

Analiza perifernih CD3+CD4+ limfocita T u oboljelih od vulgarne psorijaze.

Herek, Paula

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:391141>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-22**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

Paula Herek

**ANALIZA PERIFERNIH CD3+CD4+
LIMFOCITA T U OBOLJELIH OD
VULGARNE PSORIJAZE**

Završni rad

Osijek, 2019.

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKE DIJAGNOSTIKE**

Paula Herek

**ANALIZA PERIFERNIH CD3+CD4+
LIMFOCITA T U OBOLJELIH OD
VULGARNE PSORIJAZE**

Završni rad

Osijek, 2019.

Rad je ostvaren u Laboratoriju za analizu DNA pri Katedri za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju Medicinskog fakulteta Osijek.

Mentor rada: doc.dr.sc. Stana Tokić

Rad ima 36 listova, 1 tablicu i 5 slika.

Zahvaljujem svojoj mentorici, doc.dr.sc. Stani Tokić, na neopisivom trudu, uloženom vremenu, stručnoj pomoći i savjetovanju kroz cijeli proces pisanja završnog rada.

Zahvaljujem Ivani Jelavić, univ.bacc.med.lab.dijagn. na velikoj pomoći i strpljenju pri izvođenju praktičnog dijela završnog rada.

Posebno zahvaljujem članovima svoje obitelji, bez kojih ništa ne bi bilo moguće, koji su mi bili potpora na svakom koraku moga obrazovanja, koji su vjerovali u mene i onda kada nitko drugi nije.

SADRŽAJ

| | |
|--|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Vulgarna Psorijaza..... | 1 |
| 1.2. Incidencija i epidemiologija..... | 2 |
| 1.2.1. Studije obitelji | 3 |
| 1.2.2. Studije blizanaca..... | 3 |
| 1.3. Uloga genetičkih čimbenika..... | 4 |
| 1.4. Uloga okolišnih čimbenika | 4 |
| 1.4.1. Fizička trauma | 5 |
| 1.4.2. Lijekovi kao okidač | 5 |
| 1.4.3. Infekcije | 5 |
| 1.4.4. Stres | 6 |
| 1.4.5. Alkohol i pušenje..... | 6 |
| 1.4.6. Pretilost | 7 |
| 1.5. Patogeneza Vulgarne Psorijaze | 7 |
| 1.5.1. Prezentacija antigena | 9 |
| 1.5.2. Aktivacija CD4+ T-stanica | 10 |
| 1.5.3. Subpopulacije T-stanica | 10 |
| 1.5.4. Uloga CD4+ T limfocita psorijazi | 11 |
| 2. HIPOTEZA..... | 13 |
| 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA | 14 |
| 4. MATERIJALI I METODE..... | 15 |
| 4.1. Materijali..... | 15 |
| 4.1.1. Ispitanici | 15 |
| 4.1.2. Upotrijebljene kemikalije..... | 15 |
| 4.2. Metode | 16 |
| 4.2.1. Izolacija ukupnih leukocita | 16 |
| 4.2.2. Bojanje vijabilnih stanica pomoću komercijalnog kompleta LIVE/DEAD™ Fixable Dead Cell Stain Kits | 17 |
| 4.2.3. Blok Fc receptora na stanicama za inhibiciju nespecifičnog vezanja protutijela primjenom Human TruStain FcX™..... | 18 |
| 4.2.4. Bojanje stanica fluorescentno obilježenim monoklonalnim protutijelima i analiza na protočnom citometru | 18 |

| | |
|--|----|
| 4.2.5. Statistička analiza rezultata | 18 |
| 5. REZULTATI | 20 |
| 5.1. Klinička i demografska obilježja ispitanika..... | 20 |
| 5.2. Periferni udjeli CD4+ limfocita T u PV i CTRL ispitanika..... | 21 |
| 5.3. Korelacijska analiza..... | 24 |
| 6. RASPRAVA | 25 |
| 7. ZAKLJUČAK..... | 28 |
| 8. SAŽETAK | 29 |
| 9. SUMMARY | 30 |
| 10. LITERATURA..... | 31 |
| 11. ŽIVOTOPIS..... | 36 |

POPIS KRATICA

APCs – prema engl. *antigen presenting cells*, antigen prezentirajuće stanice

BMI – prema engl. *body mass index*, indeks tjelesne mase

BSA – prema engl. *bovine serum albumin*, goveđi serumski albumin

CCR4 – prema engl. *C-C chemokine receptor 4*, C-C kemokinski receptor 4

CD – prema engl. *cluster of differentiation*, klaster diferencijacije

CRH – kortikotropin-oslobađajući hormon

CTRL – kontrolna skupina

DC – prema engl. *dendritic cells*, dendritičke stanice

DLQI – prema engl. *Dermatology Life Quality Index*, indeks kvalitete života

DMSO – dimetil sulfoksid

FBS – prema engl. *fetal bovine serum*, fetalni goveđi serum

FITC – prema engl. *fluorescein isothiocyanate*, fluorescein izotiocijanat

Foxp3 – prema engl. *forkhead box p3*

HLA – prema engl. *human leukocyte antigen*, ljudski leukocitni antigen

HSP – prema engl. *heat shock proteins*

IFN – interferon

IL – interleukin

IQR – interkvartilni raspon

K17 – keratin 17

MHC – prema engl. *major- histocompatibility-complex*, glavni kompleks molekula tkivne podudarnosti

NK – prema engl. *natural killer cells*, prirodno ubilačke stanice

PAMP – prema engl. *pathogen-associated molecular patterns*, molekularni uzorci povezani s patogenima

PASI – prema engl. *Psoriasis Area and Severity Index*,

PBMC – prema engl. *peripheral blood mononuclear cell*, mononuklearna stanica periferne krvi

PBS – prema engl. *phosphate buffered saline*, fiziološka otopina puferirana fosfatom

PRR – prema engl. *pathogen recognition receptors*, receptori prepoznavanja patogena

PV – Psoriasis vulgaris

Tc – limfociti T

TCR – prema engl. *T-cell receptor*, receptor T-stanica

TGF – prema engl. *transforming growth factor*, transformirajući čimbenik rasta

Th – prema engl. *T helper*, pomoćnički T limfocit

TLR – prema engl. *Toll like receptor*, Toll-u sličan receptor

TNF – prema engl. *tumor necrosis factor*, faktor nekroze tumora

Treg – T regulatorni limfociti

1.UVOD

1.1. Vulgarna Psorijaza

Psorijaza je kronična, imunološki posredovana upalna bolest kože koja zahvaća 2-3% svjetske populacije (1). Vulgarna psorijaza je najučestaliji oblik bolesti koji pogađa 85 do 90% oboljelih od psorijaze (2).

Bolest obilježavaju dobro ograničeni, eritematozni, ljuskavi, izdignuti plakovi. Lezije variraju u veličini – od malenih točkastih papula do velikih plakova koji se simetrično raspoređuju na koži tjemena, laktova, koljena i lumbalnog dijela leđa. Ispod lezija vidljivo je točkasto krvarenje (Auspitzov znak) koje je znak proširenih kapilara ispod epidermisa i stanjenog suprapapilarnog sloja. Klinička manifestacija bolesti razlikuje se među pacijentima te se slika može brzo mijenjati čak i kod istog pacijenta (3).



Slika 1. Psorijaza: epidemiologija, klinička obilježja i kvaliteta života. Ann Rheum Dis. 2005 Mar;64(Suppl 2):ii18-ii23.

Osim fizičkih obilježja, psorijaza ima izražen emotivni i psihosocijalni učinak na pacijente. Može rezultirati stigmatizacijom, smanjenim samopouzdanjem, povećanim stresom te negativno djelovati na razvoj socijalnih i komunikativnih vještina oboljelih (4).

Prema anketi Nacionalne zaklade za psorijazu (National Psoriasis Foundation), gotovo 75% pacijenata vjeruje da bolest ima negativan utjecaj na kvalitetu njihova života. Njih 20% razmišljalo je o samoubojstvu, a na radnim mjestima, oboljeli se osjećaju stigmatizirano, što značajno utječe na njihovu radnu učinkovitost i gubitak samopouzdanja. Preko 60% oboljelih odsutno je s posla u prosjeku 26 dana godišnje.

Oboljeli od PV često imaju problema sa slikom o sebi, osjećaju se posramljeno, stigmatizirano i neugodno u vlastitoj koži. Istraživanja su ustanovila vezu između psorijaze i depresije. Oboljeli su često depresivni, a ozbiljnost psihičkih bolesti povezana je s dobi, obrazovanjem i težinom oboljenja. Mnogi pacijenti imaju socijalne i psihološke poteškoće uzrokovane situacijama u kojima je nemoguće sakriti oboljelu kožu – na bazenima, u osobnim vezama ili u uvjetima gdje im nije omogućena potpuna privatnost (5).

1.2 Incidencija i epidemiologija

Psorijaza je vjerojatno stara kao i čovječanstvo. Priča o psorijazi počela je još u antičkim vremenima kada se nije razlikovalo psorijazu od lepre, kao ni od drugih upalnih bolesti kože (6). Danas je psorijaza dobro klinički definirana, lako se dijagnosticira, a poznati su i brojni genetički, okolišni i imunološki čimbenici koji sudjeluju u etiologiji i patogenezi oboljenja. Unatoč značajnoj učestalosti i karakterističnim simptomima teško je pronaći opis psorijaze u zapisima starih liječnika. Dermatologija se razvijala sporo, a sve do prošlog stoljeća opisi bolesti bili su nejasni, nomenklatura nestandardizirana, prijevodi nepouzdana i neprecizni. Histopatološki opis koji je usvojen u 1960-ima i 1970-ima dao je prvi uvid u patofiziologiju psorijaze, ali su mnogi aspekti bolesti još dugo ostali nerazjašnjeni (7).

Psorijaza se može pojaviti u bilo kojoj životnoj dobi – neki pacijenti se rode s njom, a kod nekih se pak pojavljuje u zrelijoj životnoj dobi. Precizno određivanje dobi u kojoj se psorijaza najčešće pojavljuje je problematično jer se istraživanja temelje na samoprocjeni oboljelih ispitanika ili se oslanjaju na datum kada je bolest prvi puta dijagnosticirana. Podaci utemeljeni na

sjećanju pacijenta mogu biti netočni; određivanje početka psorijaze od strane liječnika može podcijeniti vrijeme nastanka bolesti jer minimalna bolest može biti prisutna i godinama prije prve dijagnoze. Bimodalna dob pojavljivanja prve slike psorijaze zabilježena je u nekoliko istraživanja. Prvi vrhunac pojavljivanja je između petnaeste i dvadesete godine života, dok je drugi vrhunac uočen između 55. i 60. godine (8). Prevalencija je nešto češća u muškaraca, osim u šestom desetljeću života što ukazuje na moguću ulogu spolnih hormona u razvoju psorijaze (9).

