

Imunofenotipizacija perifernih Gamma delta T limfocita u oboljelih od vulgarne psorijaze

Ćosić, Davor

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:434867>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Davor Ćosić

IMUNOFENOTIPIZACIJA PERIFERNIH

GAMMA DELTA T LIMFOCITA U

OBOLJELIH OD VULGARNE

PSORIJAZE

Završni rad

Osijek, 2021.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Davor Ćosić

IMUNOFENOTIPIZACIJA PERIFERNIH

GAMMA DELTA T LIMFOCITA U

OBOLJELIH OD VULGARNE

PSORIJAZE

Završni rad

Osijek, 2021.

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

Mentor rada: doc. dr. sc. Stana Tokić

Rad ima 28 listova, 1 tablicu i 6 slika.

Zahvaljujem mentorici doc.dr.sc. Stani Tokić na savjetovanju tijekom izrade ovog završnog rada. Hvala na izrazitom razumijevanju i strpljenju.

Zahvaljujem Ivani Jelavić, bacc. med. lab. diag., na pomoći pri izvođenju praktičnog dijela rada.

Izrazito hvala mojoj obitelji na bezuvjetnoj podršci i pomoći u svakom koraku mog obrazovanja.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Psorijaza.....	1
1.1.1. Obilježja	1
1.1.2. Dijagnostika.....	1
1.1.3. Utjecaj bolesti.....	2
1.1.4. Liječenje	2
1.2. Imunosne stanice kože.....	3
1.3. Patogeneza i uloga $\gamma\delta$ T limfocita.....	4
2. HIPOTEZA	6
3. CILJEVI.....	7
4. ISPITANICI I METODE	8
4.1. Ustroj studije.....	8
4.2. Ispitanici	8
4.3. Metode	9
4.3.1 Izolacija ukupnih perifernih mononuklearnih stanica (PBMC) iz pune krvi.....	9
4.3.2 Bojanje stanica pomoću komercijalnog kita <i>LIVE/DEAD™ Fixable Dead Cell Stain Kit</i>	10
4.3.3. Fc blok.....	10
4.3.4. Priprema radne otopine	11
4.3.5. Statističke metode	11
4.3.6. Upotrijebljene kemikalije.....	11
5. REZULTATI.....	13
5.1. Demografska i biokemijska obilježja ispitanika.....	13
5.2. Relativne frekvencije $\gamma\delta$ T limfocita u perifernoj krvi oboljelih i zdravih ispitanika ...	14
5.3. Povezanost demografskih obilježja i kliničkih obilježja ispitanika s perifernim udjelima $\gamma\delta$ T limfocita.....	16
6. RASPRAVA	18
7. ZAKLJUČAK	21
8. SAŽETAK	22
9. SUMMARY.....	23
10. LITERATURA.....	24
11. ŽIVOTOPIS	28

POPIS KRATICA

APC – (engl. *Antigen presenting cells*) antigen prezentirajuće stanice

BMI – (engl. *Body mass index*) indeks tjelesne mase

BSA – (engl. *Bovine serum albumin*) albumin goveđeg seruma

CCR6 – (engl. *Chemokine receptor 6*) kemokinski receptor 6

CD3 – (engl. *Cluster of differentiation 3*) stanični diferencijacijski antigeni izraženi na površini T limfocita

CD4 – (engl. *Cluster of differentiation 4*) stanični diferencijacijski antigeni izraženi na površini pomoćničkih T stanica

CLA – (engl. *Cutaneous lymphocyte-associated antigen*) kožni limfocitni antigen

CMV – citomegalovirus

CRP – C reaktivni protein

CTRL – (engl. *Control*) kontrolna skupina tj. zdravi ispitanici

DAMPs – (engl. *Damage associated molecular patterns*) molekularni obrasci staničnog oštećenja

DETC – (engl. *Dendritic epidermal T cells*) mišje epidermalne T stanice

DLQI – (engl. *Dermatological Life Quality Index*) indeks kvalitete života dermatoloških bolesnika

DMSO – (engl. *Dimethyl sulfoxide*) otapalo dimetil sulfoksid

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

FasL – (engl. *Fas ligand*) Fas ligand čije vezanje s Fas receptorom uzrokuje apoptozu

FBS – (engl. *Fetal bovine serum*) fetalni goveđi serum

HBsAg – (engl. *Hepatitis B surface antigen*) površinski antigen Hepatitis B virusa

HCV – hepatitis C virus

IGF-1 – (engl. *Insulin-like growth factor 1*) inzulinu sličan faktor rasta 1

IgG – imunoglobulin G

IgM – imunoglobulin M

IL – interleukin

MHC – (engl. *Major histocompatibility complex*) glavni sustav tkivne podudarnosti

NB-UVB – (engl. *Narrowband ultraviolet B*) terapija ultraljubičastim zrakama B uskog spektra

NK – (engl. *Natural killer*) prirodno ubilačke stanice

PASI – (engl. *Psoriasis Area and Severity Index*) indeks težine i proširenosti psorijaze

PBMC – (engl. *Peripheral blood mononuclear cells*) periferne mononuklearne stanice

PBS – (engl. *Phosphate buffered saline*) fosfatni pufer

PUVA – (engl. *Psoralen and ultraviolet A*) terapija ultraljubičastim zrakama A i psoralenom

PV – (lat. *Psoriasis vulgaris*) skupina ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze

RAR – (engl. *Retinoic acid receptor*) receptor retinoične kiseline

ROR γ t – (engl. *RAR-related orphan receptor gamma*) s RAR-spregnuti nuklearni receptor gamma T

Tc – (engl. *Cytotoxic T cell*) citotoksični T limfociti

TCR – (engl. *T cell receptor*) T stanični receptor

Th – (engl. *T helper cell*) pomagački T limfociti

TNF – (engl. *Tumor necrosis factor*) faktor nekroze tumora

TRAIL – (engl. *TNF-related apoptosis-inducing ligand*) TNF-srodni ligand koji inducira apoptozu

UVA/UVB – (engl. *Ultraviolet A/ Ultraviolet B*) ultraljubičaste zrake A i B

1. UVOD

1.1. Psorijaza

1.1.1. Obilježja

Psorijaza je kronična upalna kožna bolest koja pogađa oko 1-2 % djece i 2-3 % odrasle populacije u svijetu, čineći je jednom od najučestalijih autoimunih bolesti (1). Istraživana prevalencija odraslih osoba u Europi razlikuje se prema državama, a u Hrvatskoj prevalencija iznosi oko 1,6 % (2). Ovisno o lokalizaciji i morfologiji simptoma, klasificirano je više srodnih oblika psorijaze od kojih je najčešći oblik vulgarna psorijaza (lat. *psoriasis vulgaris*), koja zahvaća skoro 90 % oboljelih od psorijaze (3). Karakteristični fenotip oboljelih jesu pojava bijelih ljuskavih plakova na koži, opisanih kao eritematozne makule (tamne promjene na koži) i uzdignute, crvene kožne promjene – papule. Kožne promjene mogu se naći na bilo kojem dijelu tijela, a najčešće zahvaćeni dijelovi jesu koža oko zglobova lakta i koljena te koža lubanje (3). Koebner i Auspitz fenomeni također su bitno obilježje vulgarne psorijaze. Koebner fenomen predstavlja pojavu novih lezija oko postojeće traume kože, a Auspitz pojavu malih točkastih izvorišta krvarenja na oštećenim lezijama kože do kojih dolazi zbog stanjivanja epidermalnog sloja kože (3, 4).

1.1.2. Dijagnostika

Dijagnostika bolesti najčešće se obavlja pregledom kože od strane dermatologa koji prema karakteristikama prisutnih kožnih plakova zaključuje radi li se o psorijazi. Težina oboljenja može se određivati pomoću nekoliko metoda od kojih se najčešće koristi PASI metoda (engl. *Psoriasis Area and Severity Index*), tj. Indeks proširenosti i težine psorijaze. Ovom metodom određuje se površina kože zahvaćena lezijama četiri dijela tijela: glave, ruku, trupa i nogu. Svaki dio vrednuje se zasebno po razinama zahvaćenosti, ocjenama od 0 do 6. Ocjene se zatim zbrajaju u sveukupan rezultat od kojeg se uzima da glava čini 10 % ukupne kože tijela, ruke 20 %, noge 30 % a trup 40 %. Za određivanje težine psorijaze procjena se izvodi kroz stupanj crvenila, debljine psorijatičnog plaka te ljuskanja. Ova se obilježja također određuju posebno

UVOD

za četiri dijela tijela ocjenama 0-4 koje se zatim zbrajaju (4). Osim u dijagnozi, PASI metoda služi i kao značajni pokazatelj utjecaja liječenja. PASI-50 primjer je procjene koja se koristi kao indikacija da se u bolesnika tijekom ili nakon liječenja proširenost i težina oboljenja smanjila za 50 % od početno dane PASI ocjene. Takav rezultat predstavlja značajan oporavak tj. značajno smanjenje simptoma i poboljšanje kvalitete života prema istraživanju Carlin C.S. i sur. (5). Iako PASI metoda čini bitan dio dijagnostike psorijaze, kao i kod ostalih metoda, nedostatak je velika uloga subjektivne procjene individualnih stručnjaka koja otežava potpunu standardizaciju. Pored procjene oboljenja kože, bitno je spomenuti i DLQI test (engl. *Dermatological Life Quality Index*) tj. Indeks indikacije kvalitete života dermatoloških bolesnika, kojim se postavljanjem niza određenih pitanja određuje koliko bolest opterećuje svakodnevni psihički, fizički i socijalni život (6, 7).

