

# Uloga citolitičkoga mehanizma posredovanoga perforinom u imunopatogenezi psorijaze i lihen planusa

---

**Prpić Massari, Larisa**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2004**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:188:298360>

*Rights / Prava:* [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-30**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University of Rijeka Library - SVKRI Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Larisa Prpić Massari**

**ULOGA CITOLITIČKOGA MEHANIZMA  
POSREDOVANOGA PERFORINOM U  
IMUNOPATOGENEZI PSORIJAZE I LIHEN  
PLANUSA**

**Doktorska disertacija**

Rijeka, 2004.

## I AUTOR

---

Ime i prezime : Larisa Prpić Massari

Datum i mjesto rođenja.: 31. ožujka 1971. Rijeka

Završeni fakultet : Medicinski fakultet Rijeka -1995.

Postdiplomski studij: Medicinski fakultet Rijeka, 1998.

Sadašnje zaposlenje: znanstveni novak Medicinski fakultet Rijeka

---

## II PODACI O DISERTACIJI I MENTORIMA

---

Naslov rada: Uloga citolitičkoga mehanizma posredovanoga perforinom u imunopatogenezi psorijaze i lihen planusa

Broj str. 135, sl.44, tab. 6, graf. 0, bibliografskih podataka: 175

Ustanova ili mjesto gdje je disertacija izrađena: – KBC Rijeka, Medicinski fakultet Rijeka

Znanstveno područje: BIOMEDICINA I ZDRAVSTVO

Znanstveno polje: Kliničke medicinske znanosti

Znanstvena grana: dermatologija

Mentori: prof.dr.sc. Franjo Gruber

Fakultet na kojem je obranjena: Medicinski fakultet Rijeka

---

## III OCJENA I OBRANA

---

Datum prijave teme: 26. studenoga 2002.

Datum predaje rad: 31. ožujka 2004.

Datum sjednice Vijeća na kojoj je rad prihvaćen: 29. lipnja 2004.

Sastav Povjerenstva koje je rad ocijenilo

prof.dr.sc. Biserka Radošević-Stašić, prof.dr.sc. Jasna Lipozenčić i prof.dr.sc. Gordana Zamolo

Datum obrane : 16. srpnja 2004.

Sastav Povjerenstva pred kojim je rad obranjen: prof.dr.sc. Biserka Radošević-Stašić, prof.dr.sc. Jasna Lipozenčić, prof.dr.sc. Gordana Zamolo i prof.dr.sc. Franjo Gruber

---

Mentor rada: Prof.dr.sc. Franjo Gruber

Doktorska disertacija obranjena je dana \_\_\_\_\_ u Rijeci, na  
Medicinskom fakultetu, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Prof. dr. sc. Biserka Radošević Stašić
2. Prof. dr. sc. Jasna Lipozenčić
3. Prof. dr. sc. Gordana Zamolo
4. Prof. dr. sc. Franjo Gruber

Rad ima 142 lista.

UDK klasifikacija:



Rad je izrađen na Klinici za kožne i spolne bolesti, Kliničkog bolničkog centra Rijeka u suradnji sa Zavodom za fiziologiju i imunologiju, te Zavodom za patologiju, Medicinskog fakulteta, Sveučilišta u Rijeci.

Istraživanja su dio znanstveno-istraživačkog projekta broj 062042 “Imunopatogenetski mehanizmi u psorijazi”, te projekta broj 062040 “Imunopatogenetski mehanizmi u papuloskvamoznim kožnim bolestima” glavnog istraživača prof. dr. sc. Franje Grubera. Projekt financira Ministarstvo znanosti i tehnologije Republike Hrvatske.

## ZAHVALE

*S osobitim poštovanjem se zahvaljujem mentoru prof. dr. sc. Franji Gruberu koji me stručno vodio tijekom izrade ovoga rada i pomagao u svim problemima i nedoumicama s kojima sam se tijekom specijalizacije iz dermatologije susretala.*

*Zahvaljujem se prof. dr. sc. Gordani Zamolo, te Miranu i Ozrenu sa Zavoda za patologiju bez kojih ove lijepe histološke slike ne bih mogla izraditi.*

*Najljepša hvala mojim dragim kolegicama i prijateljicama Gordani, Nataši, Vlatki, te gospođama Davorki i Kseniji sa Zavoda za fiziologiju i imunologiju na pomoći u laboratorijskom radu i analizama periferne krvi.*

*Zahvalnost dugujem i ujaku, akademiku Danielu Rukavini, koji mi je pokazao da probleme u znanstvenom i stručnom radu treba gledati kroz jednu širu dimenziju i uvijek sačuvati viziju.*