Prevalencija psorijaze u Europi razlikuje se ovisno o geografskoj širini i dužini, a može iznositi od 0,6% pa sve do 6,5%. U Sjedinjenim Američkim Državama procjenjuje se da od psorijaze boluje 3,15% stanovništva. Prevalencija u Africi također ovisi o geografskim obilježjima, a najniža je zabilježena na zapadu kontinenta. U Kini i Japanu prevalencija je niža nego u SAD-u i Europi, a potpuno je odsutna u nekim regijama Južne Amerike i Australije. Genetička epidemiološka istraživanja pokazala su da psorijaza ima i genetičku komponentu. Naj snažnija genetička poveznica s razvojem bolesti je HLA-Cw*06 (engl. *Human Leukocyte Antigen*). Također, potvrđena je povezanost i s mnogim drugim genima, uključujući IL-12B (interleukin-12B) i IL-23R (10).

1.2.1. Studije obitelji

Obiteljske studije podupiru teoriju o genetičkoj podlozi bolesti. Prema dvama istraživanjima, dijete kojemu su oba roditelja oboljela, ima 50% šanse oboljeti u nekom trenutku života. Ta se šansa smanjuje na 16% ako je zahvaćen samo jedan roditelj. Ako je dijete oboljelo, a oba roditelja su zdrava, brat ili sestra oboljelog djeteta imaju 8% šanse razviti bolest. Na temelju istraživanja procijenjeno je da otprilike jedna trećina pacijenata oboljelih od psorijaze ima barem jednog oboljelog člana obitelji (11).

1.2.2. Studije blizanaca

Na važnu ulogu podložnih genetičkih čimbenika u razvoju psorijaze ukazuju i rezultati istraživanja provedenih među monozigotnim i dizigotnim blizancima. Incidencija psorijaze među monozigotnim blizancima iznosi između 35% i 72%, dok je među dizigotnim nešto manja, od 15%

do 23%. Zanimljivo je naglasiti da monozigotni blizanci dijele slične kliničke simptome, težinu i vrijeme pojavnosti oboljenja (11).

1.3. Uloga genetičkih čimbenika

Do danas su okarakterizirana dva osnovna oblika psorijaze, tip I i tip II. Istraživači Christophers i Henseler prvi su uočili bimodalnu raspodjelu psorijaze usporedbom obilježja i pojavnosti simptoma na uzorku 2147 oboljelih ispitanika (11). Prvi tip psorijaze pojavljuje se prije četrdesete godine života, dok se drugi tip bolesti javlja u kasnijoj životnoj dobi. Psorijaza tipa I zabilježena je u više od 75% slučajeva vulgarne psorijaze (8). Promatranjem ova dva tipa bolesti, Christophers i Henseler uočili su da se psorijaza tipa I često nasljeđuje unutar obitelji, da ima ozbiljniji tijek te da je povezana sa specifičnim varijantama antigena tkivne podudarnosti tj. HLA-Cw6, HLA-B13 i HLA-B7 (11). Navedeni HLA antigeni kodirani su genima koji čine dio 6p21 kromosomskog lokusa na kojem se nalaze geni glavnog kompleksa molekula tkivne podudarnosti, tzv. MHC (engl. *major-histocompatibility-complex*) kompleks. Radi značajne zastupljenosti u većini oboljelih ispitanika ovaj je kromosomski lokus identificiran kao najrizičnija genetička komponenta (PSOR1) u razvoju psorijaze. Osim navedenog, zabilježena je povezanost bolesti i s drugim lokusima, preciznije PSORS7 na kratkom, i PSORS4 na dugom kraku kromosoma 1, PSORS5 na kromosomu 3q, PSORS3 na 4q, PSORS2 na 17q i PSORS6 na 19p kromosomu. Koja je važnost i funkcionalna uloga navedenih rizičnih lokusa u razvoju psorijaze još nije u potpunosti razjašnjeno (8). Poznato je međutim, da niti jedan od navedenih genetičkih čimbenika ne predstavlja apsolutnu indikaciju za razvoj bolesti, što ukazuje na složenu prirodu psorijaze čijim razvojem osim podložnih genetičkih lokusa upravljaju i rizični okolišni čimbenici.

1.4. Uloga okolišnih čimbenika

Najznačajniji okolišni čimbenici koji se povezuju s razvojem PV su trauma, stres, pretjerana konzumacija alkohola, pušenje, neki lijekovi i prekomjerna tjelesna težina (11).

1.4.1. Fizička trauma

Heinrich Koebner 1872. prvi je opisao traumu kao okidač i rizični čimbenik psorijaze (12). Koebner je proučavao razvoj psorijatičnih lezija nakon kožnih ozljeda poput opekline, tetovaža te ugriza životinja, na prethodno zdravoj i normalnoj koži. Novonastale psorijatične lezije nastale na mjestu ozljede nazivaju se izomornim odgovorom ili "Koebnerovim" odgovorom. U psorijatičnih pacijenata, Koebnerov odgovor ima prevalenciju od 24% do 51% (13). Da bi se psorijaza nakon ozljede kože razvila, može proći od 3 dana do 2 godine, ovisno o godišnjem dobu i ozbiljnosti bolesti (14, 15). Veća je vjerojatnost da će se psorijaza razviti zimi zbog manjeg izlaganja suncu te, posljedično, zbog manje koncentracije vitamina D₃ u organizmu. Naime, vitamin D₃ regulira diferencijaciju kerationocita, ima utjecaj na imunološke funkcije dendritičkih (engl. *dendritic cells*, DC) i T stanica, inhibira proizvodnju IL-2 i IL-6, blokira transkripciju INF- γ te inhibira aktivnost prirodno ubilačkih (engl. *natural killer*, NK) stanica i citotoksičnih limfocita T. Zbog svog mehanizma djelovanja, često se upotrebljava kao jedan oblik terapije u liječenju vulgarne psorijaze (16).

1.4.2. Lijekovi kao okidač

Nekoliko je lijekova povezano s nastankom psorijaze. Najčešće zabilježeni okidači su litij, beta-blokatori, anti-malarijski lijekovi, tetraciklini i nesteroidni protuupalni lijekovi. Posljednjih nekoliko godina također je zabilježen rizični učinak blokatora TNF α (engl. *Tumor Necrosis Factor* – α) i lijekova protiv interferona (alfa, beta, gama) (17, 18).

1.4.3. Infekcije

Nekoliko istraživanja ukazalo je na važnu ulogu infekcije u razvoju psorijaze, posebice kod djece. Infekcija bakterijom *Streptococcus pyogenes* povezana je s nastankom kapljičaste psorijaze (Guttate psoriasis) (19, 20).

Streptokokna upala grla također se povezuje s pojavom i dužinom trajanja psorijaze, jednako kao i infekcije uzrokovane drugim bakterijama i gljivama, poput *Staphylococcus aureus*,

Candida albicans i *Malassezia furfur*. Smatra se da egzotoksini i peptidoglikani ovih mikroorganizama uzrokuju aktivaciju T-stanica i razvoj upalnog odgovora, koji u uvjetima rizične genetičke podloge posljedično može dovesti do razvoja psorijaze (21).

1.4.4. Stres

Emocionalni ili psihološki stres nerijetko se susreću kod bolesnika s PV. Jedno je istraživanje pokazalo da postoji značajna povezanost između dugotrajne izloženosti stresu i nastanka bolesti. Uzrok tome moguća je povezanost stresa s povećanom aktivacijom imunološkog sustava, migracijom i udomljavanjem dendritičkih stanica u limfnim čvorovima koje zatim uvijek iznova alarmiraju antigen-specifične limfocite T (11). Fiziološki stres organizma mijenja imunološki sustav i može dovesti do nastanka psorijaze. Nekoliko je istraživanja pokazalo da povišenje razina stres hormona kao posljedica dugotrajne aktivacije na relaciji hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda može uzrokovati pojavu bolesti (22).

Kortikotropin-oslobađajući hormon (CRH) središnja je sastavnica te osi te je važan u održavanju sistemskog odgovora na stres, kao i u modulaciji upalnog odgovora. Zanimljivo, u oboljelih od psorijaze, zabilježena je povećana ekspresija CRH receptora u koži (23).

Iako proupalna uloga CRH u koži nije do kraja razjašnjena, pretpostavlja se da CRH potiče okolne keratinocite na proizvodnju interleukina 6 (IL-6) i interleukina 11 (IL-11), ključnih upalnih medijatora u razvoju psorijatičnih lezija (24).

1.4.5. Alkohol i pušenje

Utjecaj alkohola na razvoj psorijaze još je uvijek kontroverzna i složena tema. Rezultati novijih istraživanja pokazali su da je konzumacija alkohola povezana s povećanim rizikom za nastanak psorijaze. Također, povećana je prevalencija psorijaze kod pacijenata koji konzumiraju alkohol. Epidemiološka istraživanja pokazala su da umjerenu i ozbiljnu psorijazu češće imaju pacijenti koji također boluju od alkoholizma (25).

Potencijalni funkcionalni učinci alkohola vezani su uz nespecifičnu aktivaciju T limfocita i hiperproliferaciju keratinocita u kojih 0,05% etanol inducira proizvodnju $TGF\alpha$ (engl. *Transforming growth factor – α , $TGF\alpha$*), IL-6, i IFN α (interferon – α) (26).

Istraživanja također potvrđuju vezu između pušenja i povećanog rizika nastanka psorijaze. Jedno takvo istraživanje ukazuje na veći rizik u žena pušača, dok drugo opisuje povećani rizik u trenutnih i bivših pušača, neovisno o spolu (27, 28).

1.4.6. Pretilost

Iako mehanizam kojim pretilost doprinosi razvoju psorijaze nije poznat, pretpostavlja se da su uključeni rezistin i leptin, citokini izvedeni iz adipocita. Prethodne publikacije pokazale su povezanost između povišene koncentracije ovih adipokina i psorijatičnog fenotipa, potencijalno kao posljedica adipokinima potaknute proizvodnje upalnih citokina IL-8, TNF α i IL-1 β od strane okolnih monocita (29, 30).