1.1.3. Utjecaj bolesti

Psorijaza je kao sistemska upalna bolest povezana s većim rizikom oboljenja od kardiovaskularnih bolesti u pacijenata s težim oblicima i onima koji su od psorijaze oboljeli u ranijoj dobi. U takvih se bolesnika znaju naći i druge autoimune bolesti, poput psorijatičnog artritisa i Crohnove bolesti (8, 9). Ova kronična kožna bolest ima bitan utjecaj na kvalitetu života oboljelih. Istraživanja pokazuju da se oboljeli osjećaju stigmatizirano zbog izloženosti kožnih promjena javnosti, što je često popraćeno osjećajima nelagode i srama (6). Prepoznato je da su reakcije drugih najveći uzrok stresa i anksioznosti kod oboljelih te mogu potaknuti izbjegavanje socijalnih situacija (7).

1.1.4. Liječenje

Ova autoimuna bolest nema lijeka iako ima nekoliko načina liječenja koji pospješuju smanjivanje simptoma. To su lokalno primjenjivani lijekovi, fototerapija i sustavni lijekovi. Pri blažim stanjima bolesti prvi su u liniji obrane lokalno primjenjivani lijekovi. Kreme s analogima vitamina D poput parikalcitola pokazuju značajan utjecaj na poboljšanje lokalnih psorijatičnih plakova u usporedbi s placebo terapijama. Također, jaki kortikosteroidi pokazuju sličan, ako ne i bolji rezultat, no najbolji se rezultat očituje pri kombinaciji ovih dvaju lijekova u terapiji psorijatičnih plakova (10). Kod slučajeva gdje lokalno primjenjivani lijekovi ne uspijevaju,

UVOD

fototerapija se preporuča kao druga linija obrane prema mnogim internacionalnim preporukama (11-13). Fototerapija je naziv za terapiju ultraljubičastim zrakama; tipa A ili B odnosno UVA (engl. *Ultraviolet A*) ili UVB (engl. *Ultraviolet B*). Terapijsko djelovanje obuhvaća stvaranje pogrešaka u DNK (deoksiribonuklinska kiselina) u svrhu zaustavljanja pretjerane proliferacije keratinocita koja je jedan od ključnih procesa patogeneze. Fototerapija UVA zrakama primjenjuje se uz fotosenzibilizirajuću tvar psoralen te tako čini fotokemoterapiju zvanu PUVA (engl. *Psoralen and ultraviolet A*). Analiza mnogih istraživanja pokazuje da je PUVA terapija učinkovita i efikasna te kraćeg tijeka liječenja i dugotrajnijeg učinka za razliku od NB-UVB terapije (engl. *Narrowband ultraviolet B*) (14). Ipak, liječnici najčešće odabiru uskospektralnu fototerapiju UVB zrakama poznatu kao NB-UVB zbog poznatog kancerogenog rizika PUVA terapije i lakše primjene NB-UVB terapije (14). Sustavna terapija treća je vrsta koja se upotrebljava pri neuspjehu prvih dviju vrsta. Ona podrazumijeva oralnu primjenu spojeva koji djeluju antiproliferativno; poput retinoida ili imunosupresivno; poput metotreksata i ciklosporina (12-14). Za razliku od sustavnih lijekova koji imaju generalizirano djelovanje, postoje i takozvani biološki sustavni lijekovi koji imaju ciljano imunosupresivno djelovanje u određenim molekularnim putevima te tako ne dolazi do generalne supresije imunološkog sustava. Ovi se lijekovi primjenjuju samo ako pacijent ne pokazuje pozitivne rezultate na prijašnje spomenute terapije zbog njihove visoke cijene i manje količine podataka o posljedicama dugotrajne primjene (15, 16).

1.2. Imunosne stanice kože

Koža je izgrađena od površinskog sloja kože epiderme i dubokog sloja kože, derme. Epiderma je izgrađena od oroženog višeslojnog epitela sastavljenog od više slojeva stanica zvanih keratinociti. Epiderma se dodatno dijeli na četiri sloja ovisno o stupnju diferencijacije keratinocita. Najdonji bazalni sloj (lat. *stratum basale*) postupno izgrađuje nove keratinocite, te tako najgornji slojevi propadaju, čineći vanjski mrtvi zaštitni sloj stanica zvanih korneociti. Ispod sloja mrtvih stanica (lat. *stratum corneum*) nastavljaju se *stratum spinosum* i *stratum granulosum*. Derma je vezivno tkivo ispunjeno fibroblastima čija je uloga lučiti gusti ekstracelularni matriks. Matriks je isprepleten krvnim kapilarama, limfnim žilama, žlijezdama lojnicama i znojnicama te dlakama i živčanim završecima (17).

UVOD

Osim gradivnih stanica kože, u epidermi možemo naći i imunosne stanice mijeloidne i limfoidne loze koje trajno naseljavaju kožu. Langerhansove stanice, makrofazi, mastociti i dendritičke stanice čine stanice mijeloidne loze od kojih neke imaju antigen prezentirajuće sposobnosti. Antigen prezentirajuće stanice (APC od engl. *Antigen-presenting cells*) kao što su dendritičke stanice imaju ulogu prepoznati strana tijela i alarmirati ostatak imunskog sustava. Stanice limfoidne loze koje nastanjuju kožu su gama delta ($\gamma\delta$) T limfociti, alfa beta ($\alpha\beta$) T limfociti i prirodno ubilačke NK stanice (engl. *Natural killer*) (18). Među njima, $\gamma\delta$ T limfociti igraju potencijalno važnu ulogu u inicijaciji i razvoju psorijaze. Za razliku od konvencionalnih $\alpha\beta$ T limfocitnih loza, $\gamma\delta$ T stanice koje se nalaze u znatno manjim udjelima u krvi čovjeka, izražavaju njima specifične T stanične receptore TCR (eng. *T cell receptor*) te prepoznaju MHC-neovisne mikrobne antigene (engl. *Major Histocompatibility Complex*). TCR kompleks $\gamma\delta$ T limfocita pored CD3 (engl. *Cluster of differentiation 3*) kompleksa proteina sadržavaju specifične TCR- γ i TCR- δ lance. U ljudskim uzorcima $\gamma\delta$ T limfocita prepoznate su dvije subpopulacije prema razlici TCR δ lanca: V δ 1 stanice, uglavnom prisutne u tkivima i timusu, te V δ 2 limfociti, koji čine većinu krvne $\gamma\delta$ T populacije. U okviru redovite funkcije u zdravom organizmu, $\gamma\delta$ T limfociti posreduju zaštitne, regenerativne i antitumorske učinke, ekspresijom proteolitičkih enzima (granzima i perforina), IGF-1 čimbenika rasta (engl. *Insulin-like growth factor 1*) i liganda koji induciraju apoptozu poput FasL (engl. *Fas ligand*) i TRAIL (engl. *TNF-related apoptosis-inducing ligand*) (19).

1.3. Patogeneza i uloga $\gamma\delta$ T limfocita

Psorijatični plakovi razvijaju se kao posljedica nekontrolirane proliferacije nediferenciranih keratinocita u površinskom, epidermalnom sloju kože. Međutim, gubitak obilježja i funkcije epidermalnih keratinocita najvjerojatnije nije primarni uzročni događaj u etiologiji psorijaze. Danas je poznato da na razvoj psorijaze utječu brojni genetički (20, 21) i okolišni (22) čimbenici s narušenom kožnom barijerom te pojava autoreaktivnih imunosnih stanica; uspješna implementacija imunosupresivne terapije ciklosporinom A, krajem 1970-ih, ukazala je na ključnu ulogu nekontroliranog imunološkog odgovora u inicijaciji i progresiji bolesti (23). Određene molekule unutar stanica koje se otpuštaju pri staničnim oštećenjima, tzv. DAMPs (engl. *Damage associated molecular patterns*) pobuđuju stanice prirođenog imunološkog sustava tj. antigen prezentirajuće stanice. Ovako aktivirane APC stanice reagiraju na poruku o oštećenim keratinocitima tako što započinju kemotaksiju. Lučenjem interleukina (IL): IL-23,

