

# Uloga perifernih CD3+CD8+ limfocita T u pojavi i progresiji vulgarne psorijaze.

---

Grgić, Zvonimir

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:152:370284>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-27**



Repository / Repozitorij:

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



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

**Zvonimir Grgić**

**ULOGA PERIFERNIH CD3+CD8+  
LIMFOCITA T U POJAVI I PROGRESIJI  
VULGARNE PSORIJAZE**

**Završni rad**

**Osijek, 2020.**

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

**Zvonimir Grgić**

**ULOGA PERIFERNIH CD3+CD8+  
LIMFOCITA T U POJAVI I PROGRESIJI  
VULGARNE PSORIJAZE**

**Završni rad**

**Osijek, 2020.**

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

Mentor rada: doc. dr. sc. Stana Tokić.

Rad ima 39 listova, 3 tablice i 6 slika.

*Veliku i posebnu zahvalnost dugujem mentorici, doc. dr. sc. Stani Tokić na pruženoj prilici za suradnju, kao i na ustupljenom vremenu, ogromnoj podršci i pomoći tijekom izrade završnog rada.*

*Zahvaljujem se višoj tehničarki, bacc. med. lab. dijagn. Ivani Jelavić na pomoći pri radu u laboratoriju.*

*Posebnu zahvalu dugujem svojim roditeljima, bratu i sestri koji su me uvijek podržavali, motivirali te utjecali na mene da budem ono što jesam danas. Beskrajno im hvala za sve što su napravili za mene.*

*Zahvaljujem mojim prijateljima za veliku podršku, brigu i strpljenje i hvala im što su cijelo vrijeme vjerovali u mene.*

## Sadržaj:

1. UVOD.....	1
1.1. Vulgarna psorijaza.....	1
1.2. Etiologija.....	2
1.2.1. Uloga genetičkih faktora.....	2
1.2.2. Uloga okolišnih faktora.....	3
1.2.3. Komorbiditeti.....	5
1.3. Patogeneza.....	6
1.3.1. Inicijacija.....	6
1.3.2. Prezentacija antigena.....	6
1.3.3. Odgovor pomoćničkih CD4+ limfocita T.....	7
1.3.4. Uloga CD8+ limfocita T u razvoju vulgarne psorijaze.....	9
2. HIPOTEZA.....	12
3. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	13
4. MATERIJALI I METODE.....	14
4.1. Materijali.....	14
4.1.1. Ispitanici.....	14
4.1.2. Upotrijebljene kemikalije.....	15
4.2. Metode.....	15
4.2.1. Izolacija ukupnih perifernih leukocita (PBMC) iz pune krvi.....	15
4.2.2. Priprema stanica za analizu protočnom citometrijom.....	17
4.2.2.1. Obilježavanje živih i mrtvih stanica.....	18
4.2.2.2. Inhibicija nespecifičnog vezanja protutijela.....	18
4.2.2.3. Bojanje PBMC uzoraka fluorescentno obilježenim protutijelima i protočna citometrija.....	18
4.2.3. Priprema „single-stain“ kontrola za izradu kompenzacijske matrice i kompenzaciju višebojne analize na protočnom citometru.....	19
4.2.3.1. Kompenzacija viability boje iz LIVE/DEAD kompleta.....	20
4.2.3.2. Kompenzacija višebojne analize u protočnoj citometriji.....	20
4.2.4. Statistička analiza rezultata.....	21
5. REZULTATI.....	22
5.1. Klinička i biokemijska obilježja ispitanika.....	22
5.2. Periferni udjeli CD8+ limfocita T u PV i CTRL ispitanika.....	23
5.3. Povezanost demografskih i kliničkih obilježja s perifernom raspodjelom CD3+CD8+ limfocita T.....	25

6. RASPRAVA .....	28
7. ZAKLJUČAK .....	31
8. SAŽETAK .....	32
9. SUMMARY .....	33
10. LITERATURA .....	34
11. ŽIVOTOPIS .....	39

## POPIS KRATICA

- ACTH (*engl. Adrenocorticotropic hormone*) adrenokortikotropni hormon
- AMP (*engl. Antimicrobial peptide*) antimikrobni peptid
- Anti-HBs (*engl. Hepatitis B surface antibody*) protutijelo na HBsAg
- APC (*engl. Antigen presenting cell*) antigen prezentirajuća stanica
- BMI (*engl. Body mass index*) indeks tjelesne mase
- BSA (*engl. Bovine serum albumin*) albumin goveđeg seruma
- CARD14 (*engl. Caspase recruitment domain family, member 14*) kaspaza-regrutirajuća domena
- CCL (*engl. C-C motif chemokine ligand*) kemokinski ligand
- CD (*engl. Clusters of differentiation*) klaster diferencijacije
- CLA (*engl. Cutaneous-associated lymphoid antigen*) kutani limfoidni antigen
- CMV (*engl. Cytomegalovirus*) citomegalovirus
- CRH (*engl. Corticotropin-releasing hormone*) kortikotropin-otpuštajući hormon
- CXCL (*engl. C-X-C motif chemokine ligand*) kemokinski CXC ligand
- DC (*engl. Dendritic cell*) dendritička stanica
- DLQI (*engl. Dermatology life quality index*) dermatološki indeks kvalitete života
- DMSO (*engl. Dimethyl sulfoxide*) dimetil sulfoksid
- FITC (*engl. Fluorescein isothiocyanate*) fluorescein izotiocijanat
- HBsAg (*engl. Hepatitis B surface antigen*) hepatitis B površinski antigen
- HCV (*engl. Hepatitis C virus*) hepatitis C
- HIV (*engl. Human immunodeficiency virus*) virus humane imunodeficijencije
- HLA (*engl. Human Leukocyte Antigen*) humani leukocitni antigen
- hsCRP (*engl. High-sensitivity C-reactive protein*) visoko osjetljivi C-reaktivni protein
- ICAM-1 (*engl. Intercellular adhesion molecule 1*) međustanična adhezijska molekula 1
- ICOS (*engl. Inducible T cell costimulator*) kostimulator inducibilnih T stanica
- IgG (*engl. Immunoglobulin G*) imunoglobulin G
- IgM (*engl. Immunoglobulin M*) imunoglobulin M
- INF (*engl. Interferon*) interferon
- iNKT (*engl. Invariant natural killer T cells*) invarijantna prirodna stanica ubojica
- IQR (*engl. Interquartile range*) interkvartilni raspon



- LFA-1 (*engl. Lymphocyte function-associated antigen*) limfocitni antigen 1
- MAIT (*engl. Mucosal associated invariant T*) invarijantne T stanice mukoznog tkiva
- MHC (*engl. Major Histocompatibility Complex*) molekula glavnog sustava tkivne snošljivosti
- MR1 (*engl. MHC related molecule 1*) molekula povezana s MHC 1
- NAT9 (*engl. N-acetyltransferase 9*) N-acetiltransferaza 9
- NF- $\kappa$ B (*Nuclear factor kappa B*) nuklearni faktor  $\kappa$ B
- NGF (*engl. Neural growth factor*) neuralni faktor rasta
- NK cells (*engl. Natural Killer*) stanice prirodne ubojice
- PASI (*engl. Psoriasis area and severity index*) indeks zahvaćenosti kože i težine kliničke slike
- PBMC (*engl. Peripheral blood mononuclear cells*) mononuklearne stanice periferne krvi
- PBS (*engl. Phosphate-buffered saline*) otopina puferirana fosfatom
- PSORS1 (*engl. Psoriasis susceptibility locus 1*) Lokus osjetljiv na psorijazu 1
- PV (*engl. vulgar psoriasis*) vulgarna psorijaza
- SLC12A8 (*engl. solute carrier family 12*) nosač otopljenih tvari obitelji 12
- Tc (*engl. T cytotoxic cell*) citotoksična stanica
- TCR (*engl. T cell receptor*) T-stanični receptor
- Th (*engl. T helper cell*) pomagačka stanica
- TLR (*engl. Toll-like receptor*) tollu-slični receptor
- TNF- $\alpha$  (*engl. Tumor necrosis factor alpha*) tumor nekrotizirajući faktor alfa
- Treg (*engl. T regulatory cell*) regulatorna stanica

# 1. UVOD

## 1.1. Vulgarna psorijaza

Psorijaza je kronična upalna bolest kože, a najčešće se javlja između 20. i 30. te između 50. i 60. godine života. Poznaje se pet podtipova psorijaze od kojih je vulgarna psorijaza (PV, od lat. *psoriasis vulgaris*) najčešći oblik bolesti zastupljen u 80 %-85 % oboljelih osoba. Vulgarna psorijaza zahvaća približno 2 %-3 % svjetske populacije, a prema dostupnim podacima prevalencija PV u Hrvatskoj populaciji iznosi 1.6 % (1). Razvoj bolesti povezan je s razvojem monomorfnih, eritematoznih, ljuskavih plakova, najčešće na lumbosakralnom području te na području tjemena, laktova i koljena. Njihova je pojava često praćena bolnim, neugodnim osjećajem žarenja i pečenja na koži. Klinička slika PV varira od blagih do vrlo teških oblika, a nerijetko je praćena pojavom reumatoidnih oboljenja i upalnih bolesti crijeva (2).

Psorijatične lezije imaju specifičan histološki izgled. Epidermis je zadebljan zbog ubrzane proliferacije nezrelih keratinocita (akantoza) koji zadržavaju jezgru i fenotipske odlike nediferenciranih stanica pri čemu se normalni granulirani sloj postepeno gubi, a u gornjem sloju epidermisa zadržavaju se stanice s jezgrom (parakeratoza). Prisutan je upalni infiltrat koji pretežito sadrži leukocite. U epidermisu je riječ o neutrofilima i limfocitima T od kojih su ponajviše zastupljeni citotoksični CD8+ T limfociti. U dermisu se najčešće nakupljaju pomoćničke CD4+ T stanične linije, zatim dendritičke stanice, stanice prirodne ubojice (NK, od engl. natural killer), makrofazi i mastociti (3). Navedene stanice u koži izlučuju upalne citokine i kemokine, koji pospješuju lokalnu angiogenezu i pojačani priljev upalnih stanica iz periferne krvi u kožu pri čemu dolazi do razvoja karakterističnog crvenog obojenja kožnih lezija i širenja upalnog stanja (2). Uvjeti upalnog mikrokoliša potiču adheziju korneocita u vanjskom sloju epidermisa pospješujući time razvoj ljuskavih lezija (3).

Dijagnoza se temelji na karakterističnoj kliničkoj slici i potvrdom histopatološkom nalazu biopsata kože. Učestala je pojava pozitivne obiteljske anamneze u oboljelih, najčešće kod onih mlađe životne dobi. Početak bolesti prije 40. godine života i pozitivna obiteljska anamneza karakteristike su psorijaze tipa I. Kod pacijenata s tipom I psorijaze često se razvija teži oblik bolesti. Psorijaza tipa II javlja se povremeno i u kasnijoj dobi, a oboljeli najčešće nemaju pozitivnu obiteljsku anamnezu. U postavljanju točne dijagnoze pomaže i Auspitzov fenomen – sitno točkasto krvarenje ispod plakova (4).

## 1.2. Etiologija

### 1.2.1. Uloga genetičkih faktora

Vulgarna psorijaza je kompleksna, multifaktorijalna nasljedna bolest, još uvijek nepoznate etiologije. Smatra se da bolest započinje kao posljedica infekcijom ili traumom narušene kožne barijere što u genetički podložnih osoba uzrokuje razvoj nekontroliranog imunosnog odgovora na još nedovoljno poznate antigene (5).