Nasuprot tome, nagli gubitak težine također uzrokuje pogoršanje simptoma, naglašavajući važnu, ali još uvijek nerazjašnjenu ulogu metaboličkih promjena u razvoju psorijaze (31, 32).

1.5 Patogeneza Vulgarne Psorijaze

Patogeneza psorijaze je složena i nedovoljno razjašnjena, ali je poznato da se bolest razvija kao posljedica upalnog imunološkog odgovora posredovanog djelovanjem stanica prirođene i stečene imunosti. Glavnu ulogu imaju T-stanice koje infiltriraju epidermis kože i uzrokuju nastanak karakterističnih kožnih promjena (33).

Fizička trauma papilarnog sloja dermisa jedan je od uzroka nastanka bolesti zbog koje dolazi do aktivacije mnogih upalnih puteva u organizmu (Koebnerov izomorfni odgovor). Također je poznato da, bakterijske infekcije, poput streptokokne upale grla, mogu uzrokovati pretjeran imunološki odgovor kod predisponiranih pojedinaca te usmjeriti odgovor prirođene imunosti prema odgovoru stečene imunosti (34).

Odgovor prirodene imunosti predstavlja prvu crtu obrane u infekcijama detektirajući različite, organizmu strane patogene. Stanicama prirodene imunosti pripadaju makrofagi, dendritičke stanice, monociti, neutrofil, mastociti, prirodnoubilačke stanice. Te stanice privlače leukocite na mjesto upale pomoću sekrecije proupalnih citokina i kemokina. Prirođen imunološki odgovor ima ulogu i u inicijaciji i usmjerenju stečenog imunološkog odgovora. Stanice prirodene imunosti prepoznaju infekciju pomoću posebnih receptora, receptora za prepoznavanje patogena (engl. *pathogen recognition receptors, PRRs*). Svi PRR imaju visoku sposobnost prepoznavanja molekularnih uzoraka povezanih s patogenima (engl. *pathogen-associated molecular patterns, PAMPs*). Neki od njih su komponente bakterijskog staničnog zida, nukleinske kiseline virusa, flagelarni proteini. Toll-u slični receptori (engl. *Toll like receptors, TLR*) najpoznatiji su PRR koji se nalaze na mnogim imunološkim stanicama, uključujući dendritičke stanice, makrofage, T i B limfocite.

Osim uloge klasičnih prirodnih i adaptivnih linija u razvoju psorijaze, noviji radovi ukazuju na potencijalno važnu ulogu limfoidnih linija koje pokazuju obilježja prirodnog imunološkog odgovora, poput invarijantnih NKT (35) (od engl. *natural killer T*) i $\gamma\delta$ T limfocita (36) te sluznicama pridruženih invarijantnih T ili MAIT (od engl. *mucosa associated invariant T*) stanica (37). Ove limfoidne loze nalik prirodnim stanicama prepoznaju nepeptidne mikrobne antigene u kompleksu s neklasičnim MHC molekulama poput CD1d, CD1c ili MR1 (od engl. *MHC related molecule 1*) i posreduju brze efektorske učinke izlučivanjem upalnih citokina (INF- γ , TNF- α , IL-17, IL-22), enzima i medijatora (perforini, granzimi) upale. Poput adaptivnih staničnih linija, ove stanice izražavaju T stanične receptore, ali prepoznaju ograničeni repertoar bakterijskih, virusnih i gljivičnih antigena. S druge strane, u uvjetima upalnog okoliša, slično prirodnim linijama, mogu posredovati TCR-neovisne citotoksične učinke. Radi fenotipskog i funkcijskog profila predstavljaju most između prirodene i adaptivne imunosti i stoga, potencijalno važne terapijske mete u psorijazi (38).

Nekontrolirana aktivacija prirodnih stanica i limfocita nalik prirodnim stanicama u koži je potencijalno važan korak u inicijaciji psorijaze. Pri tome, aktivacija PRR uslijed infekcije ili ozljede tkiva rezultira proizvodnjom proupalnih citokina i ekspresijom kostimulacijskih molekula na antigen prezentirajućim stanicama (APC, od engl. *antigen presenting cells*). Nadalje, u koži oboljelih pronađena je povišena je ekspresija HSP (engl. *heat shock proteins*) i njihovih liganda.

HSP se mogu ponašati kao endogeni PAMP i tako aktivirati TLR. Tako potiču sazrijevanje dendritičkih stanica, prezentaciju antigena na APC i izlučivanje citokina.

Spomenute dendritičke stanice imaju visoku sposobnost privlačenja perifernih T limfocita. Mogu detektirati različite patogene ekspresijom različitih PRR, ali isto tako i detektirati upalne medijatore poput citokina i HSP tijekom upalnih procesa. Putuju u limfne čvorove gdje sazrijevaju i kao takve pokazuju visoku ekspresiju MHC II molekula. Dendritičke stanice imaju središnju ulogu u aktivaciji stečenog imunološkog odgovora proizvodeći citokine koji utječu na razvoj subpopulacija Th stanica u koži (39). Nastali upalni uvjeti u koži pospješuju aktivaciju okolnih keratinocita te izlučivanje antimikrobnih peptida, adhezijskih molekula i kemokinskih liganada za udomljavanje neutrofila i limfocita periferne krvi. Dolazi do nekontrolirane proliferacije epitela, pojačane angiogeneze i širenja lokalne upale.

Psorijatične lezije razvijaju se dakle, kao posljedica hiperproliferacije nediferenciranih keratinocita u gornjem, epitelnom sloju kože i tkivne infiltracije imunskih stanica u donjim, dermalnim dijelovima kože. Razvoj i progresiju bolesti nadalje, posreduju stanice adaptivnog imunološkog odgovora, posebice specijalizirane efektorske linije limfocita T koje izlučuju upalne citokine poput interleukina(IL)-17, IL-22, IL-12, IFN γ i TNF α (40).

1.5.1. Prezentacija antigena

Početni korak specifičnog imunološkog odgovora započinje prezentacijom stranog antigena u kompleksu s MHC II molekulama koje na svojoj površini izražavaju profesionalne predočne stanice poput makrofaga i dendritičkih stanica. Aktivirane dendritičke stanice migriraju do sekundarnih limfoidnih organa gdje stupaju u kontakt s pomoćničkim T limfocitima. Ovisno o porijeklu i aminokiselinskom sastavu prezentiranih antigena dolazi do aktivacije specifičnih limfocitnih jedinki koje nakon aktivacije klonalno proliferiraju (41). Prilikom aktivacije limfocita T, koreceptorske molekule CD4 (engl. *Cluster of differentiation 4*) i CD8 prepoznaju invarijantne dijelove peptidnih lanaca MHC/HLA molekula na površini antigen predočnih stanica i na taj način učvršćuju vezu ostvarenu između T staničnog receptora (TCR) i antigen-MHC kompleksa. Koreceptorske molekule CD4 i CD8 izražavaju limfociti T- $\alpha\beta$, među kojima razlikujemo pomoćničke CD4⁺ i citotoksične CD8⁺ T limfocitne loze (42).

1.5.2. Aktivacija CD4+ T-stanica

Naivne T-stanice neprestano cirkuliraju između krvi i sekundarnih limfnih organa, limfnih čvorova, slezene i limfnog tkiva pridruženog sluznicama dišnog probavnog i spolno-mokraćnog sustava (MALT, prema eng. *mucosal-associated lymphoid tissue*). Naivne CD4+ stanice čiji T stanični receptor pokazuje dovoljno visok afinitet vezanja za specifični antigen/MHC II kompleks, stupit će u kontakt s predočnom stanicom i stvoriti takozvanu imunološku sinapsu. Za aktivaciju pomoćničkih limfocita T potrebna su tri signala: prvi nastaje vezanjem TCR (engl. *T-cell receptor*) i antigen/MHC II kompleksa, drugi nakon vezanja ko-stimulacijskih molekula (CD28, CD40L) i njihovih receptora na predočnoj stanici B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), CD40, a treći vezanjem topljivih upalnih medijatora, citokina i kemokina, za receptore na površini T limfocita (42, 43). Aktivacija CD4+ stanica pomoću antigen-prezentirajućih stanica vodi k razvoju različitih CD4+ T-staničnih linija, koje, ovisno o vrsti antigena i citokinskog mikrookoliša, diferenciraju u različite funkcijske subpopulacije poput efektorskih Th1 (engl. *T helper*), Th2, Th17 ili regulatornih Treg stanica.

1.5.3. Subpopulacije T-stanica

Razvoj pomoćničkih CD4+ Th1 stanica stimulira interleukin-12 (IL-12) koji vezanjem za IL-12 receptor (IL-12R) na površini aktiviranih CD4+ limfocita T potiče aktivaciju transkripcijskih čimbenika STAT4 i T-bet. Diferencijaciju Th1 stanice potpomaže upalni citokin interferon gama (IFN- γ) koji pospješuje ekspresiju gena koji kodira sintezu IL-12R (44). Aktivirane Th1 stanice proizvode IFN- γ , IL-22, IL-26, GM-CSF i TNF- β . U prisutnosti IL-4, Th1 stanice mogu diferencirati u Th2 stanice koje obilježava ekspresija transkripcijskih čimbenika STAT6 i GATA-3. Aktivirane Th2 stanice proizvode IL-4, IL-5 i IL-13.

Th17 stanice nastaju iz naivnih T-stanica u prisutnosti IL-6 i TGF- β (45, 46). One su zadužene za sekreciju IL-6, IL-17 i IL-22. Th1 inducirajući citokini, IL-12 i IFN- γ aktivno obustavljaju razvoj Th2 i Th17 stanica, a suprotno tome, Th2 inducirajući citokin, IL-4, inhibira razvoj Th1 i Th17 stanica (45, 46).

Regulatorne T-stanice, odgovorne su za utišavanje T-staničnog imunološkog odgovora te kontakt-ovisnim (vezanjem ko-inhibitorskih molekula i njihovih receptora na površini ciljnih stanica) i kontakt-neovisnim mehanizmima (ekspresijom imunosupresivnih citokina poput IL-10 i TGF- β) suprimiraju djelovanje efektorskih stanica. Treg limfociti čine manju populaciju pomoćničkih limfocita T (5-10%), a obilježava ih visoka ekspresija površinskog receptora CD25 i transkripcijskog čimbenika Foxp3 (engl. *Forkhead box p3*) te supresivna aktivnost u svrhu regulacije aktivnog imunološkog odgovora (41).