UVOD

IL-1 β , IL-6 i TNF- α (engl. *Tumor necrosis factor*) aktiviraju dermalne $\gamma\delta$ T limfocite (24). Istraživanja na animalnim modelima ukazuju da dermalni $\gamma\delta$ T limfociti najviše odgovaraju na stimulans IL-23 i time luče IL-17 (25). Također je uočeno da uz izraženu proizvodnju IL-17, ekspresijom ROR γ t (engl. *RAR-related orphan receptor gamma*) transkripcijskog faktora i CCR6 (engl. *Chemokine receptor 6*) kemokinskih receptora, $\gamma\delta$ T limfociti pospješuju progresiju i održavanje imunosnog odgovora u koži oboljelih (25). Razvoj upalnog mikrookoliša potiče mobilizaciju i udomljavanje specijaliziranih efektorskih linija stečene imunosti tj. pomagačkih T limfocita: Th1 i Th17 (engl. *T helper cell*) i citotoksičnih T limfocita: Tc1 i Tc17 (engl. *Cytotoxic T cell*) ali i perifernih V γ 9 δ 2 T loza koje pridonose dediferencijaciji keratinocita i progresiji epitelne hiperplazije (26). Istraživanje Pantelyushin S., i sur. pokazalo je da utišavanje *Il17a*, *Il17f* ili *Il22* gena uvelike smanjuje težinu oboljenja u eksperimentalnim animalnim modelima no rezultati upućuju da CD4⁺ Th stanice nisu predstavljale glavni izvor IL-17A, IL-17F i IL-22 citokina (27). Iznenadjuće, oko 80 % IL-17A i 60 % IL-22 lučile su $\gamma\delta$ T stanice. Iako je većina $\gamma\delta$ T stanica mišje kože V γ 5⁺ tipa ili tzv. DETC (engl. *Dendritic epidermal T cells*) koje čovjekova koža ne posjeduje, bojanje intracelularnih citokina $\gamma\delta$ subpopulacije pri oboljenju prikazuje da V γ 4⁺ stanice proizvode IL-17F i IL-22 dok ih DETC stanice ne proizvode te je pri indukciji bolesti u miševa broj i frekvencija V γ 4⁺ porasla dok DETC nije, ukazujući na vodeću ulogu V γ 4⁺ subpopulacije u stvaranju upalnog odgovora (27). Nadalje, povećana proliferacija V γ 4⁺ stanica pronađena je u koži i okolnim limfnim čvorovima animalnih modela, potencijalno kao rezultat njihove migracije i naseljavanja u kožu (27). Uz to, istraživanje Laggner U, i sur. pokazalo je visoke ekspresije CCR6 i CLA (engl. *Cutaneous lymphocyte-associated antigen*) kemokinskih receptora na humanim $\gamma\delta$ T stanicama koje se uočavaju i na stanicama V γ 4⁺ mišjih modela što može dodatno upućivati na slične uloge i migracijske obrasce (27). Rezultati istraživanja, provedenih poglavito u animalnim modelima, ukazuju na potencijalno ključnu ulogu $\gamma\delta$ T stanica u progresiji i održavanju psorijatičnih plakova ali je njihovo porijeklo i uloga još uvijek nerazjašnjena (28). Time ovo istraživanje nastoji dodatno istražiti specifične udjele i migracijske obrasce perifernih $\gamma\delta$ T limfocita u ljudi oboljelih od vulgarne psorijaze.

2. HIPOTEZA

1. Brojnost perifernih $CD3^+TCR\gamma\delta^+$ T limfocita različita je u zdravih ispitanika i oboljelih od vulgarne psorijaze.
2. Promjene u frekvenciji perifernih $\gamma\delta$ T Limfocita povezane su s obilježjima i težinom oboljenja.

3. CILJEVI

1. Analizirati i usporediti brojnost $CD3^+TCR\gamma\delta^+$ T limfocita u perifernoj krvi oboljelih ispitanika i zdravih kontrola.
2. Ispitati povezanost brojnosti perifernih $\gamma\delta$ T limfocita s demografskim obilježjima ispitanika i težinom oboljenja.

4. ISPITANICI I METODE

4.1. Ustroj studije

Studija je ustrojena kao istraživanje parova.

4.2. Ispitanici

Za istraživanje je prikupljena periferna (venska) krv 22 zdrava kontrolna ispitanika i 21 oboljelog pacijenta od vulgarne psorijaze tijekom redovite dijagnostičke skrbi na Zavodu za dermatologiju i venerologiju Kliničkog bolničkog centra Osijek. Svi su ispitanici bili punoljetni. U ukupnoj populaciji bilo je 30 ispitanika muškog spola od kojih 14 oboljelih od vulgarne psorijaze, te 13 ispitanica ženskog spola od kojih je 7 s dijagnozom vulgarne psorijaze. Probir ispitanika i obrada 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).

Od ispitanika pribavljen je informirani pristanak te su tijekom uzimanja uzoraka zabilježeni i osnovni antropometrijski podaci (visina, težina i indeks tjelesne mase ili BMI (engl. *Body mass index*)) te demografski podaci (dob, spol). Učinjena je i analiza kompletne krvne slike (broj eritrocita i eritrocitnih parametara, količina hemoglobina i hematokrita te broj leukocita, trombocita i granulocita), jetrenih enzima (alanin aminotransferaze, aspartat aminotransferaze i gama glutamil transferaze), C reaktivnog proteina (CRP) i biljega infekcije hepatitisom B (anti-HBs), hepatitisom C (anti-HCV) te citomegalovirusom (anti-CMV Imunoglobulin G/M).

Skupina oboljelih od psorijaze sadržavala je ispitanike s potvrđenom dijagnozom vulgarne psorijaze čija je težina oboljenja od psorijaze određena pomoću PASI skale, a kvaliteta života pomoću DLQI testa. Odabir ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze proveo je iskusan dermatolog, isključujući bolesnike na sistemskoj imunomodulacijskoj ili citostatskoj terapiji, oboljelih od spondiloartropatije, reumatoidnog artritisa i drugih autoimunih bolesti. Također su

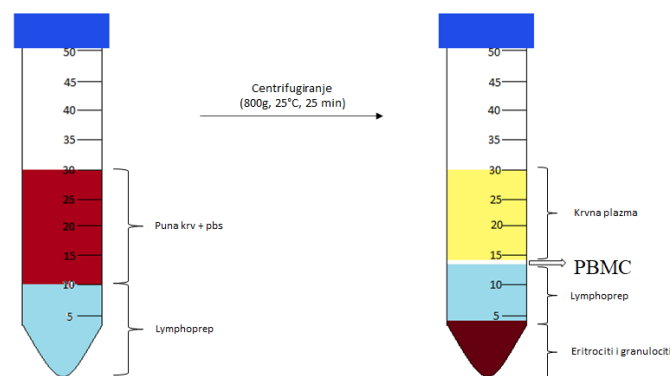
ISPITANICI I METODE

isključeni oboljeli od malignih i infekcijskih bolesti te alergijskih reakcija unutar 6 tjedana prije dijagnostičke obrade.

4.3. Metode

4.3.1 Izolacija ukupnih perifernih mononuklearnih stanica (PBMC) iz pune krvi

Iz prikupljenih uzoraka periferne krvi učinjena je izolacija mononuklearnih stanica tj. PBMC stanica (engl. *Peripheral blood mononuclear cells*) upotrebom Lymphoprep™ medija za odvajanje i izolaciju metodom centrifugiranja u gradijentu gustoće. U Falcon epruvetu volumena 50 ml pipetirano je 10 ml sredstva gradijenta gustoće Lymphoprep™ prema preporučenom volumenu proizvođača. Pazeći da se dvije tekućine ne miješaju, na površinu Lymphoprepa™ nanesen je uzorak krvi koji je prethodno razrijeđen fosfatnim puferom PBS (engl. *Phosphate buffered saline*) bez BSA (engl. *Bovine serum albumin*) u omjeru 1:1. Pripremljeni uzorak u Falcon epruveti centrifugiran je 25 minuta centrifugalnom silom od 800 g s podešenim ubrzanjem 6 i temperaturom od 25 °C. Iz dobivenog uzorka razdvojenih slojeva: plazme, PBMC stanica, Lymphoprepa™ i eritrocita kako je prikazano na Slici 1, pipetom je pažljivo u potpunosti pokupljen sloj PBMC stanica ne zahvaćajući ostale slojeve te je prebačen u novu epruvetu volumena 15 ml.



Slika 1. Prikaz uzorka krvi prije i poslije centrifugiranja pomoću Lymphoprep™ medija.
Autorsko djelo učinjeno u programu Paint (Microsoft).

ISPITANICI I METODE

Nova epruveta s prebačenim PBMC stanicama nadopunjena je PBS puferom (bez BSA) kako bi ukupan volumen uzorka bio 15 ml. Takav razrijeđeni uzorak PBMC stanica centrifugiran je 5 minuta na 800 g s ubrzanjem i kočenjem 9 na temperaturi 25 °C. Iz epruvete je odbačen supernatant, a istaložene PBMC stanice pomiješane su s 8 ml PBS pufera te centrifugirane na 550 g nakon čega je supernatant ponovno odbačen, a stanice su resuspendirane s 5 ml PBS pufera čime su pripravljene za bojanje. Uzorak je obojan bojom Trypan plava tako što je 50 µl stanične suspenzije obojano sa 100 µl boje. Boja ne može prodrijeti membranu živih stanica koje ostaju neobojane dok mrtve stanice poprimaju plavo obojenje. Žive stanice u obojanom uzorku izbrojane su pomoću Burker-Turk komorice. Nakon brojanja izračunat je broj stanica u ml uzorka prema računu: $N \text{ (stanica) / ml} = [N \text{ (izbrojanih stanica) / 4 izbrojana kvadrata}] \times \text{dilucijski faktor } 3 \times 10^4$. Alikvotirano je milijun stanica u ukupno 1 ml PBS pufera.