Tijekom višegodišnje potrage za rizičnim genetičkim varijantama u podlozi razvoja psorijaze otkriveno je nekoliko potencijalnih genskih lokusa uključujući PSORS1 (od engl. psoriasis susceptibility 1) lokus na kratkom kraku kromosoma 6 (6p21.3). U toj kromosomskoj regiji smješten je i glavni kompleks gena tkivne podudarnosti (MHC, od eng. Major Histocompatibility Complex), visokopolimorfni genski sustav odgovoran za sintezu i varijabilnost humanih leukocitnih antigena (HLA, od engl. human leukocyte antigen) razreda I i razreda II. Geni MHC razreda I, kodiraju HLA-A, HLA-B i HLA-C antigene koje prepoznaju i vežu CD8 koreceptorske molekule izražene na površini CD8<sup>+</sup> limfocita T. Skupinu HLA molekula razreda II (HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR) prepoznaju pomoćnički limfociti i antigen prezentirajuće imunodne stanice koje na svojoj površini izražavaju koreceptorsku molekulu CD4. Uloga MHC molekula u našem organizmu izuzetno je važna za pravilno funkcioniranje imunološkog sustava budući da interakcija između HLA molekula i CD4 ili CD8 koreceptora čini jedan od nužnih signala za aktivaciju, proliferaciju i sazrijevanje imunskih stanica pri susretu s antigenom (7). U okviru PSORS1 lokusa nalazi se gen koji kodira molekulu HLA-Cw6, a koja u okviru standardne imunološke funkcije sudjeluje u prezentaciji unutarstaničnih antigena CD8<sup>+</sup> limfocitima T. Genske varijante molekule HLA-Cw6 učestalo se nasljeđuju u obiteljima oboljelih od psorijaze posebice u oboljelih ispitanika mlađe životne dobi s težim kliničkim simptomima, koji na površini svojih imunskih stanica uz HLA-Cw6 često izražavaju HLA-B13, -B57 i -DR7 antigene (1). Od navedenih, HLA-Cw6 je prisutan u više od 60% oboljelih od psorijaze i najvećim dijelom pridonosi riziku za nastanak bolesti. U tom je kontekstu utvrđeno da homozigotni nositelji gena HLA-C\*0602 imaju 2 do 5 puta veći rizik za razvoj psorijaze od C\*0602 heterozigota (8). Iako HLA-C\*0602 alel pokazuje najznačajniju povezanost s psorijazom, točan mehanizam i uloga ove HLA molekule u razvoju psorijaze još uvijek je nerazjašnjena. Pojedini funkcionalni modeli ukazuju na potencijalnu ulogu antimikrobnih peptida poput katelicidina (LL-37) koji se u upalnim uvjetima u koži

pojačano proizvodi i prezentira u kompleksu s HLA-Cw6 molekulama na površini keratinocita. Posljedična aktivacija autoreaktivnih imunskih stanica pospješuje klonalnu proliferaciju imunskih vrsta koje pri susretu s autoantigenima posreduju citotoksične učinke i uzrokuju trajnu upalu u koži (8, 9). Osim HLA-Cw6, u podlozi razvoja psorijaze otkriveni su i drugi rizični genski lokusi. Na dugom kraku kromosoma 17 (17q25) identificiran je genski lokus PSORS2 koji, između ostalih, sadrži i gen CARD14 (od engl. caspase recruitment domain family, member 14). Utvrđeno je da specifična mutacija u slijedu gena CARD14 eksprimirana u keratinocitima pospješuje nekontroliranu indukciju transkripcijskog čimbenika nuklearnog faktora  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B, od engl. nuclear factor kappa B). Pojačana aktivacija ovog transkripcijskog čimbenika ima za posljedicu pojačanu ekspresiju važnih kemokina poput CCL20 (od engl. C-C motif chemokine ligand 20) i CXCL8 (od engl. C-X-C motif chemokine ligand 8) koji posreduju migraciju i udomljavanje neutrofila, dendritičkih stanica, makrofaga te limfocita u koži i time posredno pospješuju upalne događaje u psorijazi (2, 10).

Daljnijim analizama otkriveno je još mogućih gena povezanih s patogeneom psorijaze poput nosača otopljenih tvari obitelji 12 (SLC12A8, od engl. Solute Carrier Family 12 Member 8) i N-acetil transferaze 9 (NAT9, od engl. N-acetyltransferase 9), no njihova točna uloga u PV patogenezi i dalje je nepoznata (11).

Na prisutnost genetičke podloge i važnost rizičnih genetičkih čimbenika u razvoju PV također ukazuju studije monozigotnih i dizigotnih blizanaca. Istraživanjima je utvrđeno da monozigotni blizanci imaju veću učestalost oboljenja nego dizigotni blizanci. Štoviše, monozigotni blizanci pokazuju veću sličnost pojavnosti, težine i tijeka oboljenja (12).

### **1.2.2. Uloga okolišnih faktora**

Najčešći okolišni okidači koji se povezuju s razvojem psorijaze su trauma, infekcija, stres, pušenje, alkohol i lijekovi (2).

Stres je zasigurno jedan od važnijih faktora prilikom aktivacije bolesti, a zabilježena je i značajna povezanost stresnih događanja s početkom psorijaze (13). Psorijaza utječe na kvalitetu bolesnikovog života jer je često uzrok stigmatizacije društva radi krive predodžbe o bolesti. Dugoročna izloženost stresu pospješuje pogoršanje simptoma bolesti (13).

Jedan od potencijalnih fizioloških mehanizama u pozadini stresom-induciranih promjena na koži jest aktivacija hipotalamusno-hipofizno-nadbubrežna osovine koja pospješuje otpuštanje kortikotropin-otpustajućeg hormona (CRH) te time posredno utječe na proizvodnju citokina u keratinocitima (2).

Infekcija uzrokovana bakterijom *Streptococcus pyogenes* također se povezuje s inicijacijom i progresijom vulgarne psorijaze (2). Iako je mehanizam razvoja autoreaktivnog imunološkog odgovora pri susretu s bakterijskim antigenima još uvijek nedovoljno razjašnjen, znanstvena istraživanja upućuju na moguću ulogu streptokoknih antigena visokog stupanja molekularne sličnosti ili mimikrije s keratinom, ali i drugim strukturnim proteinima u gornjim dijelovima kože koji potencijalno mogu djelovati kao okidači autoimunog odgovora (14). *Staphylococcus aureus* također se povezuje s razvojem psorijaze, a pojedina istraživanja bilježe prisutnost ove bakterije u koži više od 60 % pacijenata s psorijazom (15). Opisana je i povezanost HIV infekcije s povećanim rizikom razvoja psorijaze (16). Zanimljivo, gotovo 80 % HIV-pozitivnih osoba ujedno su nositelji HLA-Cw6 antigena. Pogoršanje simptoma psorijaze u HIV-pozitivnih pacijenata dijelom reflektira gubitak regulatornih CD4+CD25+ pomoćničkih limfocita T čiji se broj i funkcionalni kapacitet u uvjetima HIV virusne infekcije značajno smanjuje te ne uspijeva kontrolirati upalni odgovor aktiviranih CD8+ stanica (8).

Pušenje i alkohol povezani su s povećanom incidencijom i pogoršanjem simptoma psorijaze. U slučajevima zlouporabe alkohola u oboljelih od psorijaze, simptomi poprimaju težu formu, uključujući proširenje i pojačanu hiperkeratozu psorijatičnih lezija. Bolesti povezane s alkoholom (poput alkoholne ciroze jetre) povezuju se s pogoršanjem tijeka bolesti, između ostalog i radi smanjene učinkovitosti i povećanog citotoksičnog učinka lijekova u primjeni. Samim time, ishod liječenja kod teških alkoholičara je lošiji (13). Pušenjem više od 20 cigareta dnevno, rizik od razvoja psorijaze također se povećava 2 puta (17).

Heinrich Kobner je 1876. godine prvi opisao fizičku traumu kao okidač u aktivaciji psorijaze. Promatrao je stvaranje psorijatičnih lezija nakon tetoviranja, zadobivanja opekline te ugriza životinja ili kukaca. Odgovor na fizičku ozljedu kože može započeti već nakon tri dana, ali i nakon dvije godine, pri čemu imunološki odgovor na traumu može biti potpun, minimalan ili negativan. U slučaju potpunog odgovora dolazi do razvoja psorijaze na cjelokupnom području traume, a kod minimalnog samo uz rubna područja. Moguće je da se psorijatične lezije pojave nakon traume te da spontano nestanu nakon nekoliko dana. Kobnerov fenomen pospješuju učinci stresa i godišnjeg doba, posebice zimski mjeseci kada radi manjka izloženosti suncu češće dolazi do razvoja psorijaze. Ključni čimbenik u razvoju Kobnerovog fenomena jest neuralni faktor rasta (NGF, od engl. nerve growth factor) koji posreduje

pojačanu proliferaciju keratinocita, tkivnu angiogenezu i aktivaciju limfocita T. Istraživanje koje je pratilo ekspresiju NGF u koži prikazuje povećane vrijednosti NGF ekspresije 24 sata nakon traumatizacije s najvećim zabilježenim vrijednostima u drugom tjednu od trenutka ozljede (18).

Pojedini lijekovi također se povezuju s pogoršanjem psorijaze. Najčešće opisani terapijski okidači su litij, beta-blokatori, antimalarici, tetraciklini te nesteroidni protuupalni lijekovi (2)

### 1.2.3. Komorbiditeti

Iako se psorijaza smatra dermatološkom bolesti, ona pogađa više od kože. Istraživanja pokazuju da oboljeli od psorijaze učestalo obolijevaju i od drugih autoimunih bolesti (19). Lowes i sur. uočili su da metabolički poremećaji poput dijabetesa, hiperlipidemije i hipertenzije često nastupaju u oboljelih s blagom i srednje teškom psorijazom (6). Otpuštanjem proupalnih citokina poput tumor nekrotizirajućeg faktora alfa (TNF- $\alpha$ , od engl. tumor necrosis factor alpha) i interleukina (IL)-6, imunosne stanice stimuliraju hipotalamusno-hipofizno-nadbubrežnu osovinu. Otpuštanje adrenokortikotropnog hormona (ACTH) iz hipofize pospješuje lučenje kortizola - hormona usko povezanog s regulacijom pretilosti, hipertenzije te s inzulinskom rezistencijom. Takvi bolesnici imaju dva puta veći rizik za razvoj pretilosti te 1,5 puta veći rizik razvoja dijabetesa (20). Pojava psorijaze često je također udružena s razvojem kardiovaskularnih bolesti i akutnog infarkta miokarda (2, 6). Nadalje, prevalencija psorijatičnog artritisa te upalnih bolesti crijeva (IBD) značajno je povećana u oboljelih od psorijaze u usporedbi sa zdravom populacijom. Združeni učinci psorijaze i IBD oboljenja pospješuju razvoj artritisa, dijabetesa ili limfoma. Ovi rezultati upućuju na potencijalno zajedničke imunološke i genetičke čimbenike u podlozi razvoja psorijaze, kardiovaskularnih i metaboličkih oboljenja (20).

Osim autoimunih bolesti, oboljeli od psorijaze češće pokazuju znakove psiholoških oboljenja poput depresije i anksioznosti, a određeni dio oboljelih tijekom vremena razvije sklonost ka samoubojstvu (13).

## 1.3. Patogeneza

### 1.3.1. Inicijacija

Osim mehaničke i strukturne uloge, koža kao najveći ljudski organ ima važnu imunološku funkciju. Imunološki sustav kože izgrađuju keratinociti, dendritičke stanice, monociti, makrofagi, mastociti, limfociti T i B te nekonvencionalne prirodene limfoidne linije, poput gama delta ( $\gamma\delta$ ) T limfocita i sluznicama pridruženih invarijantnih T limfocita (MAIT, od engl. mucosal-associated invariant T), a svaka stanična populacija ima specifičnu ulogu u patogenezi psorijaze (21).

Autoreaktivni imunosni odgovor u podlozi razvoja psorijaze potencijalno započinje upalnom reakcijom koja se javlja nakon oštećenja kožne barijere infekcijom, npr. streptokokom, ili traumom (6).

U okviru inicijalnog odgovora na upalnu reakciju keratinociti pojačano izlučuju upalne molekule i antimikrobne peptide (AMP, od engl. antimicrobial peptides) iz obitelji S100 kao što su psorijazin, kalgranulin A i kalgranulin B, lipokalin 2,  $\beta$ -defenzin i katelicidin (LL37) (6). AMP su molekule koje aktiviraju epidermalne dendritičke stanice (DC, od engl. dendritic cell) vezanjem LL37-kompleksa za receptore nalik Toll proteinu (TLR, od engl. Toll-like receptor)-7, TLR8 i TLR9 (2). Aktivirane DC izlučuju upalne citokine poput IL -2, IL-12, IL-18, IL-23, INF (interferon)- $\alpha$ , INF- $\beta$ , INF- $\gamma$  i TNF - $\alpha$ . Nastali upalni uvjeti u koži pospješuju aktivaciju limfocita T (2, 8) i potiču okolne keratinocite na lučenje kemokina (CXCL1, CXCL8, CCL20) odgovornih za pojačanu kemotaksiju, infiltraciju i udomljavanje perifernih limfocitnih linija i neutrofila (22).