*Čovjek trećinu svoga života provede na poslu. Stoga, pri kraju u tekstu, ali na visokom mjestu u mom životu i srcu su moje kolegice i prijateljice sa Klinike za dermatovenerologiju Marija, Edita, Ines i Lili, kojima dugujem zahvalnost što su me kao mladog specijalizanta srdačno prihvatile, te pokazale iskreno prijateljstvo i nesebičnu pomoć u svim pitanjima i dvojabama na koje sam tijekom dosadašnjeg rada nailazila.*

*I na kraju, ovaj rad ne bih uspjela dovršiti bez pomoći i razumijevanja najbližih, mojih i Draženovih roditelja, Dražena, Ane, cijele moje rodbine i sina Borne, koji su žrtvujući svoje dragocijeno vrijeme i sebe ugradili u ove stranice.*

*Svima iskreno hvala.*

*Larisa Prpić Massari*

*... djedu, jer me učio poštenom i marljivom radu  
i baki, koja je negovala obitelj i dom ...*

Nitko nikada posve ne dovršava učenje.

**J. M. Templeton**

## SAŽETAK

Psorijaza i lihen planus spadaju u skupinu papuloskvamoznih kožnih bolesti, koje osim slične kliničke slike dijele i sličnu etiopatogenezu. Obje se bolesti ubrajaju u autoimune upalne bolesti posredovane T-staničnim imunitetom. Promjene staničnog fenotipa zapažene su kako u perifernoj krvi tako i u kožnim lezijama.

**CILJ ISTRAŽIVANJA:** rasvijetliti ulogu perforin posredovane, te Fas/FasL posredovane citolize u imunopatogenezi psorijaze i lihen planusa s osvrtom na nazočnost dendritičnih stanica, te njihovu moguću ulogu u imunopatogenezi psorijaze i mehanizmima stanične citotoksičnosti.

**ISPITANICI I METODE:** Limfocite periferne krvi 31-og bolesnika s psorijazom (18 u akutnom stadiju bolesti i 13 u remisiji), te 26 bolesnika s lihen planusom (15 u akutnom stadiju i 11 u remisiji) obilježili smo monoklonskim protutijelima na limfocitne biljege i unutarstaničnu molekulu perforin, te analizirali metodom protočne citometrije. Uzorke promijenjene i nepromijenjene kože 17 bolesnika s psorijazom (9 akutni plak i 8 kronični plak) i 10 bolesnika s lihen planusom analizirali smo imunohistokemijskim bojanjem na limfocitne antigene, perforin i FasL molekulu, te biljege dendritičnih stanica (CD1a, CD80 i CD83 molekule).

**REZULTATI:** U prvoj fazi istraživanja promatrali smo promjene staničnog fenotipa na sistemskoj razini, tj. u perifernoj krvi. Uočili smo znatno veći broj limfocita T, osobito CD8 fenotipa i NK stanica, te stanica koje ispoljavaju citolitičku molekulu perforin, u akutnom stadiju psorijaze u odnosu na remisiju ( $p < 0,01$ ). Dvostrukim bojanjem smo utvrdili da su subpopulacije, koje ispoljavaju perforinsku molekulu (citotoksične CD8+P+ i CD56+P+ stanice) također znatno više zastupljene u akutnom stadiju psorijaze. Imunohistokemijskom analizom kožnih biopatata nastojali smo potvrditi ulogu stanične citotoksičnosti na lokalnoj razini. Uočili smo znatno veće ispoljavanje limfocitnih biljega CD4 i CD8 fenotipa, kao i perforinske i FasL molekule u psorijatičnom plaku u odnosu na nepromijenjenu kožu oboljelih, te zdravu kožu. Perforinska molekula je podjednako ispoljena u oba plaka, dok je FasL biljeg tri puta više nazočan u kroničnom plaku ( $p < 0,01$ ). Također smo uočili i znatno veće nakupljanje CD8+ stanica, te perforinske i FasL molekule u epidermisu psorijatičnog plaka u odnosu na dermis ( $p < 0,05$  za CD8, te  $p < 0,001$  za perforin). Učinak citotoksičnih stanica vidi se kao prodor CD8+ limfocita T i perforin+ stanica iz dermisa u epidermis. Na tim

mjestima prisutna je destrukcija bazalnog sloja epidermisa, što se histološki očituje kao likvefakcijska degeneracija, te hidropska promjena keratinocita. Uočili smo i nakupljanje nezrelih CD1a+ antigen predočnih stanica u epidermisu i dermisu psorijatičnog plaka, za razliku od zrelih CD83+ stanica, koje prevladavaju u dermisu.

Analizirajući perifernu krv oboljelih od lihen planusa uočili smo značajno veći postotak citotoksičnih CD3+P+ kao i CD8+P+ stanica u akutnom stadiju bolesti u usporedbi s postotkom tih stanica u remisiji i kod zdravih osoba ( $p < 0,05$  za CD3+P+,  $p < 0,01$  za CD8+P+). Na lokalnoj razini, tj. u lihenskoj papuli postoji također znatno veće ispoljavanje limfocitnih biljega, te perforinske molekule u odnosu na nepromijenjenu i zdravu kožu. Citotoksične P+ stanice prodiru iz dermisa u epidermis lihenske papule, izazivajući pritom likvefakcijske promjene bazalnog sloja epidermisa i hidropsku promjenu keratinocita.