1.5.4 Uloga CD4+ T limfocita psorijazi

U psorijatičnim lezijama i perifernoj krvi oboljelih od psorijaze, nađen je povećan broj CD4+ Th1 limfocita i CD8+ citotoksičnih stanica tipa 1 (Tc1), kao i povišene vrijednosti IFN- γ , TNF- α i IL-12. (40). Novija istraživanja, međutim, ukazuju na ulogu drugih T limfocitnih populacija, posebice Th17 i Th22 stanica. U koži oboljelih zabilježena je povećana frekvencija Th17 limfocita kao i specifični upalni uvjeti koji pogoduju razvoju imunosnog odgovora tipa 17. (47). Naime, ekspresija upalnih citokina poput IL-17A, IL-17F, IL-22 i TNF- α , potiče okolne keratinocite na lučenje kemokinskih liganada (CCL20, CXCL1 i CXCL8) i adhezijskih molekula, koje, pak, pospješuju kemotaksiju i udomljavanje perifernih leukocita, proširenje lokalne upale i razvoj epitelne hiperplazije. Interleukin 17 (IL-17) stimulira ekspresiju keratina 17 (K17) na keratinocitima što je jedan od glavnih molekularnih pokazatelja psorijaze. Interferon γ (IFN- γ) također regulira ekspresiju keratina 17 indukcijom ekspresije transkripcijskog čimbenika STAT1. Moguće je da se K17 ponaša kao autoantigen koji prepoznaju autoreaktivni limfociti T. Određeni epitopi K17 molekula mogu utjecati na proliferaciju psorijatičnih T-stanica i potaknuti produkciju IFN- γ . Ovaj mehanizam pozitivne povratne sprege potencijalno pospješuje razvoj patološkog imunosnog odgovora u psorijazi.

Osim navedenih, u koži oboljelih od psorijaze zabilježen je, također, i povećani broj limfocita koji izlučuju interleukin-22 (IL-22), a na svojoj površini eksprimiraju kemokinske receptore CCR4 (engl. *C-C chemokine receptor 4*) i CCR6. To su tzv. Th22 stanice koje, za razliku od drugih subpopulacija T-stanica, dominantno proizvode IL-22 (48). Zbog ekspresije specifičnih kemokinskih receptora na svojoj površini, smatra se da Th22 limfociti migriraju i aktivno se udomljavaju u koži i zglobovima oboljelih od psorijaze. Uloga IL-22 u psorijazi povezana je i s

aktivacijom keratinocita kao i s nastankom epidermalne akantoze, morfološke karakteristike psorijaze. IL-22 upravlja funkcijom keratinocita na više načina. Pomaže u stvaranju biološke barijere kože tako što potiče stvaranje antimikrobnih proteina u keratinocitima, zaustavlja završnu diferencijaciju keratinocita, stimulira proizvodnju metaloproteinaza vezanih uz obnovu tkiva te pospješuje aktivaciju i funkciju neutrofila. Zajedno s ostalim citokinima, $\text{TNF}\alpha$, IL-17, IL-20 i IL-22 posreduju razvoj patološke kliničke slike u psorijazi (34).

2. HIPOTEZA

1. Broj CD3+CD4+ T-limfocita različit je u perifernoj krvi oboljelih ispitanika i zdravih kontrola.
2. Brojnost perifernih CD3+CD4+ T-limfocita ovisi o demografskim obilježjima ispitanika i težini oboljenja.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Analizirati i usporediti brojnost CD3+CD4+ T-limfocita u perifernoj krvi oboljelih ispitanika i zdravih kontrola.
2. Ustanoviti povezanost brojnosti perifernih CD3+CD4+ T-limfocita s demografskim obilježjima ispitanika i težinom oboljenja.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Materijali

4.1.1. Ispitanici

U svrhu istraživanja prikupljena je periferna krv 22 zdrave osobe (6 žena i 16 muškaraca, u dobi od 22 do 54 godine), po dobi i spolu prilagođene skupini od 21 oboljelog ispitanika (7 žena i 14 muškaraca, u dobi od 18 do 49 godina) iz istočne Hrvatske, kojima je vulgarna psorijaza dijagnosticirana pri Zavodu za dermatologiju i venerologiju Kliničkog bolničkog centra Osijek. Iz istraživanja su isključeni bolesnici na sistemskoj imunomodulacijskoj ili citostatskoj terapiji, oboljeli od spondiloartropatije, reumatoidnog artritisa i drugih autoimunih oboljenja, malignih, i infekcijskih bolesti te alergijskih reakcija unutar 6 tjedana prije dijagnostičke obrade.

Probir ispitanika kontrolne i PV skupine te prikupljanje i izolacija biološkog materijala prethodno su provedeni u okviru studije koja je odobrena od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Osijek (UR. BROJ: 2158-61-07-18-135) i Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Osijek (Potvrda br. R2-9042/2018).

Prije istraživanja pribavljen je informirani pristanak te su zabilježeni osnovni antropometrijski (visina, težina, BMI) i demografski podaci (dob, spol, trajanje bolesti, paritet, životne navike) oboljelih i kontrolnih ispitanika. Težina bolesti određena je pomoću skale PASI (engl. *Psoriasis Area and Severity Index*). Indeks kvalitete života određen je pomoću DLQI skale (engl. *Dermatology Life Quality Index*).

4.1.2. Upotrijebljene kemikalije

- Lymphoprep™ - STEMCELL Technologies Inc. Vancouver, Canada
- Trypan blue boja
- LIVE/DEAD™ Fixable Dead Cell Stain Kits - Life Technologies, Carlsbad, California, United States
- Human TruStain FcX™- BioLegend, San Diego, California, United States

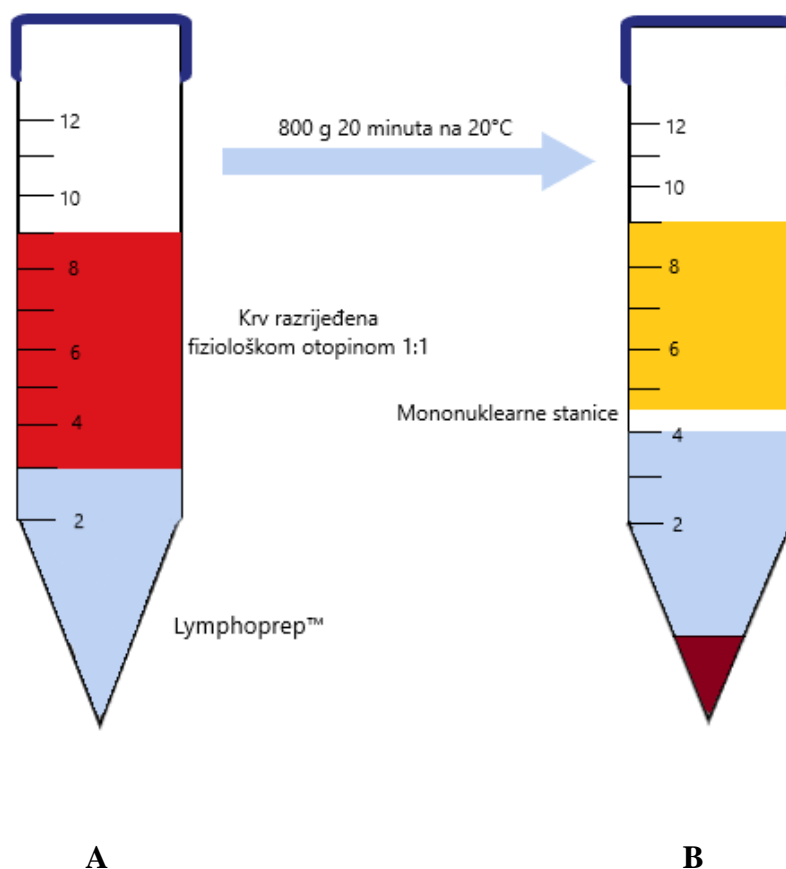
- Anti-human CD3ε FITC (donacija prof. Petera Balogha, Medicinski fakultet Sveučilišta u Peču, klon UCHT1 gamma)
- Anti-human CD4 PE-Cy7 (1:200, clone SK3, eBiosciences)
- ArC™ Amine Reactive Compensation Bead - Life Technologies, Carlsbad, California, United States
- BD™ CompBeads Negative Control – BD, New Jersey, United States
- BD™ CompBeads Anti-Mouse Ig – BD, New Jersey, United States

4.2. Metode

4.2.1. Izolacija ukupnih leukocita

Prije korištenja Lymphoprep, bočica je promiješana nekoliko puta izvrtanjem. Za izolaciju mononuklearnih stanica periferne krvi (PBMC) iz 10 mL heparinirane krvi u Falcon epruvetu volumena 50 mL pipetirano je 15 mL Lymphoprep.

Postupak: Uzorak krvi razrijeđen je fiziološkom otopinom ili PBS-om (engl. *Phosphate buffered saline*) (bez BSA ili FBS) u omjeru 1:1 (10 ml heparinirane krvi pomiješano s 10 ml fiziološke otopine). Uzorak krvi pažljivo je nanesen na površinu Lymphoprep pazeći da se dvije otopine ne miješaju. Pripremljeni uzorci centrifugirani su 25 minuta na 800g, pri temperaturi 25°C, bez kočenja. Gornji sloj plazme odbačen je pažljivo, bez ometanja sloja PBMC stanica. Sloj PBMC stanica je tipsom pipete pažljivo pokupljen s granice plazme i Lymphoprep medija te prebačen u novu epruvetu volumena 15 mL. Prikupljene stanice isprane su u 15 mL PBS pufera i zatim centrifugirane 5 minuta na 800g pri sobnoj temperaturi. Supernatant je odbačen, istaložene stanice resuspendirane u 8 mL PBS-a i centrifugirane sljedećih 5 minuta na 550g. Supernatant je odbačen, a istaložene stanice resuspendirane u 5 mL PBS pufera. Stanice u volumenu od 50µl pomiješane su s 100µl Trypan Blue boje i izbrojane pomoću svjetlosnog mikroskopa i Burker-Turk komorice. Za potrebe analize na protočnom citometru 1×10^6 stanica je alikvotirano u 1 mL PBS pufera bez dodatka BSA.