### 1.3.2. Prezentacija antigena

Do danas je opisano nekoliko epidermalnih antigena koji se radi molekularne mimikrije ili strukturnih modifikacija uzrokovanih stresom povezuju s razvojem psorijaze. Iako je njihova uloga još nedovoljno razjašnjena, smatra se da ovi autologni antigeni sudjeluju u aktivaciji autoreaktivnog imunološkog odgovora vezanjem za MHC II kompleks na površini antigen predočnih stanica (APC, od engl. antigen presenting cells) (5). Kompleks antigen-MHC receptor sudjeluje u aktivaciji limfocita T vezanjem za T stanični receptor (TCR, od engl. T cell receptor) koji mogu sačinjavati  $\alpha\beta$  ili  $\gamma\delta$  lanci. Adaptivne linije T limfocita koje izražavaju

$\alpha\beta$  TCR dominantne su limfoidne linije u ljudi koje sudjeluju u obrani našeg organizma od različitih vrsta mikroorganizama, ali se isto tako često pronalaze u podlozi nekontroliranog imunskog odgovora na autoantigene. Aktivacija  $\alpha\beta$  T limfocita započinje vezanjem  $\alpha\beta$ TCR za MHC-antigen kompleks izražen na površini APC stanice. U ovoj interakciji osim TCR, sudjeluje CD3 kompleks (sastavljen od dva  $\epsilon$ , jednog  $\delta$  i jednog  $\gamma$  invarijabilnog lanca), homodimerna  $\zeta$  molekula te CD4 ili CD8 koreptorske molekule koje prepoznaju MHC molekule razreda II ili razreda I. Osim navedenog primarnog signala, za aktivaciju limfocita T potreban je i sekundarni signal koji nastaje vezanjem kostimulacijskih molekula limfocita T (CD28, CD40L, ICOS) s pridruženim receptorskim molekulama na površini APC stanica (B7, CD40, ICOSL). Vezanjem upalnih citokina za citokinske receptore na površini limfocita T nastaje tercijarni aktivacijski signal koji potiče klonalnu proliferaciju limfocita T. Osim koreptorskih i kostimulacijskih molekula, nastalu vezu MHC-antigen-TCR kompleksa stabiliziraju i adhezijske molekule poput  $\beta$ 2-integrina i LFA-1 (od engl. lymphocyte function-associated antigen) koji je odgovoran za mobilnost i recirkulaciju aktiviranih limfocita. Ligand LFA-1 jest međustanična adhezijska molekula 1 (ICAM-1, od engl. intercellular adhesion molecule 1) koja se, osim na predočnim stanicama, nalazi i na endotelu krvnih žila te vezanjem za LFA-1 osigurava prolazak aktiviranog limfocita kroz krvožilne stijenke i odlazak na mjesto upale (21).

### 1.3.3. Odgovor pomoćničkih CD4+ limfocita T

Upalni uvjeti u koži oboljelih od psorijaze stimuliraju aktivaciju dermalnih linija CD4+ pomoćničkih (Th, od engl. T helper) limfocita. Ovisno o vrsti citokinskog podražaja, dolazi do diferencijacije raznolikih Th subpopulacija koje su temeljem različite funkcije transkripcijskog i sekrecijskog profila klasificirane kao Th1, Th2, Th17, Th22 ili regulatorne (Treg, od engl. T regulatory) T stanice (23).

Diferencijaciju Th0 u Th1 potiče ekspresija IL-12 kojeg luče aktivirane dendritičke stanice (1). Aktivirani Th1 limfociti, izlučuju upalne citokine IFN- $\gamma$ , IL-2 i TNF- $\alpha$  koji potpomažu aktivaciju CD8+ citotoksičnih (Tc, od engl. T cytotoxic) limfocita tipa 1 te potiču ekspresiju ICAM-1 adhezijskih molekula na površini keratinocita (24). Pozitivnom povratnom spregom Th1 limfociti stimuliraju DC na pojačano izlučivanje IL-12 (8). Prema Lowesu, broj Th1 stanica uvjerljivo dominira u krvi i kožnim lezijama oboljelih od psorijaze (2, 6).



Pomoćnički limfociti tipa 2 (Th2) sintetiziraju važne citokine poput IL-4, IL-6 i IL-10. Funkcionalni učinci Th2 stanica suprimiraju ekspresiju citokina tipa I te pospješuju aktivaciju B limfocita, diferencijaciju plazma stanica i posljedičnu proizvodnju imunoglobulina (24). U psorijatičnim lezijama i perifernoj krvi zabilježena je povećana frekvencija aktiviranih B limfocita (25) što ukazuje na njihovu potencijalnu važnu ulogu u razvoju psorijaze.

Pomoćnički limfociti tipa 17 (Th17) su subpopulacija CD4<sup>+</sup> T-stanica koji imaju ključnu ulogu u patogenezi psorijaze. Limfociti Th17 luče citokine poput IL-17A, IL-17F, IL-21 i IL-22, a na svojoj površini izražavaju receptor za IL-23. U upalnim uvjetima u koži keratinociti i DC izlučuju povišene razine IL-23 i time posredno potiču proliferaciju Th17 i Tc17 limfocita kao i hiperplaziju nediferenciranih keratinocita, angiogenezu i infiltraciju neutrofila (26). Upalni citokini tipa I i tipa 17 sinergističkim djelovanjem potiču okolne keratinocite na sintezu antimikrobnih proteina poput  $\beta$ -defenzina 2 i kemokinskih liganada kao što su CCL20 i CCL27 te posredno potpomažu udomljavanje perifernih izvršnih imunskih stanica (27). Lowes i sur. opisuju povećani broj Th17 stanica u psorijatičnim lezijama čiji se broj pak značajno smanjuje primjenom anti-IL-17 terapijskih pripravaka poput secukinumaba i iksekizumaba. Štoviše, primjenom anti-IL-17 terapije većina ispitanika (80%) pokazuje smanjenje histoloških i kliničkih simptoma bolesti (6).

Pomoćnički limfociti Th22 dominantno izlučuju IL-22. Uloga IL-22 može biti zaštitna ili patogena, ali se njegovi učinci u koži često povezuju s hiperplazijom nediferenciranih keratinocita i pojavom akantozе (6). Uz IL-22, te novootkrivene stanice luče i IL-13 i IL-26, a ekspimiraju kemokinske receptore CCR4, CCR6 i CCR10 (29). Aktivacijom Th22 i povećanom proizvodnjom IL-22 dolazi do hiperplazije keratinocita u psorijazi (6).

Regulatorni T-limfociti izražavaju supresivnu aktivnost i sudjeluju u regulaciji imunološkog odgovora lučenjem imunosupresivnih citokina poput TGF- $\beta$  (od engl. transforming growth factor beta), IL-10 i IL-35 utišavajući time imunološki odgovor (28). U kroničnim autoimunim procesima broj i supresivni kapacitet Treg limfocita često je smanjen, a efektorske limfocitne linije postaju imune na njihovo djelovanje (6).

### 1.3.4. Uloga CD8+ limfocita T u razvoju vulgarne psorijaze

Citotoksični limfociti T (Tc) imaju ključnu ulogu u patogenezi vulgarne psorijaze. Izvršne linije CD8+ limfocita čine veliki dio upalnog infiltrata u dermi i epidermi oboljelih od PV (28).

Aktivacija citotoksičnih limfocitnih linija posredovana je vezanjem T staničnog receptora i CD8 koreceptorskih molekula za antigen-MHC I kompleks na površini antigen predočnih stanica. Razvoj efektorskih CD8+ stanica potpomažu aktivirane pomoćničke stanice koje luče IL-2 i potiču klonalnu ekspanziju CD8+ efektor (21).

Citotoksični limfociti tipa I (Tc1) sudjeluju u eliminaciji unutarstaničnih patogena lučenjem upalnih citokina (IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ ) i proteolitičkih enzima (perforin i granzim B). IFN- $\gamma$  pospešuje aktivaciju keratinocita i APC stanica koje pod utjecajem ovog citokina izlučuju kemokinske ligande CXCL9, CXCL10 i CXCL11 odgovorne za kemotaksiju i udomljavanje CXCR3+ efektorskih stanica (24). Frekvencija CXCR3+ CD8+ limfocita T u epidermisu je značajno veća u usporedbi s frekvencijom ovih stanica u perifernoj krvi oboljelih od psorijaze (24). Štoviše, značajan udio limfocita T iz krvi i psorijatičnih lezija proizvode IFN- $\gamma$  (30).

Međutim novije studije ukazuju na dominantnu ulogu citotoksičnih limfocita tipa 17 (Tc17) u psorijazi čija je brojnost u psorijatičnim lezijama povišena (30). Slično kao i Th17 limfociti, Tc17 stanice izlučuju upalne citokine IL-17 i IL-22 koji potiču aktivaciju keratinocita te otpuštanje kemokina CCL20. Nadalje, ekspresijom CCR6, liganda za CCL20, regrutiraju se CCR6+ T-stanice (22). Osim toga, citokin IL-17A povećava sintezu antimikrobnih peptida poput  $\beta$ -defenzina te posredno utječe na proliferaciju keratinocita (31). Važnost IL-17A u PV patogenezi potkrepljuju istraživanja koja opisuju povećanu frekvenciju IL-22+CD8+ i IL-17A+CD8+ limfocita T u psorijatičnim lezijama pri čemu frekvencija pomoćničkih CD4+IL-17+ linija u koži oboljelih ostaje nepromijenjena u odnosu na zdravu kožu (32). Ta činjenica upućuje na dominantnu ulogu citotoksičnih Tc17 limfocita u inicijaciji oboljenja i razvoju psorijatičnih lezija.

Osim navedenih, važnu ulogu u patogenezi psorijaze imaju i citotoksični limfociti tipa 22 (Tc22), koje obilježava izlučivanje IL-22 citokina. Posljedični učinci povećane ekspresije IL-22 u koži uključuju pojačanu proliferaciju i diferencijaciju keratinocita kao i ekspresiju kemokina CXCL1 i CXCL8 (21). U psorijatičnim lezijama pronađena je povećana frekvencija

Tc17 i Tc22 limfocita posebice u epidermalnim slojevima kože oboljelih, upućujući na važnu ulogu ovih staničnih vrsta u patogenezi psorijaze (32).

Pored klasičnih, adaptivnih CD8<sup>+</sup> limfocitnih linija, u psorijazi je nedavno opisana potencijalno važna uloga prirodnih CD8<sup>+</sup> subpopulacija, kao što su NKT stanice (NKT, od engl. natural killer T cells, 0,01-1,18 % perifernih limfocita T; (33)) i MAIT stanice (0,1-9,2 % perifernih limfocita T; (34)). Za razliku od adaptivnih loza, prirodene linije limfocita T izražavaju invarijantne T stanične receptore koji prepoznaju nepeptidne, mikrobne antigene u kompleksu s nekласičnim MHC molekulama poput CD1d ili MR1 (od engl. MHC related molecule 1). Aktivirane linije prirodnih limfocita T posreduju brze i učinkovite efektorske odgovore otpuštanjem IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  i IL-17 proupalnih citokina i proteolitičkih enzima, ključnih medijatora upalnih procesa u psorijazi (35). U koži, CD1d molekule izražavaju dermalne dendritičke stanice i keratinociti koji time pospješuju aktivaciju iNKT stanica (36). Sukladno navedenom, u oboljelih od psorijaze zabilježena je povećana frekvencija iNKT limfocita, te recipročna redukcija njihovog broja u perifernoj krvi (37).