**ZAKLJUČAK:** Dobiveni rezultati potvrđuju ulogu citolitičkih mehanizama u imunopatogenezi psorijaze i lihen planusa.

## SUMMARY

Psoriasis and lichen planus belong to the group of papulosquamous skin diseases, which share a similar clinical appearance and etiopathogenesis. They are both T cell mediated autoimmune disorders. Alternations in cell phenotype are observed in peripheral blood and in skin lesions as well.

**OBJECTIVES:** to analyze a role of perforin and Fas/FasL mediated cytotoxicity in immunopathogenesis of psoriasis and lichen planus. The presence of dendritic cells and their possible role in immunopathogenesis of psoriasis are addressed too.

**PATIENTS AND METHODS:** Peripheral blood lymphocytes of 31 psoriatic patients (18 in acute phase, 13 in remission) and 26 patients with lichen planus (15 in acute phase, 11 in remission) were labeled with lymphocyte monoclonal antibodies and intracellular molecule perforin and analyzed by flow cytometry. Biopsies of involved and uninvolved skin of 17 psoriatic patients (9 acute plaque and 8 chronic plaque) and 10 patients with lichen planus were immunohistochemically stained for lymphocyte markers, perforin and FasL molecules, and dendritic cell markers (CD1a, CD80 and CD83).

**RESULTS:** First, we examined the changes of cell phenotype in peripheral blood. We observed higher proportions of T lymphocytes, especially CD8<sup>+</sup> and NK cells, as well as perforin expressing cells in acute phase of disease as opposed to remission ( $p < 0,01$ ). Double staining also demonstrated a dominant presence of perforin expressing cells, mainly cytotoxic CD8<sup>+</sup>P<sup>+</sup> and CD56<sup>+</sup>P<sup>+</sup> in acute phase of psoriasis. Immunohistochemical staining of skin biopsies was performed in attempt to confirm the role of cell cytotoxicity on local level. We noticed a higher expression of lymphocyte antigens of CD4 and CD8 phenotype as well as perforin and FasL molecule in psoriatic plaque compared to uninvolved skin and healthy skin. Perforin molecule is three times more present in chronic plaque ( $p < 0,01$ ). We observed higher accumulation of CD8<sup>+</sup> cells, perforin and FasL molecule in epidermis of psoriatic plaque compared to dermis ( $p < 0,05$  for CD8 and  $p < 0,01$  for perforin). The effect of cytotoxic cells was seen as an influx of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes and perforin<sup>+</sup> cells from dermis into epidermis. On those areas, destruction of basal keratinocytes was noticed, histologically demonstrated as spongiform degeneration. We observed the accumulations of CD1a<sup>+</sup> antigen presenting cells in epidermis and dermis and CD83<sup>+</sup> cells predominantly in dermis of

psoriatic plaque. Analyzing peripheral blood lymphocytes in lichen planus patients we noticed a significantly higher proportion of cytotoxic CD3+P+ as well as CD8+P+ cells in acute phase of disease as opposed to remission and healthy controls ( $p < 0,05$  for CD3+P+ and  $p < 0,01$  for CD8+P+). On the local level, in the skin lesion of lichen planus patients, there was also higher expression of lymphocyte antigens and perforin molecule compared to uninvolved and healthy skin. There was an influx of cytotoxic perforin+ cells from dermis into epidermis of lichen planus lesion, causing spongiform changes of basal keratinocytes.

**CONCLUSION:** Obtained results confirmed the role of cytolytic mechanisms in immunopathogenesis of psoriasis and lichen planus.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1. Psorijaza</b> .....	1
<i>1.1.1. Nasljeđivanje</i> .....	1
<i>1.1.2. Etiologija</i> .....	2
<i>1.1.3. Klinički oblici psorijaze</i> .....	2
<i>1.1.3.1. Kronična stacionarna psorijaza</i> .....	3
<i>1.1.3.2. Eruptivna (gutata) psorijaza</i> .....	4
<i>1.1.3.3. Eritrodermijska psorijaza</i> .....	4
<i>1.1.3.4. Pustulozna psorijaza</i> .....	5
<i>1.1.3.5. Psorijatični artritis</i> .....	6
<i>1.1.3.6. Psorijaza vlasišta, intertriginoznih predjela, retroaurikularne i genitalne regije</i> .....	6
<i>1.1.3.7. Nokti</i> .....	7
<i>1.1.4. Patohistološke promjene u psorijazi</i> .....	7
<i>1.1.4.1. Patohistološke promjene u kroničnoj stacionarnoj psorijazi</i> .....	7
<i>1.1.4.2. Patohistološke promjene u eruptivnoj (gutata) psorijazi</i> .....	8
<i>1.1.5. Imunopatogeneza psorijaze</i> .....	8
<i>1.1.5.1. Poremećaj keratinocitnog rasta u psorijazi</i> .....	8
<i>1.1.5.2. Fenotip limfocita T u psorijatičnim lezijama</i> .....	9
<i>1.1.5.3. Citokinski profil limfocita T u psorijatičnim lezijama</i> .....	10
<i>1.1.5.4. Obilježja T staničnog receptora</i> .....	11
<i>1.1.5.5. Limfociti T kao izvor čimbenika rasta keratinocita</i> .....	11
<i>1.1.5.6. Aktivacija limfocita T</i> .....	12
1.1.5.6.1. Dodir s keratinocitima .....	12
1.1.5.6.2. Dodir s antigen predočnim stanicama .....	13
<i>1.1.5.7. Mogući antigeni stimulus</i> .....	13
1.1.5.7.1. Uloga $\beta$ -hemolitičkog streptokoka kao superantigena u aktivaciji limfocita T .....	13
1.1.5.7.2. Uloga autoantigena, tj. klasičnog antigenskog prepoznavanja u aktivaciji limfocita T .....	15