Slika 2. Izolacija perifernih mononuklearnih stanica na Lymphoprepu – slika 2 A prikazuje uzorak krvi nadslojen na Lymphoprep, dok slika 2 B prikazuje slojeve nastale odvajanjem sastavnica krvi na Lymphoprep mediju prilikom centrifugiranja.

4.2.2. Bojanje vijabilnih stanica pomoću komercijalnog kompleta LIVE/DEAD™ Fixable Dead Cell Stain Kits

U svrhu analize relativne frekvencije vijabilnih stanica na protočnom citometru korišten je komercijalni komplet LIVE/DEAD™ Fixable Dead Cell Stain Kit (Applied Biosystems, USA). Tubica s fluorescentnom bojom (komponenta A) i tubica bezvodnog DMSO (komponenta B) zagrijane su na sobnu temperaturu te je 50 μ l DMSO reagensa dodano u tubicu oznake A. Tako pripremljena otopina zaštićena je od svjetlosti i skladištena na -20°C max. 2 tjedna. Tijekom pripreme stanica za bojanje LIVE/DEAD komercijalnim kompletom, korišten je PBS bez dodanog BSA. U svaki alikvot stanica ($1 \times 10^6/\text{mL}$) dodano je 1 μ l prethodno pripremljene LIVE/DEAD

boje te su uzorci zatim inkubirani 30 minuta u mraku na +4°C. Stanice su potom isprane s 1 mL PBS+1% BSA i centrifugirane na 5 minuta na 350g. Postupak ispiranja ponovljen je još jednom u sljedećem koraku. Supernatant je zatim uklonjen, a istaložene stanice resuspendirane u 95 µl PBS+1%BSA.

4.2.3. Blok Fc receptora na stanicama za inhibiciju nespecifičnog vezanja protutijela primjenom Human TruStain FcX™

U prethodno pripremljenu suspenziju (1×10^6 st u 95 µl PBS+1% BSA), dodano je 5µl Human TruStain FcX™ boje. Nakon kratkog miješanja na vorteks mješalici, uzorci su inkubirani 5 do 10 minuta na sobnoj temperaturi.

4.2.4. Bojanje stanica fluorescentno obilježenim monoklonalnim protutijelima i analiza na protočnom citometru

Postupak: Pripremljeni PBMC alikvoti (1×10^6 st/100 µL) obilježeni su dodatkom 100 µl radne otopine fluorescentno obilježenih monoklonalnih protutijela koja je za jedan uzorak pripremljena dodatkom 0,4 µl FITC anti-CD3 (razrijeđenje 1:250) i 2,5 µl PE-Cy7 anti-CD4 (razrijeđenje 1:200, clone SK3, eBiosciences) u 97,1 µl PBS pufera s dodatkom 0,1% BSA i 0,01% NaN₃. Pripremljena smjesa je kratko promiješana na vorteks mješalici i uzorci su inkubirani 30 minuta na 4°C. Nakon inkubacije, svaki je uzorak ispran dodatkom 2 mL PBS pufera te centrifugiran 5 minuta na 350g. Postupak ispiranja ponovljen je u sljedećem koraku. Supernatant je zatim uklonjen i stanice resuspendirane u 0,5 mL PBS pufera. U svakom ispitivanom uzorku analizirano je 50 000 živih stanica pomoću BD FACS Canto II protočnog citometra (FACS Canto II, Becton Dickinson, SAD) te FlowLogic programa (Inivai Technologies, Australija).

4.2.5. Statistička analiza rezultata

Kategoričke varijable prikazane su apsolutnim frekvencijama i proporcijama, a omjerne varijable medijanom s interkvartilnim rasponom (IQR). Normalnost distribucije podataka

procijenjena je Shapiro-Wilk testom. Statistička značajnost razlike među neovisnim skupinama testirana je neparametrijskim testom (Mann-Whitney). Povezanost kontinuiranih varijabli procijenjena je Spearmanovim koeficijentom korelacije (ρ). Dvostrani $P < 0,05$ predstavlja prag značajnosti. Svi testovi učinjeni su NCSS2007 (NCSS LLC, Kaysville, UT, SAD) programom.

5. REZULTATI

5.1. Klinička i demografska obilježja ispitanika

Demografska i klinička obilježja ispitanika prikazana su u tablici 1. Sve vrijednosti su opisane medijanom s interkvartilnim rasponom i razlike testirane primjenom Mann-Whitney ili Fisher exact testa. Skupine zdravih i oboljenih ispitanika nisu se značajno razlikovale po dobi, spolu ili BMI statusu. Također, nisu zabilježene značajne razlike u CMV IgG/M seropozitivnosti i serumskoj razini CMV IgG/M protutijela. Svi ispitanici bili su negativni na anti-HCV i HBsAg, dok su anti-HBs IgG protutijela zabilježena kod 43% (9/21) oboljela i 55% (12/22) zdrava ispitanika, najvjerojatnije kao posljedica obaveznog programa cijepljenja koji se u Hrvatskoj provodi više od 50 godina.

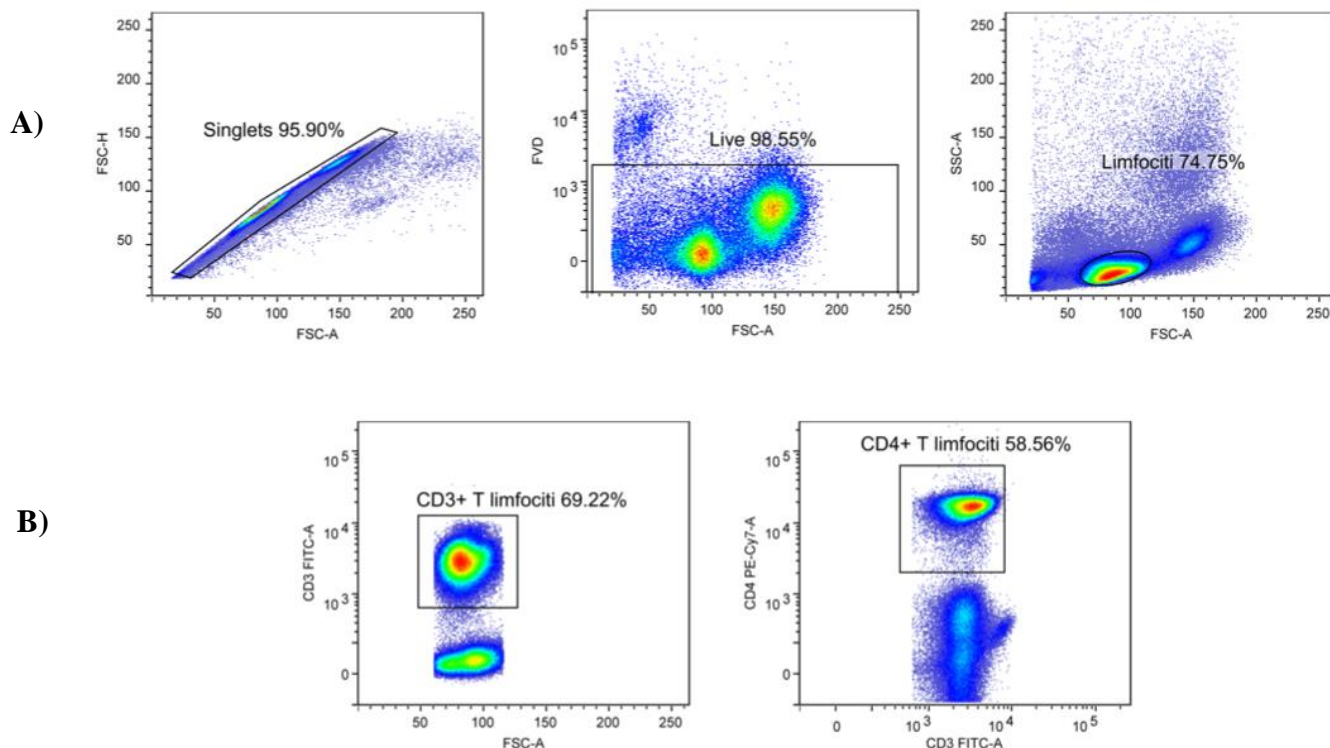
Tablica 1. Demografska i klinička obilježja ispitanika. Vrijednosti su ispitivane u skupini oboljelih (PV, N=21) i zdravih ispitanika (CTRL, N=22).

| Skupina | PV | CTRL | P |
|--------------------------|-------------------------|------------------|---------|
| N (M/F omjer) | 21 (14/7) | 22 (16/6) | 0,75** |
| Dob (godine) | 33 (27-39) | 32 (28-40) | 0,922* |
| BMI (kg/m ²) | 25,2 (21,3-29,1) | 24,7 (20,7-27,1) | 0,356* |
| hsCRP (mg/L) | 2 (0,7-3,2) | 0,8 (0,5-1,8) | 0,06* |
| PASI | 7,7 (5,5-12,5) | - | - |
| DLQI | 3,0 (1,0-6,5) | - | - |
| Anti-CMV | IgG 13/4 | 17/3 | 0,68** |
| Anti-CMV | IgG 145 (29-185) | 136 (72-184) | 0,866* |
| Anti-CMV | IgM 1/16 | 0/18 | 0,485** |
| Anti-HBs | IgG 28 (0-153) | 201 (16-725) | 0,095* |

* Mann-Whitney U-test; ** Fisher exact test. Rezultati mjerenja prikazani su medijanom i interkvartilnim rasponom (IQR). N – broj ispitanika; BMI – indeks tjelesne mase; hsCRP – visoko osjetljivi C reaktivni protein; PASI – Psoriasis Area and Severity Index; DLQI – Dermatological Life Quality Index; CMV – cytomegalovirus; HB – hepatitis B; IgM/M – imunoglobulin G/M.