4.3.2 Bojanje stanica pomoću komercijalnog kita *LIVE/DEAD™ Fixable Dead Cell Stain Kit*

Bojanje živih stanica *LIVE/DEAD™ Fixable Dead Cell Stain Kit* komercijalnim kitom omogućuje jasno razlikovanje živih od mrtvih stanica pri analizi rezultata protočne citometrije. Komponente kita najprije su zagrijane na sobnoj temperaturi. Boja je zatim razrijeđena tako što je dodano 50 µl Komponente B (bez vodnog otapala DMSO (engl. *Dimethyl sulfoxide*)) u Komponentu A (fluorescentna boja). Po 1 µl pripravljene boje dodan je u svaki alikvot prethodno izoliranih stanica. Uzorci su inkubirani 30 minuta na 4 °C. Obojani uzorak stanica ispran je dodatkom 1 µl PBS plus 1 % BSA i centrifugiranjem 5 minuta na 350 g. Supernatant je odbačen, a isprane stanice resuspendirane su u 95 µl PBS s 1 % BSA.

4.3.3. Fc blok

U svrhu sprječavanja nespecifičnog vezanja protutijela na Fc receptore prisutne na ispitivanim stanicama korištena je *Human TruStain FCX™* otopina. U uzorak stanica dodano je 5 µl otopine i inkubirano oko 10 min na sobnoj temperaturi.

ISPITANICI I METODE

4.3.4. Priprema radne otopine

Gamma delta T limfociti ispoljavaju njima specifičan TCR receptor. Fenotipizacija ovih stanica u protočnom citometru učinjena je korištenjem PE-CY7 TCR $\gamma\delta$ anti-ljudskih mišjih monoklonalnih protutijela koja vežu taj receptor. Za uzorak ukupnog volumena 100 μ l korišteno je 0,4 μ l FITC CD3 protutijela i 5 μ l PE-CY7 TCR $\gamma\delta$ protutijela razrijeđenih s 94,6 μ l PBS + 0,1 % BSA + 0,01 % NaN₃ (natrijev azid). U 100 μ l stanične suspenzije dodano je 100 μ l pripremljenih razrijeđenih protutijela. Uzorak je pomiješan vorteksom i inkubiran u mraku 30 minuta na 4 °C. Uzorak je zatim ispran dodatkom 2 ml PBS pufera i centrifugiran 5 minuta na 350 g nakon čega je odbačen supernatant. Ispiranje je ponovljeno još jednom istim postupkom. Stanice su resuspendirane u 0,5 ml PBS pufera i zatim analizirane na protočnom citometru (FACS Canto II, Becton Dickinson, SAD).

4.3.5. Statističke metode

Nominalne varijable predstavljene su apsolutnim frekvencijama i proporcijama, a omjerne varijable medijanom i interkvartilnim rasponom. Normalnost distribucije podataka analizirana je Shapiro-Wilk testom. Postojanje statistički značajnih razlika među skupinama testirano je primjenom Mann-Whitney neparametrijskog testa. Spearmanov koeficijent korelacije (ρ) korišten je za procjenu povezanosti kontinuiranih varijabli. Tablice kontingencije analizirane su Fisherovim egzaktnim testom. Prag značajnosti definiran je kao dvostrani $P < 0,05$. Statistička analiza obavljena je programom SPSS for Windows (inačica 28.0, SPSS Inc., Chicago, IL, SAD).

4.3.6. Upotrijebljene kemikalije

- Lymphoprep™ (STEMCELL Technologies Inc. Vancouver, Kanada)
- Fosfatni pufer PBS (bez BSA)
- Fosfatni pufer PBS + 1% BSA
- Fosfatni pufer PBS + 0,1% BSA + 0,01 % NaN₃
- Trypan plava boja

ISPITANICI I METODE

- *LIVE/DEAD™ Fixable Dead Cell Stain Kit* (Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija, SAD)
- *Human TruStain FcX™* (BioLegend, San Diego, Kalifornija, SAD)
- Anti-ljudska mišja CD3 ϵ FITC protutijela (donacija prof. Petera Balogha, Medicinski fakultet Sveučilišta u Pečuhu, klon UCHT1 gamma)
- Anti-ljudska mišja PE-Cy7 TCR $\gamma\delta$ protutijela (klon B1.1, eBioscience™, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, SAD)

5. REZULTATI

5.1. Demografska i biokemijska obilježja ispitanika

Skupine zdravih ispitanika (CTRL od engl. *Control*) i oboljelih od vulgarne psorijaze (PV od lat. *Psoriasis vulgaris*) nisu se značajno razlikovale po broju, spolu, dobi, tjelesnoj težini, visini i indeksu tjelesne mase kao što je prikazano u Tablici 1. Također se nisu značajno razlikovale prema mjerenim biokemijskim parametrima: C reaktivni protein (CRP), površinski antigen hepatitis B virusa, anti-HBs protutijela, anti-HCV (hepatitis C virus) protutijela i CMV (citomegalovirus) IgG i IgM (imunoglobulin G/M) protutijela. U obje skupine ispitanika (CTRL i PV) regrutirane su osobe mlađe životne dobi, a broj ispitanika muškog spola dvostruko je veći od ispitanica ženskog spola. Primijećene niske razine PASI ocjena upućuju na generalno blaža stanja u oboljelih (PASI ocjene daju se od 0 do 72 (4)). Također su zabilježene niske ocjene DLQI indeksa.

Tablica 1. Obilježja zdravih ispitanika (CTRL) i oboljelih od vulgarne psorijaze (PV)

	CTRL	PV	P
N (M, Ž)	22 (16 M, 6 Ž)	21 (14 M, 7 Ž)	0,747†
Dob (godine)	32 (28 – 40)	33 (27 – 39)	0,874*
BMI (kg/m ²)	25 (20 – 27)	25 (21 – 29)	0,349*
PASI	-	7,7 (5,5 – 12,5)	-
DLQI	-	3 (1 – 6,5)	-
CRP (mg/l)	0,8 (0,5 – 1,8)	2 (0,7 – 3,2)	0,057*
HBsAg (poz/neg)	0/16	0/16	-†
anti-HBs (mIU/ml)	201,3 (16,4 – 724,8)	28,1 (0 – 153)	0,091*
anti-HCV (poz/neg)	0/15	0/16	-†
CMV IgG (AU/ml)	136 (72 – 183,5)	145,5 (73,3 – 191,5)	0,936*
CMV IgM (poz/neg)	0/20	1/15	0,444†

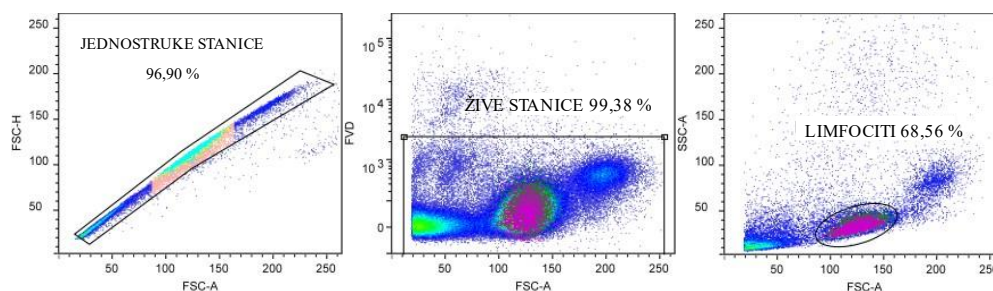
Omjerne varijable izražene su kao medijan s interkvartilnim rasponom (Q1 - Q3). Nominalne varijable izražene su proporcijama. CRP (C reaktivni protein), PASI (engl. *Psoriasis area and severity index*), DLQI (engl. *Dermatological life quality index*), BMI (engl. *Body mass index*), HBsAg (površinski antigen hepatitis b virusa), CMV (citomegalovirus), IgG (imunoglobulin G protutijela), IgM (imunoglobulin M protutijela), HCV (hepatitisa C virus). *Mann – Whitney test. †Fisherov egzaktni test.