MAIT stanice izražavaju invarijantni T-stanični receptor TCRV $\alpha$ 7.2 i pokazuju visoku razinu ekspresije IL-18 receptora i C-tip lektinskog receptora CD161. S obzirom na koreceptorski status, većina MAIT limfocita su CD8<sup>+</sup> ili dvostruko negativne (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) stanice, a samo mali dio ukupnog broja MAIT stanica čine CD4<sup>+</sup> ili dvostruko pozitivne (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) T limfocitne linije (34). Uloga MAIT stanica u psorijazi do danas je ispitivana u okviru jedne studije analizom površinske ekspresije TCRV $\alpha$ 7.2 staničnog receptora i CD161 i IL-18R biljega koji neprecizno odražavaju udjele MAIT stanica u perifernoj krvi budući je njihova ekspresija zabilježena i u drugih limfocita T poput konvencionalnih  $\alpha\beta$  CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> limfocita te NKT stanica. U okviru navedene studije nisu zabilježene značajne razlike u frekvenciji TCRV $\alpha$ 7.2+CD161+IL-18R<sup>+</sup> stanica periferne krvi zdravih i oboljelih ispitanika. Primijećeno je, međutim, da periferne populacije CD8<sup>+</sup>CD161+TCRV $\alpha$ 7.2+IL-17<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup>CD161+TCRV $\alpha$ 7.2+IL-22<sup>+</sup> limfocita izražavaju povećanu ekspresiju endotelnih selektinskih liganada poput kutanog limfoidnog antigena (CLA, od engl. cutaneous-associated lymphoid antigen) te da pozitivno koreliraju s težinom oboljenja i veličinom PASI indeksa u oboljelih (38).

Navedena istraživanja upućuju dakle na važnu ulogu CD8<sup>+</sup> limfocita T u razvoju psorijaze pri čemu ključne patološke učinke posreduju citotoksične efektorske linije tip 17 imunološkog odgovora. Među njima se izdvajaju pripadnici adaptivne (Tc17/Tc22) i prirodene (NKT,

MAIT) imunosti koji ekspresijom CCR6 i CLA receptora slijede trag koži svojstvenih kemokinskih liganada i trajno naseljavaju upalne regije. U skladu s navedenim, veliki broj istraživanja bilježi povećan broj ovih limfocitnih populacija u dermi i epidermi oboljelih (19, 28, 30, 38, 39). Udjeli i migratorni obrasci perifernih CD8+ linija u PV oboljelih slabije su razjašnjeni i zahtijevaju dodatne analize.

## **2. HIPOTEZA**

1. Brojnost perifernih CD3+CD8+ T-limfocita različita je u zdravih ispitanika i oboljelih od vulgarne psorijaze.
2. Promjene u frekvenciji perifernih CD3+CD8+ T-limfocita povezane su s obilježjima i težinom oboljenja.

### **3. CILJ ISTRAŽIVANJA**

1. Analizirati i usporediti brojnost CD3+CD8+ limfocita T u zdravih ispitanika i oboljelih od vulgarne psorijaze
2. Ustanoviti povezanost brojnosti perifernih CD3+CD8+ populacija s demografskim obilježjima ispitanika i težinom oboljenja.

## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. Materijali

#### 4.1.1. Ispitanici

Istraživanjem su obuhvaćena 22 zdrava (CTRL) i 21 oboljela (PV), punoljetna, nesrodna ispitanika. Probir oboljelih i kontrolnih ispitanika te prikupljanje i analiza perifernih CD8<sup>+</sup> T limfocita, odobreni su odlukom Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Osijek (UR. BROJ: 2158-61-07-18-135) i Kliničkog bolničkog centra Osijek (Potvrda br. R2-9042/2018). Studija je ustrojena kao istraživanje parova.

Oboljeli ispitanici izabrani su na temelju klinički i histološki potvrđene dijagnoze vulgarne psorijaze, a težina bolesti i kvaliteta života određeni su pomoću skale PASI (od engl. Psoriasis Area and Severity Index) i DLQI (od engl. Dermatology Life Quality Index) (40). Isključeni su bolesnici na sistemskoj imunomodulacijskoj ili citostatskoj terapiji, oboljeli od spondiloartropatije, reumatoidnog artritisa i drugih autoimunih oboljenja, malignih, i infektivnih bolesti, te alergijskih reakcija unutar 6 tjedana prije dijagnostičke obrade.

Kontrolnu skupinu činile su zdrave osobe po dobi i spolu podudarne skupini pacijenata.

Od svih ispitanika najprije su pribavljeni informirani pristanci, zabilježeni osnovni antropometrijski (visina, tjelesna masa, BMI – od engl. body mass index) te demografski podaci (dob, spol, trajanje bolesti). U okviru dijagnostičke obrade ispitanika učinjena je analiza kompletne krvne slike (broj eritrocita, leukocita, trombocita i granulocita, količina hemoglobina i hematokrita te mjerenje eritrocitnih parametara – MCV, MCH i MCHC), jetrenih enzima (alanin aminotransferaze, aspartat aminotransferaze i gama glutamil transferaze), C reaktivnog proteina (CRP) i biljega hepatitis B (anti-HBs), hepatitis C (anti-HCV) te citomegalovirus (anti-CMV IgG/M) infekcije.

Veličina PASI indeksa određena je na temelju površine kože zahvaćene lezijama i stupnja eritema čija ukupna numerička vrijednost može varirati od 0 do 72. Sukladno PASI vrijednostima koje su se kretale ispod 10, između 10 i 20 ili iznad 20, klasificirani su lakši, srednje teški ili teški oblici oboljenja. Putem DLQI upitnika provedena je analiza učinka psorijaze na život oboljelih ispitanika.

### 4.1.2. Upotrijebljene kemikalije

- Lymphoprep™ (Stemcell Technologies, Vancouver, Kanada)
- LIVE/DEAD™ Fixable Dead Cell Stain Kits (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD)
- Human TruStain FcX™ (BioLegend, San Diego, Kalifornija, SAD)
- anti-human CD3ε FITC (donacija prof. Petera Balogha, Medicinski fakultet Sveučilišta u Pečuhu, klon UCHT1 gamma)
- Anti-human CD8a PerCP-Cyanine5.5 (eBioscience, klon RPA-T8)
- ArC™ Amine Reactive Compensation Bead Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD)
- Anti-Mouse Ig, κ/Negative Control Compensation Particles Set (BD, Franklin Lakes, New Jersey, SAD)

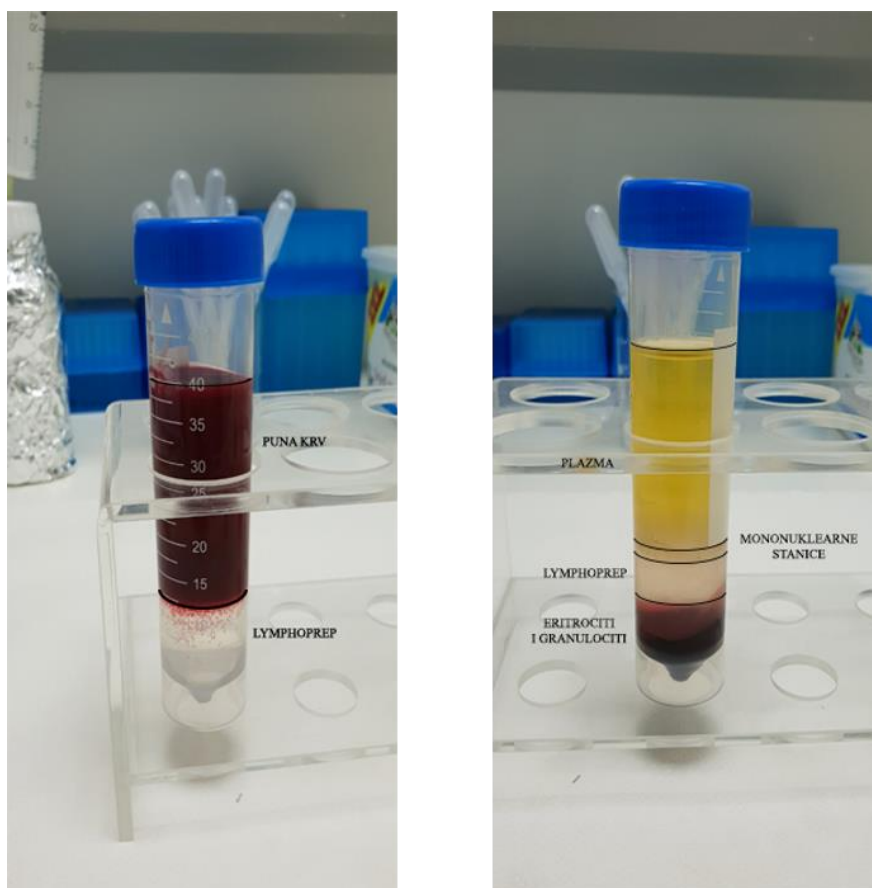
## 4.2. Metode

### 4.2.1. Izolacija ukupnih perifernih leukocita (PBMC) iz pune krvi

Izolacija ukupnih leukocita provedena je iz svježe izuzetih, jutarnjih uzoraka venske krvi upotrebom Lymphoprep medija za odvajanje i izolaciju mononuklearnih stanica metodom centrifugiranja u gradijentu gustoće.

Postupak: U Falcon epruvetu volumena 50 ml ispipetirano je 10 ml Lymphoprep medija. Uzorak heparizirane krvi volumena 10 ml potom je razrijeđen fiziološkom otopinom u omjeru 1:1. Uzorak razrijeđene krvi pažljivo je nadslojen na površinu Lymphoprep medija pazeći da ne dođe do miješanja otopina (**Slika 1.a**). Uzorci su zatim centrifugirani 25 minuta na temperaturi od 25°C, brzinom od 800g, bez kočenja.

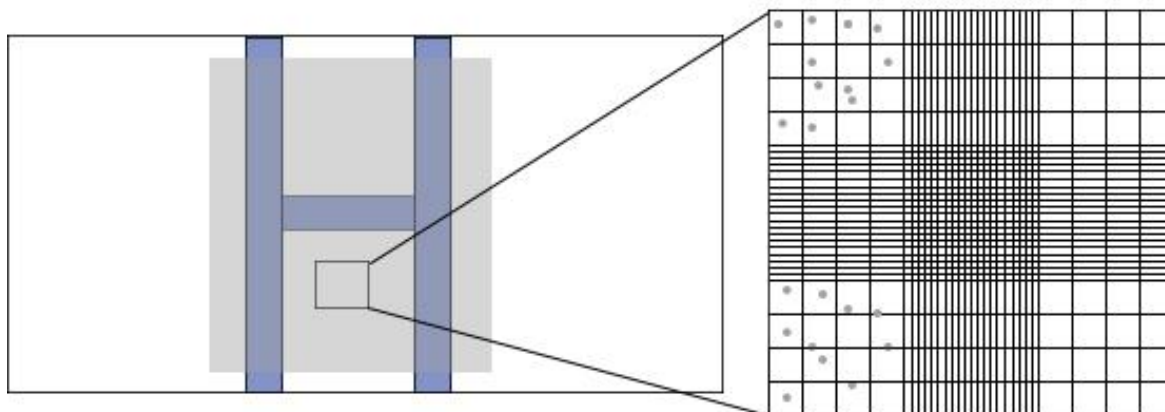




**Slika 1. Postupak odvajanja mononuklearnih (PBMC) stanica a) prije centrifugiranja i b) poslije centrifugiranja u Lymphoprep™ mediju**

Nakon centrifugiranja, sloj perifernih mononuklearnih stanica (PBMC, engl. peripheral blood mononuclear cells), prisutan između plazme i Lymphoprep medija, pažljivo je uklonjen pipetiranjem bez dodirivanja istaloženih eritrocita i granulocita (**Slika 1.b**). Odvojeni PBMC uzorci prebačeni su u novu Falcon epruvetu volumena 15 ml te isprani dodatkom PBS pufera (bez goveđeg serumskog albumina (BSA, od engl. bovine serum albumin) do vrha epruvete.

U sljedećem koraku, PBMC uzorci istaloženi su tijekom petominutnog centrifugiranja pri brzini od 800g i temperaturi od 25°C s max. brzinom ubrzanja (9) i max. brzinom kočenja (9). Supernatant je odbačen, a istaložene stanice resuspendirane su u 8 ml PBS pufera. Nakon novog petominutnog ciklusa centrifugiranja pri brzini od 550 g, supernatant je uklonjen, a istaložene stanice resuspendirane u 5 ml PBS pufera. Broj stanica u suspenziji određen je brojanjem pomoću Bürker-Türk komorice i svjetlosnog mikroskopa (**Slika 2**).