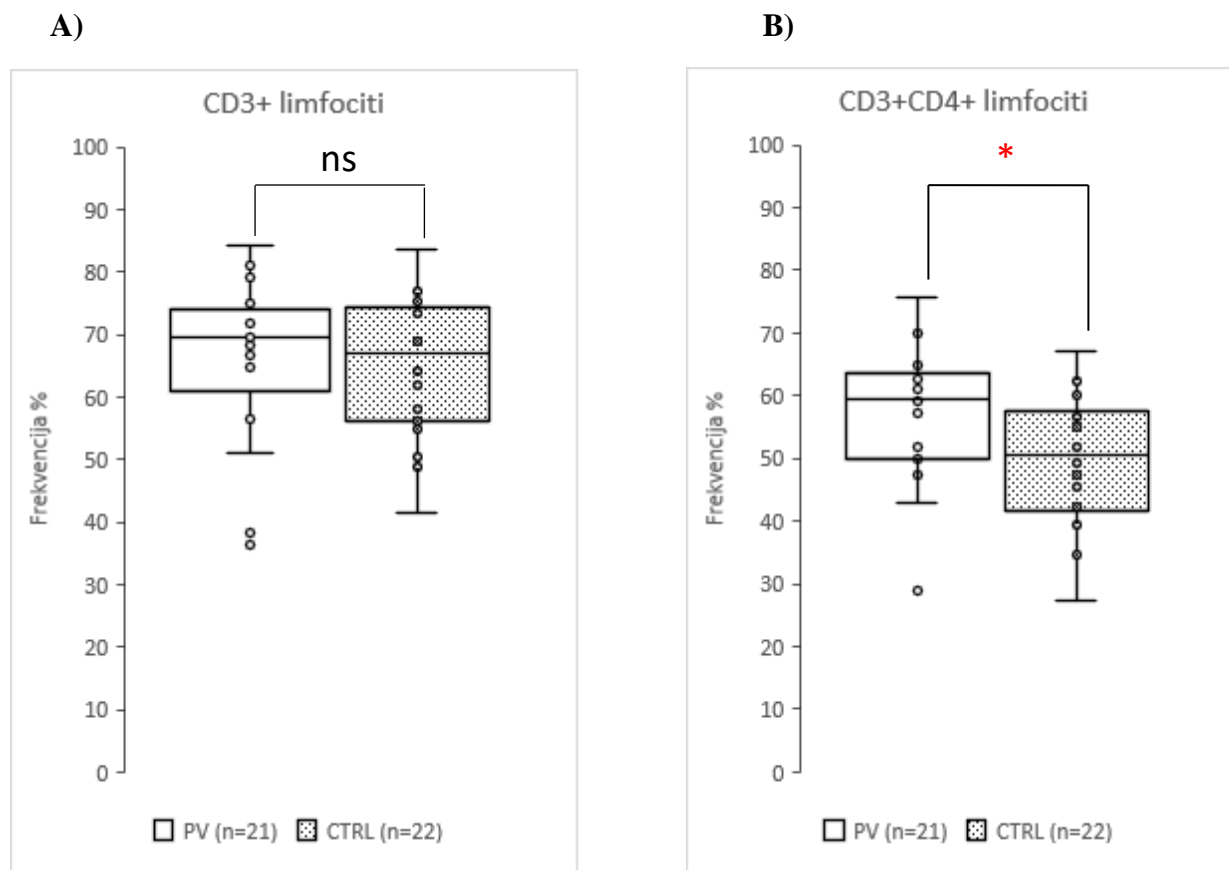
5.2. Periferni udjeli CD4+ limfocita T u PV i CTRL ispitanika

Brojnost perifernih CD3+CD4+ limfocita T određena je protočnom citometrijom sukladno strategiji susljednog otvaranja prozora za izdvajanje jednostrukih živih mononuklearnih stanica (Slika 3).



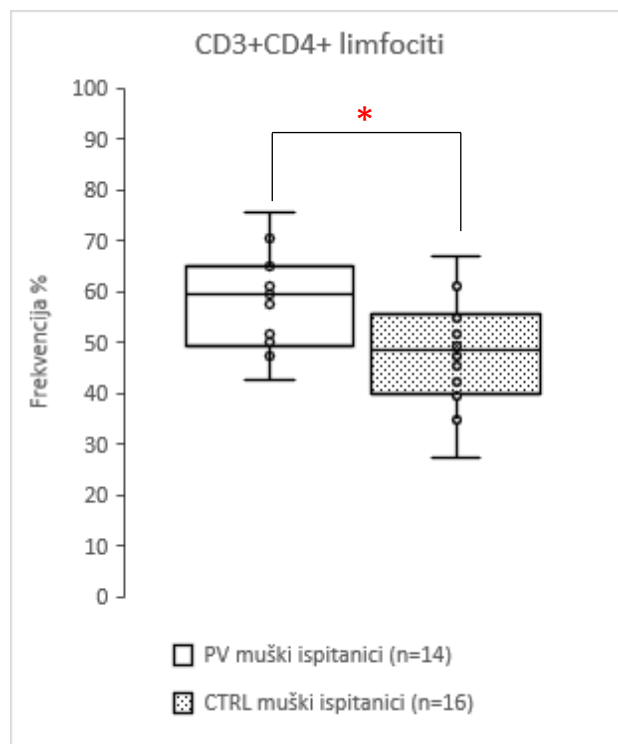
Slika 3. Reprezentativni primjer analize CD4+ limfocita T iz periferne krvi zdravih i oboljelih ispitanika protočnom citometrijom. Prikaz strategije susljednog postavljanja prozora za analizu jednostrukih, živih CD4+ limfocita T. **A)** Jednostruke stanice izdvojene su analizom FSC-A i FSC-H parametara, a mrtve stanice isključene su na temelju bojanja fiksabilnom bojom za vijabilnost stanica (FVD). **B)** Periferne linije CD4 limfocita T definirane su na temelju površinske ekspresije CD3 i CD4 staničnih biljega. Sve analize provedene su na protočnom citometru BD FACS Canto II i analizirane primjenom Flow Logic računalnog programa.

Analizom relativnih frekvencija CD3+ limfocita u perifernoj krvi, značajne razlike između skupine oboljelih (PV) [median; $M_e=69,73$, IQR (60,84-73,99)] i kontrolnih (CTRL) ispitanika [$M_e=67,03$, IQR (56,3-74,24)]; Mann-Whitney test, $P=0,4661$ nisu zabilježene (**Slika 4A**). U ukupnoj populaciji perifernih CD3+ limfocita, brojnost CD4+ stanica bila je značajno veća u oboljelih (PV) [median; $M_e=59,53$, IQR (49,99-63,65)] u odnosu na kontrolne (CTRL) ispitanike [$M_e= 50,50$, IQR (41,76-57,45)]; $P=0,0115$ (**Slika 4B**).



Slika 4. Relativne frekvencije limfocita u perifernoj krvi kontrola (CTRL) i PV ispitanika – Relativna frekvencija (A) CD3+ i (B) CD3+CD4+limfocita izmjerena BD FACS Canto II protočnim citometrom u populaciji 21 PV ispitanika i 22 kontrolna ispitanika. Unutar pravokutnog ili box-plot dijagrama, gornje i donje linije predstavljaju 1,5 x IQR. Ekstremne vrijednosti 1,5xIQR iznad Q3 te ispod Q1 prikazane su praznim kružićima. * - prag značajnosti definiran je kao $P<0,05$.

U sljedećem koraku, provedena je usporedna analiza perifernih CD3+CD4+ limfocita u muških oboljelih (n=14) i zdravih (n=16) ispitanika (ženskih ispitanika je bilo premalo za odgovarajuću usporedbu). Zabilježen je jednak trend povećane frekvencije CD3+CD4+ limfocita T u krvi muških PV ispitanika u odnosu na zdrave muške kontrole [PV vs CTRL; Me=59,41, IQR (49,43-65,04) vs. Me=48,54, IQR (40,06-55,51), P=0,037, t-test] (**Slika 5**).



Slika 5. Relativne frekvencije CD3+CD4+ limfocita u perifernoj krvi muških PV i kontrolnih ispitanika. Relativna frekvencija CD4+ limfocita izmjerena BD FACS canto II protočnim citometrom u populaciji muških PV (n=14) ispitanika i kontrolnih (n=16) ispitanika. Unutar pravokutnog ili box-plot dijagrama, gornje i donje linije predstavljaju 1,5xIQR. t-test. Prag značajnosti definiran je kao P<0,05.

5.3. Korelacijska analiza

Kako bismo utvrdili postoji li korelacija između relativne frekvencije perifernih populacija CD3+CD4+ limfocita s demografskim obilježjima PV ispitanika i težinom oboljenja učinili smo Spearmanovu analizu u populaciji PV ispitanika (n=21).

Naši rezultati nisu zabilježili korelaciju između relativne frekvencije perifernih populacija CD3+CD4+ limfocita s demografskim obilježjima PV ispitanika poput dobi, spola, BMI indeksa te razine visoko osjetljivog C reaktivnog proteina.

Također, nije zabilježena korelacija između relativne frekvencije perifernih populacija CD3+CD4+ limfocita i virusnih biljega – razine anti-CMV IgG, anti-CMV IgM te anti-HbS IgG protutijela.

Nadalje, nije zabilježena korelacija između relativne frekvencije perifernih populacija CD3+CD4+ limfocita i veličine PASI i DLQI skale.

6. RASPRAVA

Vulgarna psorijaza je kožna bolest, u kojoj glavnu ulogu imaju T stanice koje infiltriraju slojeve kože. Veliki udio limfocitnog infiltrata u koži oboljelih čine i CD4+ limfociti T koji zajedno s rezidualnim dendritičkim stanicama i okolnim keratinocitima sudjeluju u inicijaciji i progresiji bolesti. U tom kontekstu, Bovenschen i sur. (50) pokazali su da se aktivirane i memorijske CD4+ stanice uglavnom nalaze u retikularom i papilarnom dermisu gdje okružuju male krve žile. Među njima, do danas su identificirane različite CD4+ limfocitne linije, uključujući Th1, Th17 i Th22 stanične populacije (54).