1.1.5.7.3. Superantigenom aktivirani limfociti T kao začetnici patoloških događaja i klasičnim autoantigenom aktivirani limfociti T kao čuvari patologije u lezijama .....	15
1.1.5.7.4. Uloga ostalih čimbenika u aktivaciji limfocita T .....	17
1.1.5.8. <i>Uloga citokina u patogenezi psorijaze</i> .....	17
1.1.5.9. <i>Uloga adhezijskih molekula u nakupljanju limfocita u lezijama</i> ..	18
<b>1.2. Lihen planus</b> .....	19
<b>1.2.1. Nasljeđivanje</b> .....	19
<b>1.2.2. Etiologija</b> .....	19
<b>1.2.3. Klinički oblici lihen planusa</b> .....	20
1.2.3.1. <i>Egzantematski lihen planus</i> .....	21
1.2.3.2. <i>Lihen planus mukoznih membrana</i> .....	21
1.2.3.3. <i>Nokti</i> .....	22
1.2.3.4. <i>Folikularni lihen planus</i> .....	22
1.2.3.5. <i>Hipertrofični lihen planus</i> .....	22
1.2.3.6. <i>Atrofični i nodularni lihen planus</i> .....	23
1.2.3.7. <i>Bulozni lihen planus</i> .....	23
1.2.3.8. <i>Erozivni i ulcerativni lihen planus</i> .....	23
1.2.3.9. <i>Aktinični lihen planus</i> .....	24
1.2.3.10. <i>Lihen planus dlanova i tabana</i> .....	24
<b>1.2.4. Patološke promjene kod lihen planusa</b> .....	24
<b>1.2.5. Imunopatogeneza lihen planusa</b> .....	25
1.2.5.1. <i>Fenotip limfocita T u žarištima lihen planusa, te perifernoj krvi             oboljelih</i> .....	25
1.2.5.2. <i>Obilježja T staničnog receptora</i> .....	26
1.2.5.3. <i>Citokinski profil limfocita T u perifernoj krvi i u lezijama lihen             planusa</i> .....	27
1.2.5.4. <i>Keratinociti kao izvor citokina i čimbenika rasta</i> .....	27
1.2.5.5. <i>Prisustvo dendritičnih stanica u lezijama lihen planusa</i> .....	28
<b>1.3. Molekularni mehanizmi stanične citotoksičnosti</b> .....	28
<b>1.3.1. Citotoksičnost posredovana perforinom</b> .....	29
1.3.1.1. <i>Građa perforina</i> .....	29
1.3.1.2. <i>Mehanizam citolize posredovane perforinom</i> .....	29

1.3.1.3. Uloga grenzima u citolizi posredovanoj perforinom .....	30
1.3.2. Citotoksičnost posredovana FasL/Fas putem, te putem TNF- $\alpha$ .....	30
1.3.2.1. Obilježja Fas liganda i receptora .....	30
1.3.2.2. Citolitički put FasL/Fas .....	31
1.3.2.3. Citolitički put posredovan TNF- $\alpha$ -om .....	31
1.3.4. Kaspaze i njihova uloga u citolizi .....	32
1.3.4.1. Vrste kaspaza i njihova obilježja .....	32
1.3.4.2. Proteolitičko cijepanje kaspazama .....	33
<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>34</b>
<b>3. ISPITANICI I METODE RADA .....</b>	<b>36</b>
<b>3.1. Ispitanici .....</b>	<b>36</b>
3.1.1. Grupe bolesnika s psorijazom .....	36
3.1.2. Grupe bolesnika s lihen planusom .....	38
3.1.3. Kontrolna grupa zdravih osoba .....	39
<b>3.2. Materijal .....</b>	<b>39</b>
3.2.1. Kemikalije .....	39
3.2.2. Mediji i puferi .....	40
3.2.3. Protutijela .....	41
<b>3.3. Biološki materijal .....</b>	<b>43</b>
3.3.1. Dobivanje suspenzije limfocita periferne krvi .....	43
3.3.2. Biopsije kože .....	44
<b>3.4. Laboratorijske metode .....</b>	<b>44</b>
3.4.1. Određivanje perforina metodom indirektno imunofluorescencije .....	44
3.4.2. Obilježavanje membranskih biljega direktnom i indirektnom imunofluorescencijom .....	45
3.4.3. Istovremeno obilježavanje dvaju antigena, unutarstaničnog (perforina) i površinskog (membranskog) antigena .....	45
3.4.4. Protočna citometrija .....	46
3.4.5. Imunohistokemijsko bojanje zasnovano na LSAB (od engl. labelled streptavidin biotin) vizualizacijskom sistemu .....	46
<b>3.5. Statistička obrada podataka .....</b>	<b>47</b>