**Slika 2. Bürker-Türk komorica za brojanje stanica.** Stanice se vizualiziraju Tripan blue bojom. U mrtve stanice ulazi boja zbog čega ih vidimo kao plavo obojene, dok žive stanice ostaju neobojene te njih brojimo pod svjetlosnim mikroskopom. Broj živih stanica u 1 ml stanične suspenzije određen je putem jednadžbe: koncentracija stanica = (Broj stanica/4) $\times$ 3\*  $\times$  10<sup>4</sup>/ml; \*Dilucijski faktor je 3. Slika (autorski rad) je napravljena računalnim programom Adobe Photoshop (Adobe Photoshop CS6, San Jose, Kalifornija, SAD)

#### 4.2.2. Priprema stanica za analizu protočnom citometrijom

Tehnikom protočne citometrije sortiraju se i analiziraju stanice koje prolaskom kroz laserske zrake dijelom raspršuju, a dijelom absorbiraju svjetlosno zračenje. Citometar se sastoji od protočnog sustava koji donosi uzorak do detektora, lasera čiji se izvor svjetlosti koristi za rasap i fluorescenciju te optike koji hvata i usmjerava odbijenu svjetlost. Prolazak stanica kroz sustav se osigurava fiziološkom otopinom. Rasipanje i emisija absorbiranog laserskog zračenja ovise o veličini, obliku, granuliranosti i fluorescentnom obojenju pojedinih stanica u suspenziji koje detektiraju FSC (od engl. Forward Scatter) detektori za određivanje veličine, SSC (od engl. Side Scatter) detektorima za određivanje granuliranosti te fluorescentnim detektorima. Podaci dobiveni prolaskom stanica pored detektora prevode se u brojčane vrijednosti iz kojih je moguće dobiti grafički prikaz u obliku histograma ili dotplota. Na taj način moguće je razlikovati i definirati pojedine stanične populacije unutar heterogene stanične suspenzije. Za uspješnu imunofenotipizaciju CD3+CD8+ limfocita T najprije je učinjeno nekoliko pripremnih bojanja.

#### **4.2.2.1. Obilježavanje živih i mrtvih stanica**

Bojanje živih i mrtvih stanica učinjeno je upotrebom komercijalnog kita „LIVE/DEAD™ Fixable Dead Cell Stain Kits“ prema uputama proizvođača. Radna razrjeđenja fluorescentne boje koja specifično veže mrtve, ali ne i žive stanice pripremljena su dodatkom 50 µl DMSO otopine u tubicu s fluorescentnom reaktivnom bojom (Komponenta A).

Postupak: Za bojanje ispitivanih uzoraka pripremljeni su odgovarajući alikvoti PBMC stanica ukupne koncentracije  $1 \times 10^6$  st/ml. U svaki alikvot dodan je 1 µl pripremljene LIVE/DEAD boje te su uzorci nakon kratkog miješanja na vortex mješalici inkubirani 30 minuta u mraku na  $+4^\circ\text{C}$ . Nakon inkubacije, stanice su isprane dodatkom 1 ml PBS bez BSA te potom istaložene centrifugiranjem 5 minuta na  $350g$ . Supernatant je odbačen, a istaložene stanice resuspendirane u 95 µl PBS pufera s 1% udjelom BSA.

#### **4.2.2.2. Inhibicija nespecifičnog vezanja protutijela**

U sljedećem koraku, dodatkom Human TruStain FcX™ komercijalnog reagensa, onemogućeno je nespecifično vezanje protutijela za Fc receptore (FcR) izražene na površini PBMC stanica. Na ovaj način sprječava se neželjeno obilježavanje stanica koje izražavaju FcR i mogu uzrokovati pojavu lažno pozitivnih rezultata.

Postupak: U pripremljenu suspenziju  $1 \times 10^6$  st u 95 µl PBS+1% BSA dodano je 5 µl Human TruStain FcX™ reagensa i uzorci su zatim inkubirani 5-10 minuta na sobnoj temperaturi.

#### **4.2.2.3. Bojanje PBMC uzoraka fluorescentno obilježenim protutijelima i protočna citometrija**

Suspenzija PBMC stanica koncentracije  $1 \times 10^6$  st/ml obilježena je primjenom CD3 FITC (1:250, klon UCHT1 gamma, donacija prof. Petera Balogha, Sveučilište u Peču) i CD8α PerCP-Cy5.5 (1:200, clone RPA-T8, eBiosciences) monoklonalnih protutijela. Radna razrjeđenja navedenih reagensa pripremljena su prema prikazu u Tablici 1., i zatim ujedinjena

u obliku finalne smjese volumena 4300  $\mu$ l [1720  $\mu$ l radno razrjeđenje protutijela + 2580  $\mu$ l pufera za obilježavanje stanica (PBS+1% BSA + 0.09%NaN<sub>3</sub>)].

**Tablica 1. Prikaz pripreme protutijela za bojanje PBMC stanica kontrolnih (N=22) i oboljelih (N=21) ispitanika**

Protutijelo	V protutijela/uzorku ( $\mu$ l)	n uzoraka	Ukupni volumen protutijela	Volumen pufera PBS+1% BSA + 0.09 % NaN <sub>3</sub> )	Ukupni volumen razrjeđenja protutijela
FITC CD3	0,4	43	17,2	842,8	860
PerCP CD8	2,5	43	107,5	752,5	860
PBS+0,1 % BSA+0.09 % NaN <sub>3</sub>					2580
Pipetirati 100 $\mu$ l po uzorku					4300

U 100  $\mu$ l stanične suspenzije svakog ispitivanog uzorka dodano je zatim 100  $\mu$ l finalne smjese te je mješavina stanica i protutijela inkubirana u mraku 30 minuta na +4°C. Nakon inkubacije uzorci su isprani dodatkom 2 ml PBS pufera, a obilježene stanice potom istaložene centrifugiranjem 5 minuta na 350g. Supernatant je odbačen, a postupak ispiranja opisan u prethodnoj rečenici ponovljen je još jedanput. Stanice su potom resuspendirane u 500  $\mu$ l PBS pufera i analizirane pomoću BD FACS Canto II protočnog citometra (FACS Canto II, Becton Dickinson, SAD). Frekvencija CD3+CD8+ stanica određena je primjenom računalnog programa FlowLogic (Inivai Technologies, Australija).

#### **4.2.3. Priprema „single-stain“ kontrola za izradu kompenzacijske matrice i kompenzaciju višebojne analize na protočnom citometru**

Prilikom analize višestrukih biljega na ispitivanim stanicama potrebno je najprije ispitati intenzitet fluorescencije svakog pojedinačnog biljega na pozitivno i negativno obilježenim staničnim populacijama. U tu svrhu rade se jednobojne ili „single stain“ kontrole

svakog protutijela koje se planira primijeniti u višebojnoj analizi. Zabilježeni signali „single stain“ kontrola služe za izradu kompenzacijske matrice koja se primjenjuje u višebojnoj analizi, a u svrhu precizne diferencijacije staničnih subpopulacija.

Kompenzacijske kuglice komercijalno su dostupne mikrosfere koje se često primjenjuju u izradi „single stain“ kontrola zato što imaju sposobnost vezati  $\kappa$  lance ispitivanih monoklonalnih protutijela. U sklopu komercijalnih setova na raspolaganju su kuglice koje vežu (pozitivna kontrola) i kuglice koje ne vežu (negativna kontrola) protutijela. Njihova uloga je omogućiti jasno razlikovanje pozitivnih i negativnih signala koji se mogu dobiti nakon jednoboje analize i na taj način olakšati izradu kompenzacijske matrice.

U našim eksperimentima, kompenzacija LIVE/DEAD viability boje učinjena je pomoću komercijalnog kompleta „ArC™ Amine Reactive Compensation Bead Kit“, a kompenzacija signala višestrukih monoklonalnih protutijela pomoću „Anti-Mouse Ig,  $\kappa$ /Negative Control Compensation Particles Set“ seta reagensa.

#### **4.2.3.1. Kompenzacija viability boje iz LIVE/DEAD kompleta**

Postupak: Prije korištenja kratko su vorteksirane komponente A i B kompleta ArC™ Amine Reactive Compensation Bead. U označenu FACS dodana je 1 kapljica ArC™ Amine Reactive komponente i inkubirana na sobnoj temperaturi 5 minuta. Zatim je dodan 1  $\mu$ l prethodno pripremljene viability boje iz kompleta „LIVE/DEAD™ Fixable Dead Cell Stain“. Slijedila je inkubacija u mraku na sobnoj temperaturi tijekom 30 minuta. Nakon inkubacije dodano je 3 ml PBS pufera i kuglice su istaložene centrifugiranjem 5 minuta na 300g. Poslije centrifugiranja, odstranjen je supernatant, a pelet je resuspendiran dodatkom 0,5 ml PBS pufera. U konačnici, dodana je 1 kapljica Arc negativne komponente B, sve je dobro promiješano i zatim analizirano na protočnom citometru.

#### **4.2.3.2. Kompenzacija višebojne analize u protočnoj citometriji**

Postupak: Kratko su vorteksirane komponente A i B, kompleta Anti-Mouse Ig,  $\kappa$ /Negative Control Compensation Particles. Tubice su označene nazivima korištenih protutijela. Nakon toga pipetirano je 100  $\mu$ l pufera za bojanje (PBS+0,1%BSA+0,09%NaN<sub>3</sub>). Dodana je 1 kapljica CompBeads Negative Control reagensa i 1 kapljica CompBeads Anti-Mouse Ig,  $\kappa$  kuglice u svaku tubicu. Povrh kompenzacijskih kuglica u označene tubice

pipetirano je 20  $\mu$ l odgovarajućeg radnog razrjeđenja protutijela te je slijedila inkubacija u mraku tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije kompenzacijske kuglice su isprane dodatkom 2 ml pufera za bojanje i potom istaložene centrifugiranjem 10 minuta na 200g. Supernatant je odbačen, a pelet resuspendiran u 500  $\mu$ l pufera za bojanje. Pripremljeni uzorci su zatim propušteni kroz protočni citometar.

#### **4.2.4. Statistička analiza rezultata**

Kategoričke varijable prikazane su apsolutnim frekvencijama i proporcijama, a omjerne varijable medijanom s interkvartilnim rasponom (IQR). Normalnost distribucije 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 ( $\rho$ ). Tablice kontingencije analizirane su Fisher exact testom. Dvostrani  $P < 0,05$  predstavlja prag značajnosti. Ukoliko nije drugačije naznačeno, svi testovi i grafički prikazi učinjeni su MedCalc (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgija) programom.

## 5. REZULTATI

### 5.1. Klinička i biokemijska obilježja ispitanika

Demografska i klinička obilježja ispitanika prikazana su u Tablici 2. Skupina zdravih i oboljelih ispitanika nisu se značajno razlikovale po spolu, dobi ili BMI. Također, nisu zabilježene značajne razlike u CMV IgG/M seropozitivnosti i serumskoj razini CMV IgG/M protutijela. Svi ispitanici bili su negativni za anti-HCV i HBsAg, a anti-HBs IgG protutijela zabilježena su u 9/21 oboljelih i 12/22 zdravih ispitanika, najvjerojatnije kao posljedica obaveznog programa cijepljenja u Republici Hrvatskoj. Povezanost između titra virusnih protutijela i veličine PASI ili DLQI indeksa, nije uočena.

**Tablica 2. Demografska i klinička obilježja ispitanika.** Vrijednosti su ispitivane u skupini oboljelih (PV) i zdravih ispitanika (CTRL).

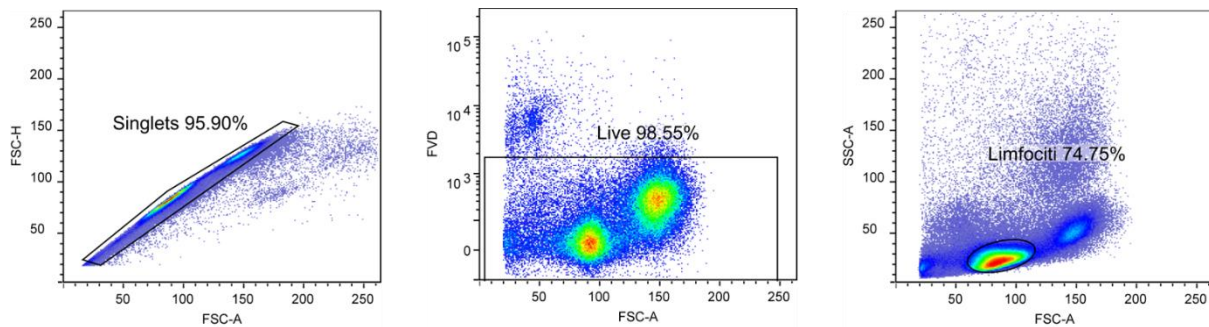
Skupina	PV (N=21)	CTRL (N=22)	P-vrijednost
N (M/Ž omjer)	21 (14/7)	22 (16/6)	0,75**
Dob (godine)	33 (27-39)	32 (28-40)	0,922*
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25,2 (21,3-29,1)	24,7 (20,7-27,1)	0,356*
hsCRP (mg/l)	2 (0,7-3,2)	0,8 (0,5-1,8)	0,06*
PASI	7,7 (5,5-12,5)	-	-
DLQI	3,0 (1,0-6,5)	-	-
Anti-CMV IgG (poz/neg)	13/4	17/3	0,68**
Anti-CMV IgG (AU/ml)	145 (29-185)	136 (72-184)	0,866*
Anti-CMV IgM (poz/neg)	1/16	0/18	0,485**
Anti-HBs IgG (mIU/ml)	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 tjelesna mase; hsCRP – visoko osjetljivi C reaktivni protein; PASI – Psoriasis Area and Severity Index; DLQI – Dermatological Life Quality Index; CMV – cytomegalovirus; HBs – hepatitis B, površinski antigen; IgG/M – imunoglobulin G/M.