Donedavno, Th1 stanice smatrane su glavnim pokretačima imunološkog odgovora u patogenezi psorijaze. Međutim, novija su istraživanja preusmjerila pozornost na upalne mehanizme vezane uz IL-23/Th17 os, za koju se danas smatra da igra dominantnu ulogu u razvoju psorijatičnih lezija (33, 53). U prilog ovoj hipotezi, ukazuju studije koje opisuju povećan broj Th17 stanica u psorijatičnim lezijama u koži, kao i rezultati kliničkih istraživanja koji govore o visokoj učinkovitosti anti-IL-17 protutijela u liječenju oboljelih od psorijaze (55). Pored Th17, važnu ulogu u patogenezi psorijaze imaju i Th22 stanice, budući da rezultati novijih studija opisuju povišene razine IL-22 u plazmi oboljelih te pozitivnu korelaciju između serumske razine IL-22 i veličine PASI indeksa (56). Povišene razine IL-22 u koži potiču okolne keratinocite na sintezu antimikrobnih proteina i metaloproteinaza, što ima za posljedicu inhibitorno djelovanje na diferencijaciju keratinocita i regeneraciju tkiva (57). Među CD4+ limfocitima, važnu ulogu u patogenezi psorijaze imaju i regulatorne T stanice (Treg). Obilježava ih visoka ekspresija površinskog receptora CD25 i transkripcijskog čimbenika Foxp3 te supresivna funkcija u svrhu regulacije aktivnog imunološkog odgovora (35). H. Sugiyama i sur. opisali su pak smanjeni supresivni kapacitet Treg limfocita u PV oboljelih (58). Neuravnotežena aktivnost CD4+CD25^{high} T-stanica u krvi i upalnom tkivu može dovesti do nekontrolirane proliferacije patogenih T stanica. Onoga trenutka kada je u koži narušena ravnoteža između proupalnih i protuupalnih procesa, dolazi do širenja upale, i razvoja prepoznatljive kliničke slike psorijaze (58).

U ovom istraživanju ispitivana je relativna frekvencija CD3+ i CD3+CD4+ limfocita T u oboljelih od vulgarne psorijaze i zdravih kontrola. Također, analizirana je povezanost brojnosti CD3+CD4+ T-limfocita s demografskim i kliničkim obilježjima ispitanika i težinom oboljenja.

Naši rezultati ukazuju na povećani udio perifernih CD4+ limfocitnih populacija u PV oboljelih u odnosu na zdrave kontrole.

Sukladno našim rezultatima, Kagami i sur. (59) opisuju povećani broj pomoćničkih CD4+ linija u krvi PV ispitanika, posebice CD4+IL-17A+, CD4+IFN- γ +, kao i CD4+IL-17A+ IFN- γ + limfocita T (59). Osim u krvi, povećana frekvencija CD4+ limfocita, posebice CD4+CD25+FoxP3+ Treg stanica, zabilježena je i u dermisu oboljelih od PV, ali ne i u koži zdravih, kontrolnih ispitanika (50).

U tom kontekstu, Zhang i sur. (60) utvrdili su da oboljeli od psorijaze imaju povećane udjele perifernih Th17 i Treg stanica te da periferna frekvencija Th17 i CD3+CD4+CD25+FoxP3+ Treg limfocita pozitivno korelira s veličinom PASI skale tj. težinom bolesti (60).

U našem istraživanju međutim, nije zabilježena korelacija između relativne frekvencije perifernih populacija CD3+CD4+ limfocita i veličine PASI ili DLQI skale.

Izostanak povezanosti između frekvencije perifernih CD4+CD25+ limfocita i obilježja bolesti opisali su i Karamehić i sur. (61). Zanimljivo, Ferran i sur. pak ukazuju na pozitivnu korelaciju CD4+ perifernih linija i PASI indeksa samo u akutnih, ali ne i kroničnih oblika psorijaze. U tom kontekstu, brojnost CD4+ perifernih linija može imati potencijalni dijagnostički značaj u ranoj fazi oboljenja, dok kronična upala i posljedični razvoj simptoma psorijaze, moguće značajnije narušavaju brojnost drugih perifernih limfocitnih linija. Sukladno navedenom, značajan broj studija opisuje pozitivnu korelaciju između CD8+ perifernih udjela i PASI indeksa. Ove studije, kao i prethodno navedena istraživanja brojnosti CD4+ perifernih populacija u psorijazi (59, 60), uglavnom su provedene na uzorku teže oboljelih ispitanika u kojih je veličina PASI skale bila veća od 10. Naše istraživanje provedeno je pak u populaciji mlađih ispitanika, s blagim do umjerenim manifestacijama bolesti (PASI $M_e=7,7$), bez akutnih simptoma, što moguće dijelom objašnjava izostanak korelacije s kliničkim obilježjima bolesti (62).

Upravo nam činjenica da se rezultati nekolicine istraživanja razlikuju, ukazuje na kompleksnost psorijaze kao bolesti i izazova koje ona donosi. Za procjenu uloge perifernih CD4+ limfocita T potrebna su, dakle, daljna istraživanja na opsežnijoj populaciji oboljelih ispitanika, klasificiranih po stupnju oboljenja i duljini trajanja bolesti. Preliminarni rezultati ove studije

također naglašavaju potrebu za daljnom analizom diferencijacijskog profila, funkcijskog i migratorng kapaciteta perifernih CD4+ limfocita u psorijazi.

7. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- 1) Oboljeli od psorijaze imaju povišene udjele CD3+CD4+ limfocita T u perifernoj krvi.
- 2) Porast perifernih linija CD3+CD4+ limfocita T u oboljelih od psorijaze neovisan je o CMV seropozitivnosti te serumskoj razini CMV, HCV i HBs protutijela.
- 3) Razvoj blagih do umjerenih kliničkih obilježja psorijaze nije povezan s povećanjem broja perifernih populacija CD3+CD4+ limfocita T.

8. SAŽETAK

Uvod: Psorijaza je kronična, imunološki posredovana upalna bolest kože koju obilježava razvoj ljuskavih plakova, poglavito na tjemenu, laktovima, koljenima i lumbalnom dijelu leđa. Bolest se javlja kao posljedica upalom inducirane hiperproliferacije keratinocita u epitelnom sloju kože i napreduje slijedom tkivne infiltracije imunskih stanica u dermalnim slojevima. Važnu ulogu u inicijaciji i progresiji psorijaze imaju stanice adaptivnog imunološkog odgovora, posebice specijalizirane efektorske linije CD3+CD4+ limfocita T koje izlučuju upalne citokine poput IL-17, IL-22, IL-12, IFN γ i TNF α .

Ciljevi istraživanja: Analizirati i usporediti brojnost CD3+CD4+ T-limfocita u perifernoj krvi oboljelih ispitanika i zdravih kontrola te ustanoviti povezanost brojnosti perifernih CD3+CD4+ T-limfocita s demografskim obilježjima ispitanika i težinom oboljenja.

Materijali i metode: Prikupljena je periferna krv 21 ispitanika oboljelog od psorijaze i 22 zdrave kontrole. Periferni mononuklearni leukociti izolirani su centrifugiranjem u gradijentu gustoće Lymphoprep medija, obilježeni anti-human CD3 ϵ FITC i CD4 PE-Cy7 monoklinalnim protutijelima te analizirani na protočnom citometru BD FACS Canto II (FACS Canto II, Becton Dickinson, SAD). Relativne frekvencije CD3+CD4+ limfocita T određene su pomoću FlowLogic računalnog programa (Inivai Technologies, Australija).

Rezultati: U usporedbi sa zdravim ispitanicima, oboljeli od psorijaze imaju značajno povišene udjele CD3+CD4+ limfocita T u perifernoj krvi. Povezanost relativnih frekvencija perifernih populacija CD3+CD4+ limfocita s demografskim i kliničkim obilježjima PV ispitanika nije zabilježena.

Zaključak: Oboljeli od psorijaze pokazuju povišene udjele CD3+CD4+ limfocita u perifernoj krvi. Povećana brojnost perifernih CD3+CD4+ linija u psorijazi nije povezana s dobi, spolom, serumskom razinom anti-CMV, anti-HCV i anti-HBs protutijela kao ni s težinom oboljenja.

Ključne riječi: CD4+ limfociti; DLQI; PASI; Vulgarna psorijaza

9. SUMMARY

Title: Analysis of peripheral CD3+CD4+ T lymphocytes in patients with Psoriasis vulgaris

Introduction: Psoriasis is a chronic, immune mediated inflammatory skin disease which is characterized by development of scaly plaques, especially on the scalp, elbows, knees and gluteal cleft. Psoriasis develops as a consequence of an inflammation induced keratinocyte hyperproliferation in epithelial layer of the skin and it advances following the tissue infiltration with immune cells in the dermal layers. An important role in the initiation and progression of psoriasis play the cells of adaptive immunity, especially specialized effector T lymphocyte lines that secrete inflammatory cytokines such as IL-17, IL-22, IFN γ and TNF α .

Objectives: To analyze and compare the frequency of CD3+CD4+ lymphocytes in peripheral blood of patients with PV and healthy controls and establish the connection between the frequency of peripheral CD3+CD4+ T-lymphocytes and demographic and clinical features of patients and disease severity.

Material and methods: Peripheral blood of 21 PV patients and 22 PV healthy controls has been collected. Peripheral lymphocytes have been isolated by density-gradient centrifugation with Lymphoprep, marked with anti-human CD3 ϵ FITC and CD4 PE-Cy7 monoclonal antibodies, and analyzed on the flow cytometry instrument (FACS Canto II, Becton Dickinson, USA). Relative frequencies of CD3+CD4+ T lymphocytes have been determined by FlowLogic computer software (Inivai Technologies, Australia).

Results: Compared to healthy controls, PV patients have had significantly increased relative frequencies of CD3+CD4+ lymphocytes in peripheral blood. Correlation between relative frequencies of peripheral populations of CD3+CD4+ lymphocytes with demographic and clinical features of PV patients has not been established.

Conclusion: PV patients have shown significantly increased frequencies of CD3+CD4+ lymphocytes in peripheral blood. Increased number of CD3+CD4+ peripheral lines in psoriasis is not associated with age, gender, serum levels of anti-CMV, anti-HCV and anti-HBs antibodies and disease severity.