4. REZULTATI .....	48
4.1. Kretanje limfocitnih subpopulacija i ispoljavanje perforinske molecule u perifernoj krvi oboljelih od psorijaze .....	48
4.1.1. Promjene fenotipskih obilježja limfocita periferne krvi (LPK) u bolesnika s psorijazom tijekom akutnog stadija i remisije .....	48
4.1.2. Ekspresija perforina u LPK .....	50
4.1.3. Usporedno ispoljavanje (koekspresija) perforinske molecule i površinskih biljega na citotoksičnim limfocitima T i NK stanicama periferne krvi .....	50
4.1.4. Ekspresija perforina među pojedinim limfocitnim podvrstama periferne krvi u oboljelih od psorijaze .....	54
4.1.5. Fenotipska obilježja perforin pozitivnih LPK u bolesnika s psorijazom .....	56
4.1.6. Određivanje količine perforina po stanici u obliku srednje vrijednosti intenziteta fluorescencije (AFI) .....	56
4.2. Imunohistološki prikaz nazočnosti pojedinih limfocitnih biljega, perforinske molekule, FasL molecule i biljega antigen predočnih stanica u akutnom plaku, kroničnom plaku, te nepromijenjenoj koži psorijatičara u akutizaciji i remisiji bolesti .....	59
4.2.1. Fenotipska obilježja stanica, te njihov udio u akutnom plaku, kroničnom plaku i nepromijenjenoj koži psorijatičara u akutizaciji i remisiji bolesti .....	59
4.2.2. Nazočnost biljega NK stanica i njihov udio u akutnom plaku, kroničnom plaku, te nepromijenjenoj koži psorijatičara u akutizaciji i remisiji bolesti .....	61
4.2.3. Ispoljavanje perforina u akutnom plaku, kroničnom plaku, te nepromijenjenoj koži psorijatičara u akutizaciji i remisiji bolesti .....	66
4.2.4. Ispoljavanje FasL molecule u akutnom plaku, kroničnom plaku, te nepromijenjenoj koži psorijatičara u akutizaciji i remisiji bolesti .....	81
4.2.5. Ispoljavanje biljega dendritičnih stanica CD1a, CD80 i CD83 u psorijatičnom plaku .....	81
4.3. Kretanje limfocitnih subpopulacija i ispoljavanje perforinske molecule u perifernoj krvi oboljelih od lihen planusa .....	84

4.3.1. Promjene fenotipskih karakteristika limfocita periferne krvi (LPK), te ispoljavanje perforinske molekule u bolesnika s lihen planusom tijekom akutne faze i remisije bolesti .....	84
4.3.2. Usporedno ispoljavanje (koekspresija) perforinske molekule i površinskih biljega na citotoksičnim limfocitima T i NK stanicama periferne krvi .....	87
4.3.3. Ekspresija perforina među pojedinim limfocitnim podvrstama periferne krvi u oboljelih od lihen planusa tijekom akutnog stadija i stadija remisije .....	87
4.3.4. Fenotipska obilježja perforin pozitivnih LPK u bolesnika s lihen planusom .....	92
4.3.5. Određivanje količine perforina po stanici u obliku srednje vrijednosti intenziteta fluorescencije (AFI) .....	92
4.4. Imunohistološki prikaz nazočnosti pojedinih limfocitnih biljega, te ispoljavanja perforinske molekule i FasL molecule u kožnoj leziji lihen planusa i nepromijenjenoj koži istih bolesnika .....	95
4.4.1. Fenotipska obilježja stanica, te njihov udio u kožnoj leziji lihen planusa, te nepromijenjenoj koži istih bolesnika .....	95
4.4.2. Ispoljavanje perforina i FasL molekule u kožnoj leziji lihen planusa, te nepromijenjenoj koži istih bolesnika .....	97
5. RASPRAVA .....	111
6. ZAKLJUČCI .....	122
7. LITERATURA .....	124
8. ŽIVOTOPIS .....	139

## 1. UVOD

Psorijaza i lihen planus su kožne bolesti, koje se prema kliničkoj slici svrstavaju u skupinu eritematoskvamoznih, odnosno papuloznih dermatoza (1). Međutim, osim što dijele sličnu kliničku sliku, imaju i sličnu etiopatogenezu (1). Unatoč činjenici da imunološki mehanizmi uključeni u nastanak ovih kožnih bolesti nisu još u potpunosti rasvijetljeni, smatra se da su obje posredovane T-staničnim imunitetom (1,2).