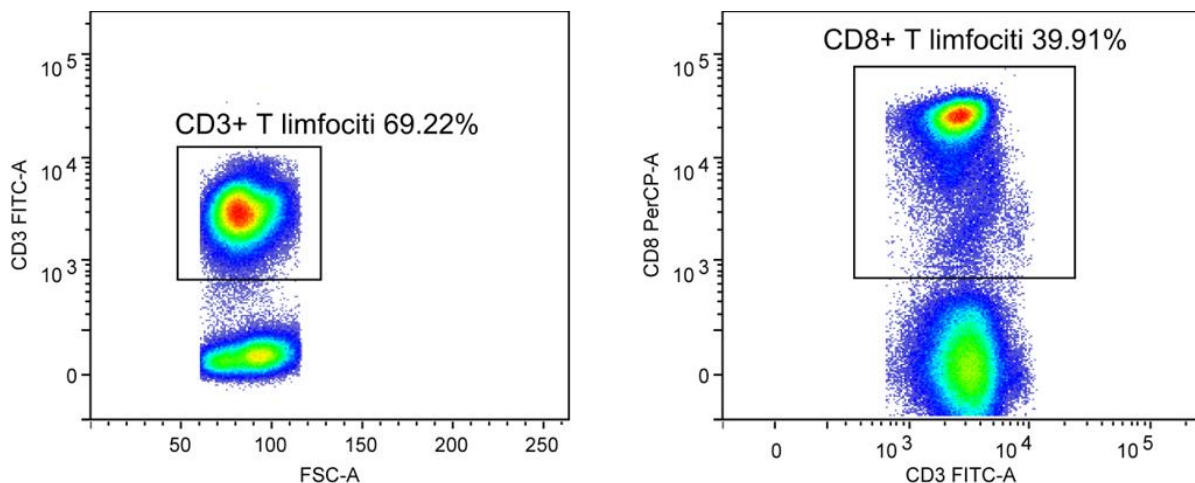
## 5.2. Periferni udjeli CD8+ limfocita T u PV i CTRL ispitanika

Brojnost perifernih CD3+CD8+ limfocita T određena je protočnom citometrijom sukladno strategiji susljednog otvaranja prozora za izdvajanje jednostrukih živih mononuklearnih stanica (Slika 3.a).

a)



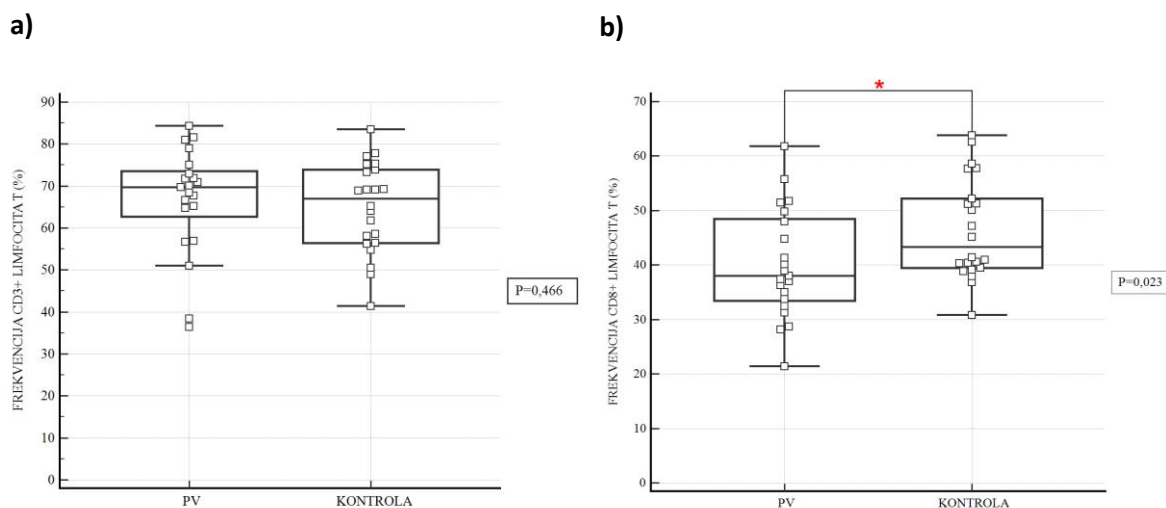
b)



**Slika 3. Reprezentativni primjer analize CD8+ limfocita T iz periferne krvi zdravih i oboljelih ispitanika protočnom citometrijom.** Prikaz strategije susljednog postavljanja prozora za analizu jednostrukih, živih CD8+ 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 CD8 limfocita T definirane su na temelju površinske ekspresije CD3 i CD8 staničnih biljega. Sve analize provedene su na protočnom citometru BD FACS Canto II i analizirane primjenom Flow Logic računalnog programa.

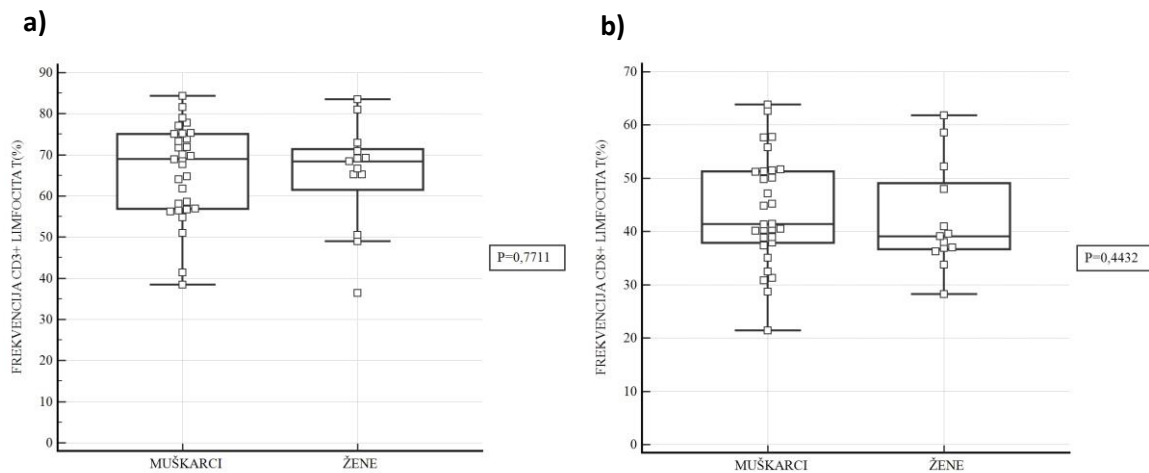


Značajne razlike u frekvenciji ukupnih CD3+ limfocita T u PV [median;  $M_e=69,7$  (IQR (62,8-73,5) %) i kontrolnih ispitanika [ $M_e=68,6$  (56,4-73,9) %;  $P=0,466$ ] nisu zabilježene (**Slika 4.a**). Međutim, periferni udjeli CD3+CD8+ limfocita T bili su značajno smanjeni u PV [38,0 (33,4-48,5) %;  $P=0,023$ ] u odnosu na zdrave kontrole [43,3 (39,5-52,2) %] (**Slika 4.b**).



**Slika 4. Brojnost CD3+ i CD3+CD8+ limfocita T u perifernoj krvi oboljelih (N=21) i zdravih (N=22) ispitanika.** Brojnost a) CD3+ b) CD3+CD8+ limfocita T grafički je prikazana pravokutnim ili box-plot dijagramom. Unutar svakog box-plota nalazi se horizontalna linija koja predstavlja vrijednost medijana. Gornju i donju liniju box-plota čine interkvartilni rasponi (IQR)  $IQR_3$  i  $IQR_1$ . Vertikalne linije predstavljaju  $1.5 \times IQR$ . Ekstremne vrijednosti prikazane su praznim kvadratićima. Razlike između skupina određene su primjenom Mann-Whitney testa. Prag značajnosti definiran je kao dvostrani  $P < 0,05$ .

Nakon preraspodjele skupina u odnosu na spol, nisu uočene statistički značajne razlike u frekvenciji CD3+ ili CD3+CD8+ limfocita u perifernoj krvi muškaraca i žena, neovisno o zdravom ili oboljelom statusu ispitanika (**Slika 5**). Prilikom usporedbe CD3+CD8+ frekvencije u oboljelih i zdravih ispitanika muškog [PV (N=14) vs, CTRL (N=16):  $M_e=39,53$  (32,46-49,8) % vs.  $M_e=46,15$  (40,32-54,45) %;  $P=0,067$ ], odnosno ženskog spola [PV (N=7) vs, CTRL (N=6):  $M_e=37$  (34,36-45,50) % vs.  $M_e=40,23$  (39,07-52,22) %;  $P=0,198$ ], značajna razlika također nije uočena.



**Slika 5. Brojnost CD3+ i CD3+CD8+ limfocita T u perifernoj krvi muškaraca (N=30) i žena (N=13). Razlike između skupina određene su primjenom Mann-Whitney testa. Prag značajnosti definiran je kao dvostrani  $P < 0,05$ .**

### **5.3. Povezanost demografskih i kliničkih obilježja s raspodjelom perifernih CD3+CD8+ limfocita T**

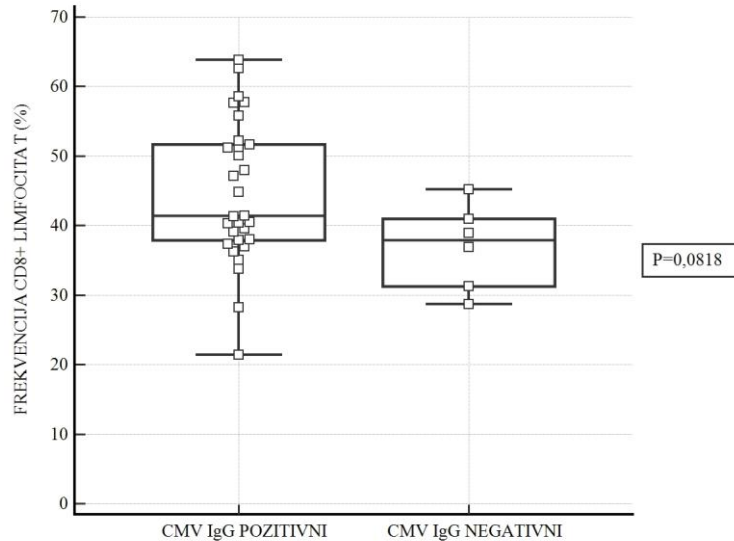
Spearmanovom analizom ispitano je postoji li povezanost između brojnosti CD3+CD8+ limfocita T i kliničkih obilježja ispitanika, poput dobi, BMI, PASI i DLQI statusa, HBs i CMV seropozitivnosti.

U ukupnoj populaciji ispitanika (N=43), povezanost CD3+ ili CD3+CD8+ frekvencije s dobi, spolom, BMI, PASI i DLQI statusom te biljezima HBV i CMV infekcije nije zabilježena (**Tablica 3**).

**Tablica 3. Rezultati analize povezanosti frekvencije CD3+ i CD3+CD8+ limfocita s biljezima virusne infekcije, dobi i težinom oboljenja.**  $\rho$  predstavlja Spearmanov koeficijent korelacije, a prag značajnosti definiran je kao  $P < 0,05$ .