Key words: CD4+ lymphocytes; DLQI; PASI; Psoriasis Vulgaris

10. LITERATURA

1. Christophers E. Psoriasis Epidemiology and clinical spectrum. *Clin Exp Dermatol.* 2001;26:314-320.
2. Griffiths CE, Barker JN. Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *Lancet.* 2007;370:263-27.
3. Kelly-Sell M, Gudjonsson JE. *Therapy for Severe Psoriasis*, 1. izd. Philadelphia: Elsevier; 2016.
4. Papp K, Gulliver W, Lynde C, Poulin Y, Ashkenas J. Canadian guidelines for the management of plaque psoriasis: overview. *J Cutan Med Surg.* 2011;15(4):210-219.
5. Bhosle MJ, Kulkarni A, Feldman SR, Balkrishnan R. Quality of life in patients with psoriasis. *Health Qual Life Outcomes.* 2006;4:35.
6. Bechet PE Psoriasis: A brief historical review. *Arch Derm Syphilol.* 1936;33(2):327–334.
7. Ines Brajac and Franjo Gruber (March 16th 2012). History of Psoriasis, Psoriasis - A Systemic Disease, Jose O'Daly, IntechOpen, Dostupno na adresi: <https://www.intechopen.com/books/psoriasis-a-systemic-disease/psoriasis-history-definition-and-treatment-through-centuries>. Datum pristupa 25.08.2020.
8. Langley RG, Krueger GG, Griffiths CE. Psoriasis: epidemiology, clinical features, and quality of life. *Ann Rheum Dis.* 2005;64
9. Icen M, Crowson CS, McEvoy MT, Dann FJ, Gabriel SE, Maradit Kremers H. Trends in incidence of adult-onset psoriasis over three decades: a population-based study. *J Am Acad Dermatol.* 2009;60(3):394-401.
10. Chandran V, Raychaudhuri SP. Geoeidemiology and environmental factors of psoriasis and psoriatic arthritis. *J Autoimmun.* 2010;34(3):J314-J321.
11. Gupta R, Debbaneh MG, Liao W. Genetic Epidemiology of Psoriasis. *Curr Dermatol Rep.* 2014;3(1):61-78.
12. Sagi L, Trau H. The Koebner phenomenon. *Clin Dermatol.* 2011;29(2):231–236.
13. Ladizinski B, Lee KC, Wilmer E, i sur. A review of the clinical variants and the management of psoriasis. *Adv Skin Wound Care.* 2013;26(6):271–284.
14. Kalayciyan A, Aydemir EH, Kotogyan A. Experimental Koebner phenomenon in patients with psoriasis. *Dermatology.* 2007;215(2):114–117.

15. Malhotra SK, Mehta V. Role of stressful life events in induction or exacerbation of psoriasis and chronic urticaria. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2008;74(6):594–599.
16. Gisondi P, Rossini M, Di Cesare A, Idolazzi L, Farina S, Beltrami G, i sur. Vitamin D status in patients with chronic plaque psoriasis. *Br J Dermatol.* 2012;166(3), 505–510.
17. Gupta AK, Sibbald RG, Knowles SR, Lynde CW, Shear NH. Terbinafine therapy may be associated with the development of psoriasis de novo or its exacerbation: four case reports and a review of drug-induced psoriasis. *J Am Acad Dermatol.* 1997;36(5 Pt 2):858–862.
18. Pierard-Franchimont C, Pierard GE. L'iatrogénie psoriasique. [Drug-related psoriasis]. *Rev Med Liege.* 2012;67(3):139–142. French.
19. Norrlind R. A case of psoriasis pustulosa after an angina tonsillaris. *Acta Derm Venereol.* 1954;34(1–2):122–123.
20. Whyte HJ, Baughman RD. Acute Guttate Psoriasis and Streptococcal Infection. *Arch Dermatol.* 1964;89:350–356.
21. Fry L, Baker BS, Powles AV, Fahlen A, Engstrand L. Is chronic plaque psoriasis triggered by microbiota in the skin? *Br J Dermatol.* 2013;169(1):47–52.
22. Slominski AT, Botchkarev V, Choudhry M, et al. Cutaneous expression of CRH and CRH-R. Is there a “skin stress response system?”. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;885:287–311.
23. Kim JE, Cho DH, Kim HS, i sur. Expression of the corticotropin-releasing hormone-proopiomelanocortin axis in the various clinical types of psoriasis. *Exp Dermatol.* 2007;16(2):104–109.
24. Zbytek B, Mysliwski A, Slominski A, i sur. Corticotropin-releasing hormone affects cytokine production in human HaCaT keratinocytes. *Life Sci.* 2002;70(9):1013–1021.
25. Higgins E. Alcohol, smoking and psoriasis. *Clin Exp Dermatol.* 2000;25(2):107–110.
26. Farkas A, Kemeny L. Psoriasis and alcohol: is cutaneous ethanol one of the missing links? *Br J Dermatol.* 2010;162(4):711–716.
27. Hayes J, Koo J. Psoriasis: depression, anxiety, smoking, and drinking habits. *Dermatol Ther.* 2010;23(2):174–180.

28. Naldi L, Chatenoud L, Linder D, i sur. Cigarette smoking, body mass index, and stressful life events as risk factors for psoriasis: results from an Italian case-control study. *J Invest Dermatol.* 2005;125(1):61–67.
29. Sterry W, Strober BE, Menter A. Obesity in psoriasis: the metabolic, clinical and therapeutic implications. Report of an interdisciplinary conference and review. *Br J Dermatol.* 2007;157(4):649–655.
30. Johnston A, Arnadottir S, Gudjonsson JE, i sur. Obesity in psoriasis: leptin and resistin as mediators of cutaneous inflammation. *Br J Dermatol.* 2008;159(2):342–350.
31. Zackheim HS, Farber EM. Rapid weight reduction and psoriasis. *Arch Dermatol.* 1971;103(2):136–140.
32. Ayala-Fontánez N, Soler DC, McCormick TS. Current knowledge on psoriasis and autoimmune diseases. *Psoriasis (Auckl)* 2016;6:7-32.
33. Schlaak JF, Buslau M, Jochum W, i sur. T cells involved in psoriasis vulgaris belong to the Th1 subset. *J Invest Dermatol.* 1994;102(2):145-149.
34. Diani M, Altomare G, Reali E. T Helper Cell Subsets in Clinical Manifestations of Psoriasis. *J Immunol Res.* 2016;2016:7692024.
35. Bonish B, Jullien D, Dutronc Y, i sur. Overexpression of CD1d by keratinocytes in psoriasis and CD1d-dependent IFN-gamma production by NK-T cells. *J Immunol* 2000; 165:4076–4085.
36. Lagner U, et al. Identification of a novel proinflammatory human skin-homing V γ 9V δ 2 T cell subset with a potential role in psoriasis. *J Immunol.* 2011;187(5):2783–2793
37. Teunissen MBM, Yremenko NG, Baeten DLP, 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;134(12):2898-2907.
38. Büchau AS, Gallo RL. Innate immunity and antimicrobial defense systems in psoriasis. *Clinics in Dermatology.* 2007;25(6), 616–624.
39. Raychaudhuri SK, Maverakis E, Raychaudhuri SP. Diagnosis and classification of psoriasis. *Autoimmunity Reviews.* 2014;13(4-5):490-495.
40. Sabat R, Philipp S, Höflich C, i sur. Immunopathogenesis of psoriasis. *Exp Dermatol.* 2007;16(10):779-798.
41. Andreis I, i sur. *Imunologija*, 7. izd. Zagreb:Medicinska naklada;2004.

42. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 2005;23: 515– 548.
43. Wang S, Chen L. T lymphocyte co-signaling pathways of the B7-CD28 family. *Cell Mol Immunol*. 2004;1:37– 42.
44. Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity*. 2006;24:677– 688.
45. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, et al. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005;6:1123– 1132.
46. Park H, Li Z, Yang XO, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 2005;6:1133–114.
47. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 2009;27: 485–517.
48. Shi X, Jin L, Dang E, Chang T, Feng Z, Liu Y, et al. IL-17A upregulates keratin 17 expression in keratinocytes through STAT1- and STAT3-dependent mechanisms. *J Invest Dermatol* 2011;131: 2401–2408.
49. Bos JD. Psoriasis, innate immunity, and gene pools. *J Am Acad Dermatol*. 2007;56(3):468-471.
50. Bovenschen HJ, van Vlijmen-Willems IM, van de Kerkhof PC, van Erp PE. Identification of lesional CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells in Psoriasis. *Dermatology*. 2006;213(2):111-117.
51. Nicolas JF, Chamchick N, Thivolet J, Wijdenes J, Morel P, Revillard JP. CD4 antibody treatment of severe psoriasis. *Lancet*. 1991;338(8762), 321.
52. Di Cesare A, Di Meglio P, Nestle FO. The IL-23/Th17 axis in the immunopathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol*. 2009;129(6):1339-1350.
53. Chiricozzi A, Nogales KE, Johnson-Huang LM, et al. IL-17 induces an expanded range of downstream genes in reconstituted human epidermis model. *PLoS One*. 2014;9(2):e90284.
54. Res PC, Piskin G, de Boer OJ, et al. 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;5(11):e14108.

55. Cho JH, Feldman M. Heterogeneity of autoimmune diseases: pathophysiologic insights from genetics and implications for new therapies. *Nat Med.* 2015;21(7):730-738.
56. Nograles KE, Zaba LC, Guttman-Yassky E, i sur. Th17 cytokines interleukin (IL)-17 and IL-22 modulate distinct inflammatory and keratinocyte-response pathways. *Br J Dermatol.* 2008;159(5):1092-1102.
57. Wolk K, Witte E, Wallace E, i sur. IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. *Eur J Immunol.* 2006;36(5):1309-1323.
58. Sugiyama H, Gyulai R, Toichi E, i sur. Dysfunctional blood and target tissue CD4+CD25high regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. *J Immunol.* 2005;174(1):164-173.
59. Kagami S, Rizzo HL, Lee JJ, Koguchi Y, Blauvelt A. Circulating Th17, Th22, and Th1 cells are increased in psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2010;130(5):1373-1383.
60. Zhang L, Yang XQ, Cheng J, Hui RS, Gao TW. Increased Th17 cells are accompanied by FoxP3(+) Treg cell accumulation and correlated with psoriasis disease severity. *Clin Immunol.* 2010;135(1):108-117.
61. Karamehic J, Zecevic L, Resic H, i sur. Immunophenotype lymphocyte of peripheral blood in patients with psoriasis. *Med Arch.* 2014;68(4):236-238.
62. Pont-Giralt M, Giménez-Arnau AM, Pujol RM, Santamaria-Babi LF. Circulating CLA(+) T cells from acute and chronic psoriasis patients manifest a different activation state and correlation with disease severity and extension. *J Invest Dermatol.* 2006;126(1):227-228.

11. ŽIVOTOPIS

Paula Herek

Datum i mjesto rođenja: 2. srpnja 1997., Osijek, Hrvatska

Adresa: Sjenjak 22, 31000, Osijek, Hrvatska

E- adresa: herekpaula@gmail.com

Obrazovanje:

2012. – 2016. Prirodoslovno matematička gimnazija, Osijek

2016. – 2020. Medicinski fakultet Osijek – preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske dijagnostike