REZULTATI

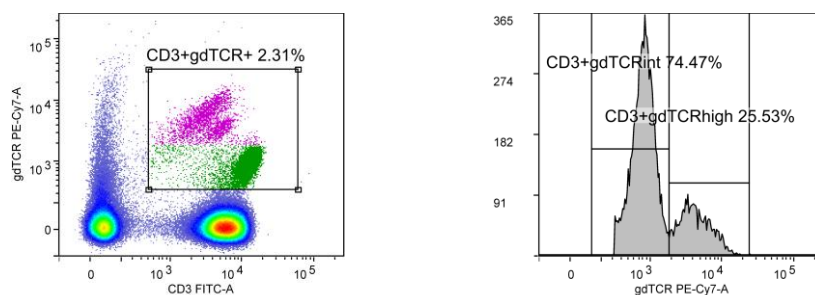
5.2. Relativne frekvencije $\gamma\delta$ T limfocita u perifernoj krvi oboljelih i zdravih ispitanika

Analiza perifernih $\gamma\delta$ T limfocita učinjena je protočnom citometrijom. Živi jednostruki $CD3^+$ T limfociti identificirani su strategijom susljednog postavljanja prozora Flow Logic programa (Slika 2a). Program je također upotrijebljen za identifikaciju stanica koje sadrže $\gamma\delta$ TCR receptor - $\gamma\delta$ T stanice ($CD3^+\gamma\delta$ TCR⁺), a u kojima su primijećene subpopulacije s različitim razinama ekspresije TCR receptora (Slika 2b). Stoga su dodatno identificirane više zastupljene $\gamma\delta$ T stanice sa srednjom razinom ekspresije TCR receptora ($CD3^+\gamma\delta$ TCR^{int}) i manje zastupljene $\gamma\delta$ T stanice s jačom ekspresijom TCR receptora ($CD3^+\gamma\delta$ TCR^{high}).

a)



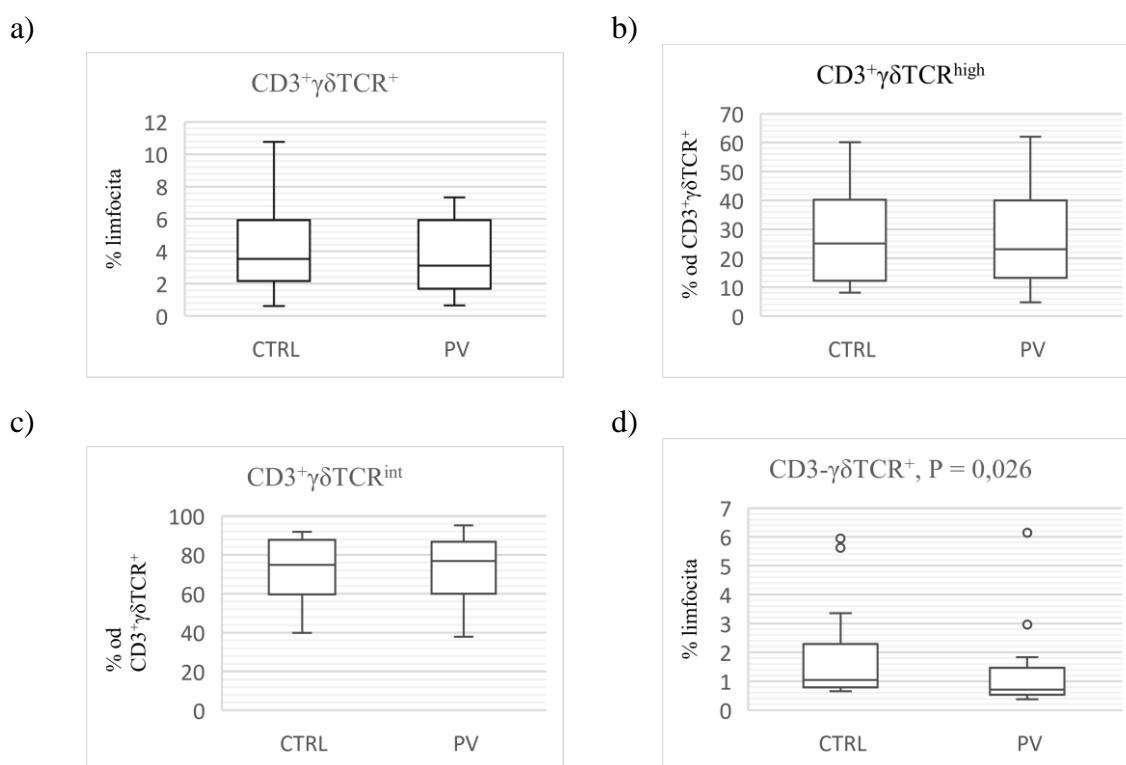
b)



Slika 2. Reprezentativni primjer strategije susljednog postavljanja prozora za analizu $\gamma\delta$ T limfocita iz periferne krvi ispitanika protočnom citometrijom. a) točkasti dijagrami prikazuju identifikaciju živih jednostrukih $CD3^+$ T limfocita. b) prikaz identificiranih specifičnih populacija $CD3^+$ stanica na temelju $\gamma\delta$ TCR receptora i subpopulacija na temelju razina ekspresije $\gamma\delta$ TCR receptora.

REZULTATI

Analiza frekvencija različitih populacija $\gamma\delta$ T limfocita u dvije neovisne skupine (PV i CTRL) učinjena je neparametrijskim testom dviju nezavisnih varijabli Mann-Whitney. Rezultati ukazuju da ne postoji statistički značajna razlika između osoba s psorijazom (PV) i zdravih kontrola (CTRL) u sljedećim populacijama $\gamma\delta$ T limfocita: $CD3^+\gamma\delta TCR^+$ ($M_{pv} = 3,11$ % (1,7 % - 5,9 %) vs. $M_{ctrl} = 3,54$ % (2,16 % - 5,94 %), $P = 0,451$, Slika 3a), $CD3^+\gamma\delta TCR^{high}$ ($M_{pv} = 23,12$ % (13,22 % - 40,05 %) vs. $M_{ctrl} = 25,14$ % (12,25 % - 40,31 %), $P = 0,846$, Slika 3b) i $CD3^+\gamma\delta TCR^{int}$ ($M_{pv} = 76,88$ % (59,95 % - 86,78 %) vs. $M_{ctrl} = 74,87$ % (59,7 % - 87,74 %), $P = 0,875$, Slika 3c). Nasuprot tome, uočena je statistički značajna razlika između skupina (PV i CTRL) u frekvenciji $CD3^-\gamma\delta TCR^+$ stanica ($M_{pv} = 0,71$ % (0,54 % - 1,47 %) vs. $M_{ctrl} = 1,05$ % (0,79 % - 2,3 %), $P = 0,026$, Slika 3d). Niti jedna druga značajna razlika nije prisutna između skupina uzimajući u obzir sve ispitivane varijable.



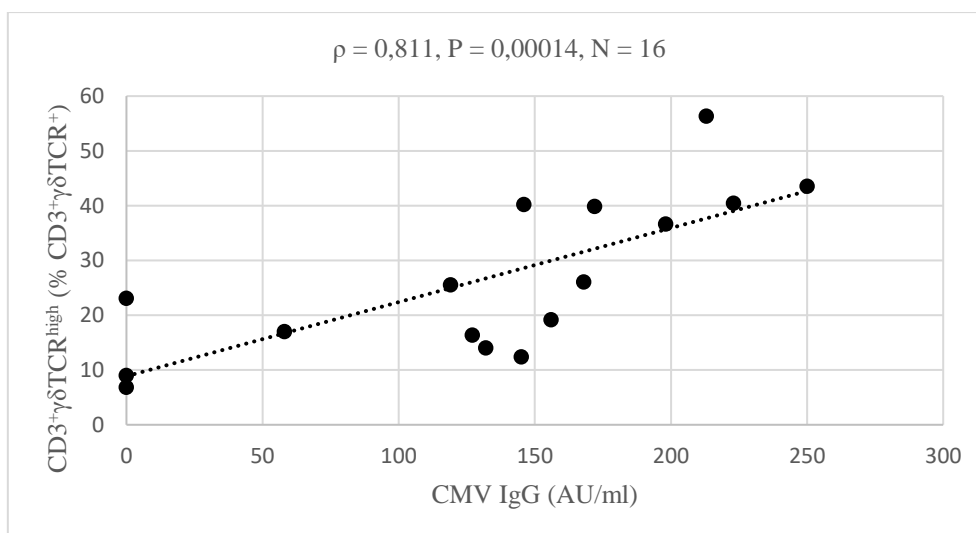
Slika 3. Prikaz neznačajnih i značajnih razlika populacija $\gamma\delta$ T limfocita između ispitanika s psorijazom (PV) i zdravih kontrola (CTRL). Neznačajne: a) $CD3^+\gamma\delta TCR^+$, b) $CD3^+\gamma\delta TCR^{high}$, c) $CD3^+\gamma\delta TCR^{int}$. Stanice značajne razlike: d) $CD3^-\gamma\delta TCR^+$. Razlike su prikazane primjenom box-plot dijagrama, s prikazom medijana (horizontalna linija unutar box-plota) i interkvartilnim rasponom ($IQR = Q3 - Q1$ gdje je Q1 omeđen donjom a Q3 gornjom granicom box plota), a vertikalne linije predstavljaju $1,5 \times IQR$. Ekstremne vrijednosti su prikazane praznim kružićima. Prag značajnosti definiran je kao dvostrani $P < 0,05$. Mann-Whitney test.

