zannosti Medicinski fakultet u Osijeku. Koža kao semafor. autori: Maja Tolušić Levak, Ivana Lovrić, Vera Plužarić i Igor Kuric. Osijek. Hrvatska

**Svibanj 2019.** 1. Pecs - Osijek PhD symposium “Phenotyping and functional role of MAIT and peripheral blood lymphocytes in the development and progression of psoriasis vulgaris” Vera Pluzaric (oralna prezentacija)

**Ožujak 2021.** Sudjelovanje u Debati „Cijepiti se ili ne?“ protiv HPV-a u organizaciji Međunarodne udruge studenata medicine Hrvatska, CroMSIC produžnica Osijek