### 1.1. Psorijaza

Psorijaza je nasljedna, recidivirajuća, upalna bolest kože obilježena akutnim egzantematskim i kroničnim postojanim fazama (1,2). Bolest se može javiti u bilo kojoj životnoj dobi, ali se obično javlja u dobi između 10-te i 30-te godine života, češće u ljudi bijele rase, nego u ostalih rasa (1). Učestalost psorijaze razlikuje se u različitim podnebljima i populacijama, no može se reći da bolest zahvaća 1-3% ukupnog pučanstva (2).

#### 1.1.1. Nasljeđivanje

Kao mnoge autoimune bolesti, psorijaza ima jaku genetsku podlogu (3). Smatra se da je kod psorijaze riječ o poligenskom, multifaktorijskom načinu nasljeđivanja (3-5). Bolest je vezana uz nazočnost pojedinih HLA gena, najčešće HLA-B13, B57, Cw6 i Cw7, ali također i HLA-A1, B37, B39, B27, Cw11, te DR4, DR7 i DQA1\*0201 (3,4).

Na temelju životne dobi u kojoj se po prvi put javlja, te povezanosti s antigenima HLA, razlikujemo dva tipa nepustulozne psorijaze (2,6). Tip 1 je obilježen ranom pojavom bolesti (prije 40-te godine života), naglašenim obiteljskim pojavljivanjem, te združenošću s HLA antigenima Cw6, B13, B57 i DRB1\*0701 (3,4). Tip 2 počinje kasnije, obično u 60-tim godinama života, nema obiteljskog pojavljivanja bolesti, ali može postojati združenošću s HLA-Cw2 ili B27 antigenima (3,4). Najnovija istraživanja mapiranjem gena pokazuju da se genski lokusi odgovorni za psorijazu nalaze na osam različitih kromosoma, od kojih su najznačajnija četiri, PSORS1 na 6p21.3, PSORS2 na 17q, te PSORS3 na 4q i PSORS4 na 1q (3,4,5). HLA aleli vezani za psorijazu se najčešće nasljeđuju po tipu produženog haplotipa HLA Cw6-B57-DRB1\*0701-DQA1\*0201-DQB1\*0303 (4).



Dakle, na osnovu spoznaje o povezanosti psorijaze s genetskom komponentom, bolest se može podijeliti na genotipsku ili latentnu psorijazu, gdje nema kliničkih obilježja bolesti, iako postoji genetska podložnost; geno-fenotipsku ili subkliničku kod koje također nema kliničkih obilježja bolesti, ali je moguće biokemijskim metodama dokazati povećanu sintezu DNA, glikolizu u stanicama epidermisa i povećan broj mastocita u dermisu, te fenotipsku ili manifestnu psorijazu sa svim kliničkim obilježjima bolesti (1,2).

### 1.1.2. Etiologija

Budući da je psorijaza poligenska bolest, potaknuta čimbenicima okoliša, postoje brojni vanjski i unutarnji čimbenici, koji mogu izazvati prijelaz iz latentne, genotipske psorijaze u klinički očitovan fenotip (1).

Od vanjskih, tj. egzogenih poticajnih čimbenika na prvom su mjestu mehaničke i fizikalne ozljede kože (npr. pritisak, trauma, opekline, ubodi insekata, ultraljubičaste zrake, rtg zrake i sl.), zatim ozljede kože kemijskim putem (antipsorijatični lijekovi naneseni izvana, toksične tvari), te neke upalne dermatoze (npr. zoster, furunkuli, miliaria) (1,2). U skupinu egzogenih poticajnih čimbenika spada i Köbnerov fenomen, tj. pokusno dobiven izomorfni podražajni učinak, koji se očituje pojavom psorijatičnih promjena na mjestu mehaničke ozljede nakon 10-14 dana, kod osoba sa genetskom sklonošću za psorijazu (1,2).