REZULTATI

5.3. Povezanost demografskih obilježja i kliničkih obilježja ispitanika s perifernim udjelima $\gamma\delta$ T limfocita

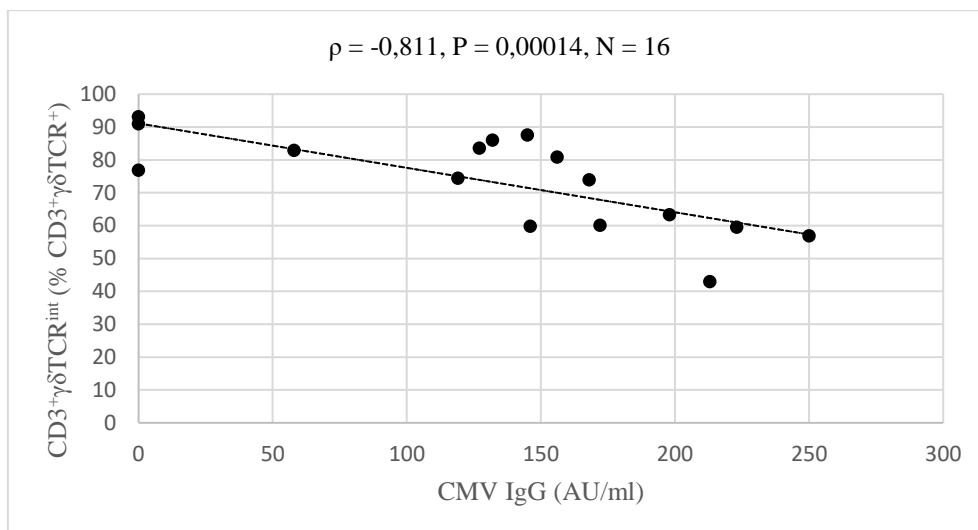
Povezanost kontinuiranih varijabli ispitana je Spearmanovim koeficijentom korelacije (ρ). Statistička analiza podataka nije ukazala na statistički značajnu korelaciju između promjena frekvencija $CD3^+\gamma\delta TCR^+$ T limfocita s težinom oboljenja mjerene PASI testom u PV skupini ispitanika ($N = 21$, $\rho = 0,144$, $P = 0,535$). PASI varijabla ne korelira značajno niti s jednom drugom definiranom populacijom $\gamma\delta$ T limfocita.

Daljnjom analizom odnosa frekvencije perifernih $\gamma\delta$ T limfocita s ostalim varijablama zapažena je statistički značajna pozitivna korelacija između razina titra CMV IgG protutijela i frekvencije $CD3^+\gamma\delta TCR^{high}$ populacije stanica ($\rho = 0,585$, $P = 0,00018$) analizom obje skupine ispitanika ($N = 36$, CTRL i PV). Također, statistički značajna pozitivna korelacija pronađena je zasebnom analizom samo PV skupine ispitanika ($N = 16$, $\rho = 0,811$, $P = 0,00014$, Slika 4). U CTRL skupini ova korelacija nije bila statistički značajna ($N = 20$, $\rho = 0,424$, $P = 0,063$). Suprotno tome, zabilježena je statistički značajna negativna korelacija razine CMV IgG titra i frekvencije $CD3^+\gamma\delta TCR^{int}$ T limfocitnih populacija u ukupnom uzorku (CTRL i PV, $N = 36$, $\rho = -0,584$, $P = 0,00018$) i u samoj PV skupini ($N = 16$, $\rho = -0,811$, $P = 0,00014$, Slika 5). U ostale dvije definirane populacije perifernih $\gamma\delta$ T limfocita ($CD3^+\gamma\delta TCR^+$ i $CD3^-\gamma\delta TCR^+$) značajna korelacija s CMV IgG protutijelima nije pronađena.



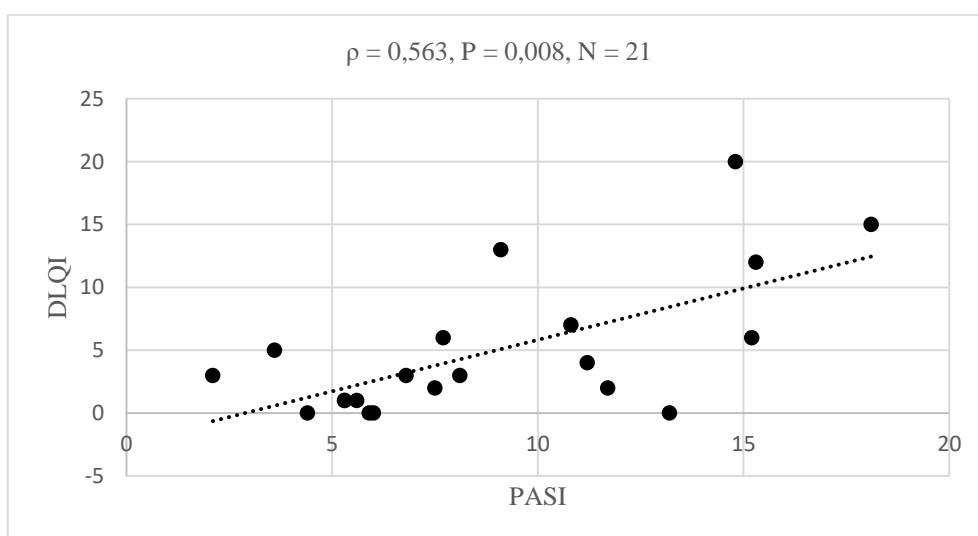
Slika 4. Prikaz značajne pozitivne korelacije CMV IgG protutijela i $CD3^+\gamma\delta TCR^{high}$ stanica u PV skupini ispitanika. Točkasta linija: regresijski pravac, metoda najmanjih kvadrata Spearman test.

REZULTATI



Slika 5. Prikaz značajne negativne korelacije CMV IgG protutijela i CD3⁺γδTCR^{int} stanica u PV skupini ispitanika. Točkasta linija: regresijski pravac, metoda najmanjih kvadrata. Spearman test.

Pregledom međusobnih korelacija svih ostalih ispitivanih varijabli uočeno je nekoliko statistički značajnih odnosa: pozitivna korelacija između indeksa proširenosti i težine oboljenja i indeksa kvalitete života ($N = 21$, $\rho = 0,563$, $P = 0,008$, Slika 6). U CTRL skupini uočena je pozitivna korelacija dobi ispitanika s BMI indeksom ($N = 22$, $\rho = 0,483$, $P = 0,023$). Dodatno, uočena je negativna korelacija dobi s razinom anti-HBs protutijela u serumu PV ispitanika ($N = 15$, $\rho = -0,533$, $P = 0,041$).



Slika 6. Prikaz pozitivne korelacije PASI i DLQI indeksa u svih ispitanika PV skupine. Točkasta linija: regresijski pravac, metoda najmanjih kvadrata. Spearman test.

6. RASPRAVA

Prvom je hipotezom ovog istraživanja pretpostavljeno da postoji značajna razlika u brojnosti perifernih $\gamma\delta$ T limfocita između skupine ispitanika s psorijazom (PV) i zdravih kontrola (CTRL). Tri od četiri diferencirane populacije perifernih $\gamma\delta$ T stanica ne razlikuju se značajno među navedenim skupinama. Posljedica toga može biti preispitivanje nedovoljno specificiranih podvrsta $\gamma\delta$ T limfocita koji upućuju na različite uloge u periferiji i tkivu. Tome služe spoznaje da dvije različite podvrste ljudskih $\gamma\delta$ T limfocita dominiraju u različitim tkivima: $V\gamma 9^+V\delta 2^+$ prevladavaju u krvi dok $V\delta 2^-$ $\gamma\delta$ T stanice uglavnom prevladavaju u tkivima, najčešće u epitelu (29). Ovakvi nalazi ne upućuju nužno na nedostatak značajnosti uloge perifernih $\gamma\delta$ T limfocita u samom početku razvijanja bolesti, već nedostatak dokaza o značajnoj ulozi u održavanju bolesti na uzorku ispitanika ovog istraživanja. Nasuprot tome, $CD3^- \gamma\delta TCR^+$ populacija pokazuje statistički značajnu razliku. Treba napomenuti da ova definirana subpopulacija ima specifična citometrijska ali ne i jasna biološka obilježja stoga je njihova priroda i potencijalna uloga u PV upitna. U usporedbi sa zdravim kontrolama, u perifernoj krvi PV skupine ispitanika zabilježena je smanjena frekvencija $CD3^- \gamma\delta TCR^+$ stanica. Pretpostavilo bi se da je uzrok tome potencijalna migracija stanica na upalna mjesta psorijatičnih plakova kožnog tkiva kako je opisano u uvodu ovog rada. Ovakvo objašnjenje dovedeno je međutim pod sumnjom, dijelom radi izostanka značajne razlike u frekvenciji ostalih populacija perifernih $\gamma\delta$ T limfocita i nedostatak korelacije između $CD3^- \gamma\delta TCR^+$ populacije i PASI skale, ali ponajviše radi nepoznate uloge ove subpopulacije stanica u imunološkom odgovoru. Obzirom na navedeno, ne mogu se isključiti neželjeni učinci tehničkih artefakata i stanične kontaminacije, koje je ubuduće potrebno predvidjeti i neutralizirati optimizacijom eksperimentalnih i analitičkih postupaka.

Frekvencije perifernih $\gamma\delta$ T stanica nisu povezane s težinom oboljenja (PASI) kako pretpostavlja druga hipoteza ovog istraživanja. Razlog toga može biti jednak kao i u nedostatku značajnih razlika između skupina. Za bolje razumijevanje uloge $\gamma\delta$ T limfocita u vulgarnoj psorijazi potrebno je simultano istražiti brojnost perifernih i tkivnih $\gamma\delta$ T limfocita u ranim kao i u kasnijim fazama oboljenja. Ovo je ujedno nedostatak ovog istraživanja no velika invazivnost sakupljanja uzorka za analizu $\gamma\delta$ T limfocita u kožnom tkivu otežava mogućnost provedbe

RASPRAVA

takvog istraživanja. Isto tako, preispitivanje samih začetaka psorijatičnog oboljenja može predstavljati poteškoće zbog različitih faza detekcije od strane bolesnika.