		<b>CD3+ LIMFOCITI T (%)</b>	<b>CD3+CD8+ LIMFOCITI T (%)</b>	
<b>anti-HBs</b>	$\rho$	0,172	0,057	
	<b>IgG</b>	<b>P</b>	0,3557	0,7589
	<b>(mIU/ml)</b>	<b>N</b>	31	31
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	$\rho$	0,248	0,092	
	<b>P</b>	0,1086	0,5565	
	<b>N</b>	43	43	
<b>CMV IgG (AU/ml)</b>	$\rho$	0,169	0,032	
	<b>P</b>	0,3254	0,8542	
	<b>N</b>	36	36	
<b>hsCRP (mg/l)</b>	$\rho$	-0,020	-0,139	
	<b>P</b>	0,9127	0,4495	
	<b>N</b>	32	32	
<b>DLQI</b>	$\rho$	-0,131	-0,118	
	<b>P</b>	0,5703	0,6115	
	<b>N</b>	21	21	
<b>DOB (godine)</b>	$\rho$	0,140	-0,088	
	<b>P</b>	0,3699	0,5753	
	<b>N</b>	43	43	
<b>PASI</b>	$\rho$	0,136	-0,009	
	<b>P</b>	0,5574	0,9688	
	<b>N</b>	21	21	

Međutim, uočeno je da CMV seropozitivni ispitanici (N=30), u združenom uzorku oboljelih i zdravih kontrola, posjeduju marginalno veće udjele perifernih CD3+CD8+ limfocita u odnosu na CMV seronegativne osobe (N=6) [CMV IgG poz. vs. CMV IgG neg.:  $M_e=41,4$  (37,8-51,8) % vs. 38,0 (30,6-42,0) %; Mann-Whitney  $P=0,086$ ] (**Slika 6**), uz ograničenu snagu testiranja.



**Slika 6. Brojnost CD3+CD8+ limfocita T kod CMV IgG pozitivnih (N=30) i CMV IgG negativnih (N=6) ispitanika.** Razlike između skupina ispitanika određene su primjenom Mann-Whitney testa. Prag značajnosti definiran je kao  $P < 0,05$ .

U skupini PV ispitanika (N=21), frekvencija perifernih CD3+ i CD3+CD8+ limfocita bila je neovisna o ispitivanim antropometrijskim, kliničkim i virusnim parametrima. U podskupini oboljelih ženskih ispitanika nije bilo dovoljno opažanja za smislenu analizu.

U skupini zdravih ispitanika nisu zabilježene značajne korelacije između perifernih udjela CD3+ ili CD3+CD8+ limfocita T i demografskih i antropometrijskih obilježja.

## 6. RASPRAVA

Rastući broj studija ukazuje na ključnu ulogu CD8<sup>+</sup> limfocita T u inicijaciji i širenju upale u koži oboljelih od psorijaze. Među njima pripadnici tip 17 imunskog odgovora posreduju glavnu patoloških promjena koje pak nastaju kao posljedica indirektnih učinaka povećane ekspresije IL-17/IL-22 upalnih citokina ili direktnog citotoksičnog djelovanja Tc17/Tc22 efektorskih linija u koži. Pri tome dolazi do aktivacije rezidentnih dendritičkih stanica u koži, pojačane ekspresije antimikrobnih proteina, dediferencijacije keratinocita i ekspresije kemokinskih liganada koji potiču infiltraciju perifernih limfocitnih linija. Posljedične promjene perifernih udjela CD8<sup>+</sup> limfocita T kao i povezanost promjene njihovih frekvencija sa obilježjima i progresijom psorijaze su međutim, slabije istraženi.

Stoga je u okviru ove studije provedena analiza i usporedba brojnosti CD3<sup>+</sup> i CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> limfocita T kod oboljelih od vulgarne psorijaze i zdrave kontrolne skupine. Analizirani su i potencijalni međuzavisni odnosi frekvencije perifernih CD3<sup>+</sup> i CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> limfocita T s dobi, spolom, BMI, PASI i DLQI statusom te serumskim vrijednostima CRP, anti-HBs i anti-CMV IgM/IgG protutijela.

Inicijalnom analizom demografskih i kliničkih obilježja oboljelih i kontrolnih ispitanika nisu zabilježene značajne razlike u odnosu na dob, spol, BMI status i vrijednosti serumske razine CRP. Nijedna osoba u trenutku provedbe istraživanja nije bolovala od akutne infekcije hepatitisom B ili C. Kod osoba s pozitivnim nalazom anti-CMV IgG i/ili anti-HBs protutijela najvjerojatnije se radi o prethodnoj imunizaciji u okviru ranije izloženosti virusu ili cjepivu.

Rezultati analize brojnosti perifernih limfocita T pokazali su značajno smanjenu frekvenciju CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> limfocita T u skupini oboljelih u odnosu na zdrave ispitanike (**Slika 4**). Prethodne studije opisuju pak povećani udio CD8<sup>+</sup> limfocita T u koži oboljelih od psorijaze. U tom kontekstu, rezultati smanjene frekvencije CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> limfocita T u uzorcima periferne krvi oboljelih potencijalno odražavaju posljedice njihovog povećanog nakupljanja u koži. U prilog ovoj hipotezi govore studije koje opisuju povećane udjele IL-17<sup>+</sup>/INF- $\gamma$ CD8<sup>+</sup> i IL-22<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> stanica u koži (32, 41) koje pak izražavaju kemokinske receptore CCR6 i adhezijske molekule poput CLA koji pospješuju kemotaksiju aktiviranih limfocita T i posljedičnu proizvodnju kemokinskih liganada u koži. Nasuprot tome, Sigmundstottir i sur. opisuju izostanak značajne razlike u frekvenciji perifernih CD8<sup>+</sup> limfocitnih populacija između oboljelih i zdravih ispitanika. Istovremeno, bilježi se i povećani broj CD8<sup>+</sup>CLA<sup>+</sup> subpopulacija u perifernoj krvi oboljelih (42). Ekspresija kutanog limfoidnog antigena na

perifernim linijama CD8<sup>+</sup> limfocita T nažalost nije ispitivana u okviru naše studije i zahtjeva dodatne analize u budućim studijama.

U svrhu istraživanja međusobne povezanosti kliničkih obilježja i frekvencije perifernih CD3<sup>+</sup> i CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> stanica, analizirana je ovisnost promjene njihovog broja o veličini PASI i DLQI indeksa. Značajne korelacije na razini ukupne populacije ili pojedinačnih skupina oboljelih i zdravih ispitanika nisu zabilježene. U okviru prethodne studije, Tenuissen i sur. uočili su da PASI pozitivno korelira s udjelom IL-17A<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> stanica, ali ne i IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> ili IL-22<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> stanica u perifernoj krvi oboljelih od psorijaze (38). Ovakvi korelacijski obrasci potencijalno postoje i u okviru naše populacije ispitanika, ali su ostali neotkriveni budući da periferne subpopulacije CD8<sup>+</sup> stanica nisu detaljnije fenotipizirane, a većina ispitanika imala je blaži oblik bolesti.

Ipak, i u ovim ograničenim okvirima zabilježena je nekolicina zanimljivih razlika i korelacija, koje se pojavljuju neovisno o zdravom ili oboljelom statusu ispitanika. S tim u skladu, u ukupnoj populaciji ispitanika primijećena je značajno veća frekvencija CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> limfocita T u CMV seropozitivnih, u odnosu na CMV seronegativne osobe.

Citomegalovirus porijeklom je iz porodice humanih herpes virusa te djeluje kao uzročnik mononukleoze i encefalitisa, a u imunokomprimiranih osoba često se nalazi u pozadini plućnih, jetrenih i probavnih oboljenja (43). Nakon primarne infekcije, CMV ostaje trajno prisutan u ljudskom organizmu, a latentna infekcija može se dokazati određivanjem anti-CMV IgG protutijela u serumu. Mnogobrojne studije opisuju međuovisnost CMV infekcije i brojnosti CD8<sup>+</sup> limfocita. U skladu s navedenim, u oboljelih od psorijaze zabilježena je pozitivna korelacija između CMV seropozitivnog statusa i veličine PASI skale pri čemu je u CMV seropozitivnih, u odnosu na CMV seronegativne ispitanike utvrđen značajno veći broj CD8<sup>+</sup> stanica (44). Nadalje, u serumu oboljelih od psorijaze uočene su značajno povišene vrijednosti titra anti-CMV IgG protutijela ( $\geq 6$  AU/ml) što ukazuje na važnost prethodnih ili aktivnih CMV infekcija u psorijazi. Asadullah K. i sur. također bilježe prisutnost CMV antigena kod oboljelih od psorijaze koji jednako kao i naši ispitanici nisu pokazivali znakove aktivne infekcije (45). Rezultati studije potvrđuju prethodno opisane međuzavisne odnose između CMV infekcije i brojnosti CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> limfocita T u perifernoj krvi te ukazuju na važnost testiranja biljega CMV infekcije prilikom interpretacije rezultata vezanih uz analize brojnosti perifernih CD8<sup>+</sup> stanica u psorijazi.

Razvoj psorijaze vezan je i uz pojavu različitih metaboličkih promjena i sindroma. Pretilost predstavlja važan rizični čimbenik u patogenezi psorijaze. Štoviše, utvrđeno je da pretili, HLA-Cw6 pozitivne osobe imaju 35 puta veći rizik od obolijevanja nego HLA-Cw6

negativni pojedinci normalne tjelesne težine (16). U tom kontekstu, Kong i sur. opisuju mehanizme u pozadini razvoja psorijaze, a koji su potencijalno vezani uz promjene na adipoznom tkivu i pridruženim promjenama u sintezi i izlučivanju upalnih citokina poput TNF- $\alpha$  i IL-6 (46). Jedan od upalnih biljega koji je proučavan u okviru navedene studije jest adiponektin, produkt adipocita koji inhibira sintezu i lučenje IL-17 od strane aktiviranih CD8+ stanica. Vrijednosti adiponektina u oboljelih od psorijaze bile su značajno snižene i negativno vezane uz povišeni BMI status (46). Brojnost CD3+CD8+ limfocita T u perifernoj krvi, uz BMI status, mijenja se i u odnosu na spol, pri čemu zdravi muškarci pokazuju značajno veću frekvenciju perifernih CD3+CD8+ linija u odnosu na dobno podudarne, zdrave žene (47). Navedeni učinci BMI statusa i dobi nisu zabilježeni u okviru ispitivane populacije koju čini veći broj muškaraca relativno uskog raspona BMI. U tom kontekstu, ulogu spola i BMI statusa u psorijazi potrebno je dodatno istražiti u bolje balansiranom, brojnijem uzorku ispitanika većeg BMI raspona stratificiranih u odnosu na dob, spol i BMI.

Rezultati ovog istraživanja opisuju smanjene udjele CD3+CD8+ limfocita T u perifernoj krvi oboljelih od psorijaze te ukazuju na učinke prethodne CMV infekcije u regulaciji brojnosti perifernih CD3+CD8+ limfocitnih linija u zdravih i oboljelih ispitanika. Dodatna istraživanja na većem broju ispitanika, raznolikog BMI i CMV statusa uz primjenu šireg spektra imunofenotipizacijskih biljega, potrebna su za identifikaciju potencijalno patogenih CD8+ limfocitnih vrsta u psorijazi.

## 7. ZAKLJUČAK

- U usporedbi sa zdravim kontrolama, oboljeli od psorijaze imaju značajno snižene udjele CD3+CD8+ limfocita T u perifernoj krvi
- Promjena perifernog udjela CD3+CD8+ limfocita T u oboljelih od psorijaze nije povezana s dobi, spolom i veličinom PASI i DLQI skale
- CMV seropozitivni ispitanici imaju veće periferne udjele CD3+CD8+ limfocita T u odnosu na CMV seronegativne pojedince



## 8. SAŽETAK

**Uvod:** Vulgarna psorijaza je kronična bolest kože posredovana združenim djelovanjem rizičnih okolišnih čimbenika i nekontroliranog imunološkog odgovora na nepoznate antigene. Velik udio upalnog leukocitnog infiltrata čine CD8<sup>+</sup> citotoksični limfociti T koji lučenjem IL-17/IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  potiču razvoj upalnog mikrookoliša u koži, proliferaciju i dediferencijaciju keratinocita i posljedični razvoj ljuskavih plakova.