Od unutarnjih ili endogenih čimbenika, ističu se akutne bakterijske, virusne ili gljivične infekcije, zatim terapija nekim lijekovima, trudnoća, dijeta, te stresne situacije (1,2). Infekcija se smatra čestim poticajnim čimbenikom naročito kod prvog izbijanja psorijatičnih promjena (1). Akutna eruptivna ili kapljičasta (gutata) psorijaza obično nastaje 1-2 tjedna nakon akutne streptokokne infekcije (6). U vrlo velikog broja bolesnika s akutnom gutata psorijazom, te određenog broja bolesnika s kroničnom psorijazom izoliran je *Streptococcus pyogenes* ( $\beta$ -hemolitički streptokok grupe A) (6). Psorijaza može nastati i nakon infekcije humanim virusom imunodeficijencije (HIV) (6). Nagla pojava akutne eruptivne psorijaze ili psorijaziformnog dermatitisa kao i egzacerbacija bolesti u bolesnika sa prethodno kroničnom stabilnom psorijazom govori u prilog mogućoj infekciji HIV-om (6).

Danas se zna da sistemski, a ponekad i lokalno primijenjeni kortikosteroidi kod naglog ukidanja, koje prati dugotrajno uzimanje, mogu dovesti do pogoršanja psorijaze

(6). Egzacerbacija bolesti se, također, povezuje i s terapijom antimalaricima,  $\beta$ -bloktorima, inhibitorima angiotenzin-konvertirajućeg enzima (ACE-inhibitorima) i litijem (6). U otprilike 30-40% odraslih oboljelih od psorijaze, bolest je izazvana ili pogoršana stresom, dok je taj postotak kod djece još i veći (90%) (6).

### 1.1.3. Klinički oblici psorijaze

Temeljna psorijatična promjena je oštro ograničena papula ili plak sa srebrnastobjeličastim, lako lomljivim ljuskama na površini (2). Polagano skidanje ljuski drvenim štapićem nalikuje na skidanje slojeva s voštane svijeće, te se ta pojava naziva "fenomen voštane svijeće" (2). Ako se skidanje ljuski nastavi, dolazi se do najnižeg sloja epidermisa iznad dermalne papile, koji izgleda poput vlažnog eritematoznog sloja, što se zove "fenomen posljednje kože" (1). Kada se odstrani taj zadnji sloj epidermisa nastaje kapljičasto krvarenje u vrhovima papila, tj. "fenomen točkastog krvarenja" ili Auspitzov fenomen (2).

Dakle, temeljno obilježje psorijaze je eritematoskvamozna papula ili plak (1,2). Obzirom na njihovu veličinu i lokalizaciju, te tijekom bolesti i nazočnost drugih simptoma kao što su svrbež, zahvaćenost zglobova i opći simptomi, psorijaza se dijeli na nekoliko kliničkih oblika: kronična stacionarna psorijaza, eruptivna (kapljičasta) psorijaza, eritrodermijska psorijaza, pustulozna psorijaza, te psorijatični artritis (1,2).

#### 1.1.3.1. Kronična stacionarna psorijaza

Kronična stacionarna psorijaza (psoriasis vulgaris) je najčešći klinički oblik psorijaze (2). Obilježena je s nekoliko slabije ili jače infiltriranih, oštro ocrtanih, eritematoskvamoznih žarišta, koja traju mjesecima ili godinama (1,2,6). Postoji stalno stvaranje velikih količina ljuski sa vrlo malim porastom veličine i smještaja lezija (6). Lezije ne pokazuju težnju da spontano zacijele, ali niti da se spontano povećavaju (1). Predilekcijska mjesta su laktovi, koljena i vlasište, te retroaurikularna i lumbosakralna regija, anus i pupak (1,6).

Žarišta mogu biti veličine kovanog novca (psoriasis numularis) i veća (psoriasis in placibus). Mogu se i međusobno stapati, te nastaju velika psorijatična žarišta, koja podsjećaju na zemljovid (psoriasis geographica) (2,6). Ponekad lezije mogu pokazivati i centralnu regresiju, što dovodi do nastanka prstenastih oblika (anularna psorijaza) (6).

Vrlo je teško mehanički izazvati stvaranje ovih plakova, te je izomorfni odgovor većinom negativan (1). Svrbež je rijedak (1). Ovaj oblik psorijaze potrebno je liječiti intenzivnom lokalnom terapijom (1). Iako su kod kronične stacionarne psorijaze žarišta obično nepromijenjena kroz duže razdoblje mogući su napadi eruptivne egzantematske psorijaze nakon nekog vanjskog ili unutrašnjeg poticaja (1).

#### 1.1.3.2. Eruptivna (kapljičasta) psorijaza

Eruptivnu, tj. kapljičastu psorijazu (*psoriasis guttata*) obilježavaju male (0,5 do 1,5 cm promjera) lezije smještene na trupu i proksimalnim dijelovima ekstremiteta (2,6). Ovaj se oblik najčešće javlja kao prva pojava bolesti, te je stoga češći u djetinjstvu i kod mlađih odraslih osoba (1,6). Javlja se obično 1-2 tjedna nakon tonzilitisa izazvanog  $\beta$ -hemolitičkim streptokokom ili akutne virusne infekcije (gripa, ospice) (1,6,7). Lezije se mogu izazvati mehaničkim podražajem, tj. izomorfni ili Köbnerov fenomen je obično pozitivan (1). Svrbež je također čest simptom ovog oblika psorijaze (1).