Prisutnost CMV IgG protutijela predstavlja prijašnje preboljenu infekciju citomegalovirusom (CMV) tj. humanim herpes virusom 5 (HHV5). Moguća akutna infekcija isključena je provjerom razina IgM protutijela. Karakteristika CMV, kao i ostalih HHV je njihova sposobnost latencije. Nakon preboljene infekcije, CMV ostaje „skriven“ u stanicama. Istraživanja pokazuju da se više razine CMV IgG protutijela u perifernoj krvi mogu objasniti pojavnošću većeg rizika od reaktivacije CMV zbog mogućeg propusta imunskog sustava (30). Ovakvi su slučajevi pogotovo povezani s već opterećenim imunskim sustavom starijih osoba i osoba s autoimunom bolešću (31). Pronađena statistički značajna pozitivna korelacija između CMV IgG protutijela i frekvencije $CD3^+\gamma\delta TCR^{high}$ populacija kao i statistički značajna negativna korelacija titra protutijela s frekvencijom $CD3^+\gamma\delta TCR^{int}$ populacija u ovom istraživanju ukazuje na slične nalaze dosadašnjih istraživanja koja ispituju ulogu $\gamma\delta$ T limfocita u infekciji citomegalovirusom (32). Naime, istraživanja pokazuju da je broj $V\delta 2^-$ populacije $\gamma\delta$ T stanica uvećan u CMV seropozitivnih osoba za razliku od CMV seronegativnih (zdravih) osoba (33). Također je pronađeno da $V\delta 2^-$ T stanice u CMV^+ osoba pokazuju citotoksični efektorski fenotip za razliku od stanica u zdravih osoba što se navodi u literaturi kao mogućnost dugoročnog preoblikovanja uloge stanica tj. njihov plasticitet koji je zabilježen i u drugim istraživanjima (33, 34). Uz to, istraživanje je pokazalo da je tijekom sekundarnog odgovora na CMV, reakcija $\gamma\delta$ T limfocita brža i da je infekcija brže savladana od primarnog odgovora na CMV infekciju (33). Ovo pokazuje da je povećana razina $V\delta 2^-$ $\gamma\delta$ T limfocita specifični indikator imunskog odgovora na CMV infekciju (33). Druga dominantna vrsta $\gamma\delta$ T limfocita koja je zapažena u ljudi, pored $V\delta 2^+$, je $V\delta 1^+$ populacija. Potvrdu da je upravo $V\delta 1^+$ populacija $\gamma\delta$ T limfocita ta koja ima ključnu ulogu u CMV infekcijama pokazuju nalazi istraživanja Déchanet J i sur (35). Nalazi ovih istraživanja dijelom pojašnjavaju zabilježenu pozitivnu korelaciju između titra CMV protutijela i perifernih udjela $CD3^+\gamma\delta TCR^{high}$ stanica u ovom istraživanju, budući da $CD3^+\gamma\delta TCR^{high}$ razred dominantno čine $\gamma\delta$ T stanice koje izražavaju $V\delta 1^+$, ali u manjoj mjeri i $V\delta 1^-V\delta 2^-$ ili $V\delta 2^+$ TCR repertoar (34, 36). Štoviše, nedavna studija otkriva značajnu heterogenost unutar $V\delta 1^+$ razreda pa je pojedine $V\delta 1^+$ subpopulacije moguće razlikovati na temelju stupnja diferencijacije, transkripcijskog i funkcijskog profila, pri čemu različiti $V\delta 1^+$ podrazredi potencijalno imaju različitu ulogu u obrani od virusnih infekcija (37). Za bolje razumijevanje uloge $CD3^+\gamma\delta TCR^{high}$ stanica u CMV imunološkom odgovoru, potrebne

RASPRAVA

su stoga dodatne analize transkripcijske i klonalne raznolikosti ovih stanica u CMV IgG pozitivnih ispitanika.

Značajna pozitivna korelacija DLQI i PASI indeksa nije iznenađujuća prema mnogim spoznajama psiholoških utjecaja kožnih oboljenja koja su spomenuta u uvodu ovog rada (6, 7). Upravo zbog velikog utjecaja ove vrste bolesti na svakodnevni život oboljelih bitno je preispitati faktore koji potiču nastanak i održavanje bolesti, pogotovo ukoliko se mogu upotrijebiti kao način liječenja. Zbog toga su potrebna dodatna istraživanja kako bi se bolje razumjela uloga i odnos perifernih i tkivnih $\gamma\delta$ T limfocita s nastankom i održavanjem psorijaze.

7. ZAKLJUČAK

Usporedba skupina ispitanika s vulgarnom psorijazom i zdravih kontrola dovelo je do sljedećih zaključaka:

- nema statistički značajnih razlika u brojnosti perifernih $\gamma\delta$ T limfocita zdravih i oboljelih ispitanika
- brojnost $CD3^{-}\gamma\delta TCR^{+}$ stanica značajno je niža u oboljelih od vulgarne psorijaze u usporedbi sa zdravim kontrolama
- brojnost perifernih $\gamma\delta$ T limfocita nije povezana s težinom oboljenja
- brojnost perifernih $\gamma\delta$ T limfocita povezana je s razinama CMV IgG protutijela u serumu oboljelih ispitanika
- težina oboljenja povezana je s kvalitetom života u oboljelih od vulgarne psorijaze.

8. SAŽETAK

Uvod: Psorijaza je kronična upalna kožna bolest i jedna od najučestalijih autoimunih bolesti. Povezana je s većim rizikom oboljenja od drugih bolesti i ima značajan utjecaj na kvalitetu života. Na razvoj psorijaze utječu brojni genetički i okolišni čimbenici s narušenom kožnom barijerom te pojavom autoreaktivnih imunskih stanica. Rezultati istraživanja, provedeni poglavito u animalnim modelima, ukazuju na potencijalno ključnu ulogu $\gamma\delta$ T stanica u progresiji i održavanju psorijatičnih plakova, ali je njihovo porijeklo i uloga u ljudi oboljelih od psorijaze nedovoljno razjašnjena.

Cilj istraživanja: Analizirati i usporediti brojnost perifernih $CD3^+TCR\gamma\delta^+$ T limfocita u perifernoj krvi oboljelih ispitanika i zdravih kontrola te ispitati njihovu povezanost s težinom oboljenja i demografskim obilježjima ispitanika.

Ispitanici i metode: Iz prikupljene periferne krvi 22 ispitanika zdravih kontrola i 21 oboljelih od vulgarne psorijaze, izolirane su ukupne periferne mononuklearne stanice. Fenotipizacija $\gamma\delta$ T limfocita učinjena je u protočnom citometru korištenjem FITC CD3 i PE-CY7 TCR $\gamma\delta$ anti-ljudskih mišjih monoklonalnih protutijela.

Rezultati: Relativne frekvencije $CD3^+$ $\gamma\delta$ T limfocita nisu se statistički razlikovale između skupina zdravih kontrola i oboljelih, vjerojatno kao posljedica nedovoljno specificiranih podvrsta $\gamma\delta$ T limfocita. Značajna razlika uočena je usporedbom $CD3^-\gamma\delta TCR^+$ stanica nepoznate biološke funkcije. Zapažena je značajna korelacija $CD3^+\gamma\delta TCR^{high}$ populacije T limfocita s titrom CMV IgG protutijela. Ustanovljena je značajna povezanost indeksa PASI i DLQI.

Zaključak: U ispitivanom uzorku brojnost $CD3^+$ $\gamma\delta$ T limfocita ne razlikuje se između zdravih i oboljelih ispitanika, dok u PV oboljelih $CD3^+\gamma\delta TCR^{high}$ stanice koreliraju s CMV IgG titrom.

Ključne riječi: Citomegalovirus; Gamma delta T stanice; Psorijaza.

SUMMARY

9. SUMMARY

Title: Immunophenotyping of $\gamma\delta$ T peripheral blood lymphocytes in psoriasis vulgaris patients

Introduction: Psoriasis is a chronic inflammatory skin disease and one of the most common autoimmune diseases. It is associated with a higher risk of developing other diseases and has a significant impact on the quality of life. The development of psoriasis is influenced by a number of genetic and environmental factors with a disturbed skin barrier and the appearance of autoreactive immune cells. Results of many studies, which were mainly conducted on animal models, indicate a potential key role of $\gamma\delta$ T cells in the progression and maintenance of psoriatic plaques, but their role and origin in psoriatic patients are not well understood.

Objectives: Analyze and compare frequencies of peripheral $CD3^+TCR\gamma\delta^+$ T lymphocytes in the blood of healthy controls and subjects with psoriasis and examine their relation with disease severity and demographic characteristics of subjects.

Participants and methods: Total peripheral mononuclear cells were isolated from collected peripheral blood of 22 healthy controls and 21 patients with psoriasis vulgaris. Phenotyping of $\gamma\delta$ T lymphocytes was performed in a flow cytometer using FITC CD3 and PE-CY7 TCR $\gamma\delta$ anti-human murine monoclonal antibodies.

Results: There was no statistical difference in the relative frequencies of $CD3^+ \gamma\delta$ T lymphocytes between the healthy controls and psoriasis patients, most probably as a consequence of insufficiently specified subtypes of $\gamma\delta$ T lymphocytes. A significant difference was observed in $CD3^+\gamma\delta TCR^+$ cells that are not yet well understood. A significant correlation of $CD3^+\gamma\delta TCR^{high}$ T lymphocyte population with CMV IgG antibody levels was observed. Significant correlation of PASI and DLQI was found.