**Cilj istraživanja:** Analizirati i usporediti brojnost CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> limfocita T u oboljelih i zdravih ispitanika te ustanoviti povezanost njihove promjene s demografskim i kliničkim obilježjima psorijaze.

**Materijali i metode:** Istraživanjem su obuhvaćeni uzorci periferne krvi 22 zdrava (CTRL) i 21 oboljelog (PV) ispitanika. Periferni leukociti izolirani su centrifugiranjem u gradijentu Lymphoprep™ medija. Mrtve stanice isključene su primjenom boje za određivanje vijabilnosti stanica („LIVE/DEAD™ Fixable Dead Cell Stain Kits“), a imunofenotipizacija CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> stanica provedena protočnom citometrijom (BD FACS Canto II) nakon obilježavanja s anti-human CD3 FITC i CD8 PerCP monoklonalnim protutijelima. FlowLogic računalni program korišten je za obradu podataka.

**Rezultati:** U odnosu na kontrolne ispitanike, oboljeli od PV pokazuju značajno smanjene udjele CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> limfocita T u perifernoj krvi čiji su udjeli značajno veći u CMV seropozitivnih nego CMV seronegativnih ispitanika.

**Zaključak:** U odnosu na zdrave ispitanike, PV oboljeli imaju značajno snižene udjele CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> limfocita T u perifernoj krvi na čiju brojnost značajno utječu prethodne CMV infekcije.

**Ključne riječi:** CD8<sup>+</sup> T-limfociti; CMV imunoglobulin; indeks tjelesne mase; interferon-gama; psorijaza

## 9. SUMMARY

### THE ROLE OF PERIPHERAL CD3+ CD8+ T LYMPHOCYTES IN INITIATION AND PROGRESSION OF PSORIASIS VULGARIS

**Introduction:** Psoriasis vulgaris (PV) is a chronic skin disease, mediated by environmental risk factors and aberrant immune response to unknown antigens. CD8+ cytotoxic lymphocytes make a large proportion of the leukocyte infiltrate. Their secretion of IL-17/IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  helps in growing inflammatory state in a skin, keratinocytes proliferation and dedifferentiation and consequently, forming scaly plaques.

**Objectives:** To examine and compare frequency of CD3+CD8+ T lymphocytes in PV patients and healthy controls and determine their association with demographic and clinical features of psoriasis.

**Material and methods:** Peripheral blood was collected from 21 PV patients and 22 healthy controls. Peripheral leukocytes were isolated during centrifugation in density gradient Lymphoprep™ medium. Dead cells were excluded with „LIVE/DEAD™ Fixable Dead Cell Stain Kit“. Immunophenotyping CD3+CD8+ T lymphocytes was performed on a flow cytometry (BD FACS Canto II) after labeling samples with anti-human CD3 FITC and CD8 PerCP monoclonal antibodies. FlowLogic software was used for data analysis.

**Results:** Compared to the control subjects, patients with PV showed significantly lower frequency of CD3+CD8+ T lymphocytes in peripheral blood, whose frequencies are significantly increased in CMV seropositive subjects.

**Conclusion:** Compared to healthy subjects, PV patients have had significantly decreased frequencies of CD3+CD8+ T lymphocytes in peripheral blood, whose frequency is fairly affected by former CMV infections.

**Key words:** body mass index; CD8+ T Lymphocytes; CMV immunoglobulin; interferon-gamma; psoriasis

## 10. LITERATURA

1. Kaštelan M. Psorijaza. Reumatizam. 2017;64:31-36
2. Ayala-Fontanez N, Soler D, McCormick T. Current knowledge on psoriasis and autoimmune diseases. Psoriasis: Targets and Therapy. 2016;6:7-32
3. Krueger JG, Bowcock A. Psoriasis pathophysiology: current concepts of pathogenesis. Ann Rheum Dis. 2005;64:30-36
4. Kaštelan M. Smjernice za dijagnostiku i liječenje vulgarne psorijaze. Liječ Vjesn 2013;135:195-200
5. Prinz JC. Human Leukocyte Antigen-Class I alleles and the autoreactive T cell response in psoriasis pathogenesis. Front. Immunol. 2018;9:954
6. Lowes M, Suárez-Fariñas M, Krueger JG. Immunology of Psoriasis. Annu Rev Immunol. 2014;32:227-255
7. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. Osnove imunologije. 5.izd. Split: Medicinski fakultet; 2017.
8. Gudjonsson JE, Johnston A, Sigmundottir H, Valdimarsson H. Immunopathogenic mechanisms in psoriasis. Clin Exp Immunol. 2004;135:1-8
9. Mak RKH, Hundhausen C, Nestle FO. Progress in understanding the immunopathogenesis of psoriasis. Actas Dermosifiliogr. 2009;100:2-13
10. Mahil S, Capon F, Barker J. Genetics of psoriasis. Dermatol Clin. 2015;33:1-11
11. Roberson E, Bowcock A. Psoriasis genetics: breaking the barrier. Trends Genet. 2010;26:415-423
12. Lønnberg AS, Skov L, Skytthe A, Kyvik KO, Pedersen OB, Thomsen SF. Heritability of psoriasis in a large twin sample. British Journal of Dermatology. 2013;169:412-416
13. Basaravaj K., Navya MA, Rashmi R. Stress and quality of life in psoriasis: an update. International Journal of Dermatology. 2011;50:783-792

14. Kaštelan M, Massari L. Nove spoznaje o imunogenetici psorijaze. *Med Jad.* 2007;37:73-76
15. Fry L, Baker BS. Triggering psoriasis: the role of infections and medications. *Clin Dermatol.* 2007;25:606-615
16. Chen L, Tsai TF. HLA-Cw6 and psoriasis. *BJD.* 2018;178:854-862
17. Smith C, Barker J. Psoriasis and its management. *BMJ.* 2006;333:380-384
18. Sagi L, Trau H. The Koebner phenom. *Clinics in Dermatology.* 2011;29:231-236
19. Šahmatova L, Sugis E, Šunina M, Hermann H, Prans E, Pihlap M i sur. Signs of innate immune activation and premature immunosenescence in psoriasis patients. *Scientific Reports.* 2017;7:7553
20. Paim de Oliveira M., Duarte G, Rocha B. Psoriasis: classical and emerging comorbidities. *An Bras Dermatol.* 2015;90:9-20
21. Andres I, Batinić D, Čulo F, Grčević D. *Imunologija.* 7.izd. Zagreb: Medicinska naklada;2010.
22. Volarić I, Vičić M, Prpić-Massari L. The role of CD8+ T-cells and their cytokines in the pathogenesis of psoriasis. *Acta Dermatovenerol Croat.* 2019;27:159-162
23. Cai Y, Fleming C, Yan J. New insights of T cells in the pathogenesis of psoriasis. *Cellular & Molecular Immunology.* 2012;9:302-309
24. Krueger JG. The immunologic basis for the treatment of psoriasis with new biologic agents. *J Am Acad Dermatol.* 2002;46:1-23
25. Lu D, Ding Y, Yi X, Zheng J. CD19+ B cell subsets in the peripheral blood and skin lesions of psoriasis patients and their correlations with disease severity. *Braz J Med Biol Res.* 2016;15:49
26. Zeichner J, Armstrong A. The role of IL-17 in the pathogenesis and treatment of psoriasis. *J Clin Aesthet Dermatol.* 2016;9:3-6

27. Jadali Z, Eslami M. T cell immune responses in psoriasis. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* 2014;13:220-230
28. Zeichner J, Armstrong A. The role of IL-17 in the pathogenesis and treatment of psoriasis. *J Clin Aesthet Dermatol.* 2016;9:3-6
29. Karczewski J, Dobrowolska A, Rychlewska-Hanczewska A, Adamski Z. New insights into the role of T cells in pathogenesis of psoriasis and psoriatic arthritis. *Autoimmunity.* 2016;49:435-450
30. Austin L, Ozawa Mk, Kikuchi T, Walters I, Krueger J. The majority of epidermal T cells in psoriasis vulgaris can produce type 1 cytokines, interferon- $\gamma$ , interleukin-2, and tumor necrosis factor- $\alpha$ , defining tT1 (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;113:752-759
31. Martin DA, Towne JE, Kricorian G, Klekotka P, Gudjonsson J, Krueger JG, Russell C. The emerging role of interleukin-17 in the pathogenesis of psoriasis: preclinical and clinical findings. *J Invest Dermatol.* 2013;133:17-26
32. Res P, Piskin G, de Boer O, van der Loos, C, Teeling P, Bos J, Teunissen M. 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):14108
33. Bernin H, Fehling H, Marggraff C, Tannich E, Lotter H. The cytokine profile of human NKT cells and PBMCs is dependent on donor sex and stimulus. *Med Microbiol Immunol.* 2016;2015:321-332
34. Gherardin N, Souter M, Koay H, Mangas K, Seemann T, Stinear T i sur. Human blood MAIT cell subsets defined using MR1 tetramers. *Immunology and Cell Biology.* 2018;96(5):507–525
35. McKee S, Mattarollo S, Leggatt G. Immunosuppressive roles of natural killer T (NKT) cells in the skin. *J Leukoc Biol.* 2014;96:49-54

36. Bonish B, Jullien D, Dutronc Y, Huang B, Modlin R, Spada F 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
37. Cameron AL, Kirby B, Fei W, Griffiths CEM. Natural Killer and natural killer-T cells in psoriasis. *Arch Dermatol Res.* 2002;294:363-369
38. Teunissen MBM, Yeremenko NG, Baeten DLP, Chielie S, Spuls PI, de Rie MA 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;134:2898-2907
39. Di Meglio P, Villanova F, Navarini AA, Mylonas A, Tosi I, Nestle FO i sur. Targeting CD8+ T cells prevents psoriasis development. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;138:274
40. Da Silva M, Fortes M, Miot L, Marques S. Psoriasis: correlation between severity index (PASI) and quality of life index (DLQI) in patients assessed before and after systemic treatment. *An Bras Dermatol.* 2013;88:760-3
41. Ortega C, Fernandez S, Carrillo J, Romero P, Molina I, Moreno J 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;86:435-43
42. Sigmundsdottir H, Gudjonsson JE, Jonsdottir I, Ludviksson BR, Valdimarsson H. The frequency of CLA+CD8+ T cells in the blood of psoriasis patients correlates closely with the severity of their disease. *Clin Exp Immunol* 2001;126:365-369
43. Schottstedt V, Blümel J, Wirsing von König C. Human cytomegalovirus (HCMV) – Revised. *Transfus Med Hemother.* 2010;37:365-375
44. Weitz M, Kiessling C, Friedrich M, Prösch S, Höflich C, Kern F. Persistent CMV infection correlates with disease activity and dominates the phenotype of peripheral CD8+ T cells in psoriasis. *Exp Dermatol.* 2011;20:561-567

45. Asadullah K, Prosch S, Audring H, Buttnerova I, Volk HD, Sterry W i sur. A high prevalence of cytomegalovirus antigenaemia in patients with moderate to severe chronic plaque psoriasis: an association with systemic tumour necrosis factor  $\alpha$  overexpression. *British Journal of Dermatology*. 1999; 141:94-102
46. Kong Y, Zhang S, Wu R, Su X, Peng D, Zhao M i sur. New insights into different adipokines in linking the pathophysiology of obesity and psoriasis. *Lipids in health and disease*. 2019;18:171
47. Kvernereland A, Streit M, Geissler E, Hutchinson J, Vogt K, Boes D i sur. Age and gender leucocytes variances and references values generated using the standardized ONE-Study protocol. *Cytometry Part A*. 2016;89(6):543-5

## 11. ŽIVOTOPIS

### OSOBNI PODACI

**Ime i prezime:** Zvonimir Grgić

**Datum i mjesto rođenja:** 23. srpnja 1997., Osijek

**Adresa:** Branka Radičevića 83, 31207 Tenja, Hrvatska

**Mobitel:** 099 570 8117

**E-mail adresa:** [zvonimir.grgic7@gmail.com](mailto:zvonimir.grgic7@gmail.com)

### OBRAZOVANJE

- |               |   |
|---------------|---|
| 2016. – 2020. | Medicinski fakultet Osijek, Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika |
| 2012. – 2016. | Prva gimnazija Osijek   |
| 2004. – 2012. | Osnovna škola Tenja   |

### OSTALO

**Jezici:** Engleski, njemački (B1 razina – DSD)