Conclusion: In the examined sample the frequencies of $CD3^+ \gamma\delta$ T lymphocytes did not differ significantly between groups. In psoriatic patients $CD3^+\gamma\delta TCR^{high}$ cell frequency correlates with CMV IgG antibody levels.

Key words: Cytomegalovirus; Gamma delta T cells; Psoriasis

10. LITERATURA

1. Parisi R, Symmons DPM, Griffiths CEM, Ashcroft DM. Identification and Management of Psoriasis and Associated Comorbidity (IMPACT) project team. Global epidemiology of psoriasis: a systematic review of incidence and prevalence. *J Invest Dermatol*. 2013;133(2):377–85.
2. Barisić-Drusko V, Paljan D, Kansky A, Vujasinović S. Prevalence of psoriasis in Croatia. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)*. 1989;146:178–9.
3. Raychaudhuri SK, Maverakis E, Raychaudhuri SP. Diagnosis and classification of psoriasis. *Autoimmun Rev*. 2014;13(4–5):490–5.
4. Schmitt J, Wozel G. The psoriasis area and severity index is the adequate criterion to define severity in chronic plaque-type psoriasis. *Dermatol Basel Switz*. 2005;210(3):194–9.
5. Carlin CS, Feldman SR, Krueger JG, Menter A, Krueger GG. A 50 % reduction in the Psoriasis Area and Severity Index (PASI 50) is a clinically significant endpoint in the assessment of psoriasis. *J Am Acad Dermatol*. 2004;50(6):859–66.
6. Hrehorów E, Salomon J, Matusiak L, Reich A, Szepietowski JC. Patients with psoriasis feel stigmatized. *Acta Derm Venereol*. 2012;92(1):67–72.
7. Griffiths CE, Richards HL. Psychological influences in psoriasis. *Clin Exp Dermatol*. 2001;26(4):338–42.
8. Lockshin B, Balagula Y, Merola JF. Interleukin 17, inflammation, and cardiovascular risk in patients with psoriasis. *J Am Acad Dermatol*. 2018;79(2):345–52.
9. Mallbris L, Akre O, Granath F, Yin L, Lindelöf B, Ekbom A, i sur. Increased risk for cardiovascular mortality in psoriasis inpatients but not in outpatients. *Eur J Epidemiol*. 2004;19(3):225–30.
10. Mason AR, Mason J, Cork M, Dooley G, Hancock H. Topical treatments for chronic plaque psoriasis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013;(3):CD005028.

LITERATURA

11. National Institute for Health and Care Excellence. Psoriasis: assessment and management 2017. Dostupno na adresi:
<https://www.nice.org.uk/guidance/cg153/resources/psoriasis-assessment-and-management-pdf-35109629621701>. Datum pristupa 25. 3. 2021.
12. Elmetts CA, Lim HW, Stoff B, Connor C, Cordoro KM, Lebwohl M, i sur. Joint American Academy of Dermatology–National Psoriasis Foundation guidelines of care for the management and treatment of psoriasis with phototherapy. *J Am Acad Dermatol.* 2019;81(3):775–804.
13. Liječnički vjesnik. Smjernice za dijagnostiku i liječenje vulgarne psorijaze 2013. Dostupno na: <http://lijecnicki-vjesnik.hlz.hr/wp-content/uploads/2013/7-8/SMJERNICE%20ZA%20DIJAGNOSTIKU%20I%20LIJE%20C4%20CENJE%20VULGARNE%20PSORIJAZE.pdf> Datum pristupa: 25. 3. 2021.
14. Archier E, Devaux S, Castela E, Gallini A, Aubin F, Le Maître M, i sur. Efficacy of psoralen UV-A therapy vs. narrowband UV-B therapy in chronic plaque psoriasis: a systematic literature review. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV.* 2012;26 Suppl 3:11–21.
15. Griffiths CEM. Biologics for psoriasis: current evidence and future use. *Br J Dermatol.* 2012;167 Suppl 3:1–2.
16. Rustin MHA. Long-term safety of biologics in the treatment of moderate-to-severe plaque psoriasis: review of current data. *Br J Dermatol.* 2012;167 Suppl 3:3–11.
17. Junqueira LCU, Carneiro J. Osnove histologije: tekst i atlas. 11.izd. Zagreb: Školska knjiga; 2005. str 502.
18. Nguyen AV, Soulika AM. The Dynamics of the Skin's Immune System. *Int J Mol Sci.* 2019;20(8):1811.
19. Lawand M, Déchanet-Merville J, Dieu-Nosjean M-C. Key Features of Gamma-Delta T-Cell Subsets in Human Diseases and Their Immunotherapeutic Implications. *Front Immunol.* 2017;8.

LITERATURA

20. Cargill M, Schrodi SJ, Chang M, Garcia VE, Brandon R, Callis KP, i sur. A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes. *Am J Hum Genet.* 2007;80(2):273–90.
21. Tsunemi Y, Saeki H, Nakamura K, Sekiya T, Hirai K, Fujita H, i sur. Interleukin-12 p40 gene (IL12B) 3'-untranslated region polymorphism is associated with susceptibility to atopic dermatitis and psoriasis vulgaris. *J Dermatol Sci.* 2002;30(2):161–6.
22. Zeng J, Luo S, Huang Y, Lu Q. Critical role of environmental factors in the pathogenesis of psoriasis. *J Dermatol.* 2017;44(8):863–72.
23. Ellis CN, Gorsulowsky DC, Hamilton TA, Billings JK, Brown MD, Headington JT, i sur. Cyclosporine improves psoriasis in a double-blind study. *JAMA.* 1986;256(22):3110–6.
24. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol.* 2011;30(1):16–34.
25. Cai Y, Shen X, Ding C, Qi C, Li K, Li X, i sur. Pivotal role of dermal IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells in skin inflammation. *Immunity.* 2011;35(4):596–610.
26. Laggner U, Di Meglio P, Perera GK, Hundhausen C, Lacy KE, Ali N, i sur. 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):2783–93.
27. Pantelyushin S, Haak S, Ingold B, Kulig P, Heppner FL, Navarini AA, i sur. Ror γ t⁺ innate lymphocytes and $\gamma\delta$ T cells initiate psoriasiform plaque formation in mice. *J Clin Invest.* 2012;122(6):2252–6.
28. Becher B, Pantelyushin S. Hiding under the skin: Interleukin-17-producing $\gamma\delta$ T cells go under the skin? *Nat Med.* 2012;18(12):1748–50.
29. Davey MS, Willcox CR, Hunter S, Kasatskaya SA, Remmerswaal EBM, Salim M i sur. The human V δ 2⁺ T-cell compartment comprises distinct innate-like V γ 9⁺ and adaptive V γ 9⁻ subsets. *Nat Commun.* 2018;9(1):1760.

LITERATURA

30. Stowe RP, Kozlova EV, Yetman DL, Walling DM, Goodwin JS, Glaser R. Chronic herpesvirus reactivation occurs in aging. *Exp Gerontol.* 2007;42(6):563-70.
31. Klenerman P, Oxenius A. T cell responses to cytomegalovirus. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(6):367-77.
32. Khairallah C, Déchanet-Merville J, Capone M. $\gamma\delta$ T Cell-Mediated Immunity to Cytomegalovirus Infection. *Front Immunol.* 2017;8:105.
33. Pitard V, Roumanes D, Lafarge X, Couzi L, Garrigue I, Lafon ME, i sur. Long-term expansion of effector/memory Vdelta2-gammadelta T cells is a specific blood signature of CMV infection. *Blood.* 2008;112(4):1317-24.
34. Venken K, Jacques P, Mortier C, Labadia ME, Decruy T, Coudenys J, i sur. ROR γ t inhibition selectively targets IL-17 producing iNKT and $\gamma\delta$ -T cells enriched in Spondyloarthritis patients. *Nat Commun.* 2019;10(1):9.
35. Déchanet J, Merville P, Lim A, Retière C, Pitard V, Lafarge X, i sur. Implication of gammadelta T cells in the human immune response to cytomegalovirus. *J Clin Invest.* 1999;103(10):1437-49.
36. Plužarić V, Štefanić M, Mihalj M, Tolušić Levak M, Muršić I, Glavaš-Obrovac L, i sur. Differential Skewing of Circulating MR1-Restricted and $\gamma\delta$ T Cells in Human Psoriasis Vulgaris. *Front Immunol.* 2020;11:572924.
37. Tan L, Fichtner AS, Bruni E, Odak I, Sandrock I, Bubke A, i sur. A fetal wave of human type 3 effector $\gamma\delta$ cells with restricted TCR diversity persists into adulthood. *Sci Immunol.* 2021;6(58):eabf0125.

11. ŽIVOTOPIS

Davor Ćosić

Datum i mjesto rođenja: 22.06.1997., Heilbronn, SR Njemačka

Adresa: Ulica Blaža Mađera 19, 48325 Novigrad Podravski

Školovanje:

2012. - 2016. Gimnazija Fran Galović, Koprivnica

2016. – 2022. Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika, Medicinski fakultet Osijek