Kapljičasta psorijaza obično teži spontanom nestanku kroz nekoliko tjedana ili mjeseci, ali se može razviti i u kroničnu stacionarnu psorijazu (1,7). Ovaj oblik psorijaze bolje reagira na terapiju, te je dovoljna blaga lokalna terapija (1,6).

#### 1.1.3.3. Eritrodermijska psorijaza

Eritrodermijska psorijaza (*psoriasis erythrodermica*) je generalizirani oblik psorijaze, koji zahvaća sve dijelove tijela uključujući lice, dlanove, stopala, nokte, trup i ekstremitete (6). Iako su sva obilježja psorijatičnog plaka prisutna, eritem ipak dominira, dok je ljuštenje epidermisa pitirijaziformno i obično manje zastupljeno u usporedbi s kroničnom stacionarnom psorijazom (1,6). Postoje i ozbiljene promjene noktiju, pa čak i njihov potpuni gubitak (6).

Bolesnici se često tuže na jaki svrbež, a ponekad se opaža i lagano povećanje limfnih čvorova kao odraz dermatopatske limfadenopatije (1). Javljaju se i opći poremećaji kao što su: gubitak tekućine zbog povećanog nevidljivog isparavanja, gubitak proteina kao posljedica trajnog ljuštenja, te gubitak topline zbog jake upale kože i vazodilatacije (1,2). Zbog navedenih razloga ovi bolesnici zahtijevaju neodgodiv bolnički nadzor (2).



Eritrodermijska psorijaza se može razviti naglo kao prva manifestacija bolesti, ali češće nastaje postepeno iz gutata psorijaze ili kronične stacionarne psorijaze (1,2,7). U ovom drugom slučaju obično se vide preostali otočići nepromijenjene kože (2). Eritrodermijska psorijaza može nastati kao posljedica nepodnošenja lokalne terapije (npr. cignolin, UVB) što bi se moglo shvatiti kao generalizirani Kōbnerov fenomen (6). Također se može razviti i iz generalizirane pustulozne psorijaze s time da dolazi do izražaja eritrodermija, pustule nestaju, ali su prisutna ostala obilježja pustulozne psorijaze kao što su visoka temperatura, česti recidivi i slabost (2,6).

#### 1.1.3.4. Pustulozna psorijaza

Pustulozna psorijaza (psoriasis pustulosa) je oblik psorijaze, histološki obilježen upalnim promjenama, naglašenom sklonošću eksudaciji, te Munroovim mikroapscesima, koji se očituju klinički vidljivim pustulama (1). Pustule su sterilne i zato ih treba razlikovati od pustula uzrokovanih sekundarnom stafilokoknom infekcijom ili infekcijom uzrokovanom *Candidom albicans* (1). Postoji nekoliko oblika pustulozne psorijaze (1).

Generalizirana pustulozna psorijaza ili von Zumbusch tip je najteži eksudativno-inflamatorni oblik psorijaze (1). Bolest je obilježena naglim izbijanjem sterilnih pustula, veličine 2-3 mm u promjeru, diseminiranih po trupu i ekstremitetima uključujući ležište nokta, dlanove i tabane (6). Pustule obično izbijaju na eritematoznoj i upalno promijenjenoj koži, prvo kao pojedinačne eflorescencije, koje se postepeno stapaju kako bolest postaje ozbiljnija (6). Usporedo s izbijanjem kožnih promjena bolesnik postaje visoko febrilan uz groznicu i opću slabost (2,6). Česte su i promjene matice noktiju, moguć je i gubitak čitavog nokta, a u bolesnika s dužim trajanjem bolesti vrhovi prstiju postaju atrofični (6). Kao i kod drugih psorijatičnih oblika, lice ostaje nezahvaćeno (6). Moguće su i sistemske komplikacije u obliku poremećaja jetrenog metabolizma, pneumonije i nedostatka željeza (1). Kod generalizirane pustulozne psorijaze treba uvijek razmotriti nastanak bolesti nakon provokacije infekcijom, hormonalnim poremećajima ili lijekovima (1). U manje česte oblike pustulozne psorijaze spadaju i psoriasis vulgaris cum pustulatione, psoriasis pustulosa palmoplantaris, te acrodermatitis continua suppurativa.

### 1.1.3.5. Psorijatični artritis

U poseban klinički oblik psorijaze ubraja se i psorijatični artritis (1). Radi se o upalnoj bolesti, koja zahvaća ligamente, tetive, fascije i zglobove (2). Javlja se kod 5-7% bolesnika sa psorijazom, obično u dobi između 35-te i 40-te godine života i to češće u bolesnika s težim oblicima psorijaze, kao što je pustulozna psorijaza (1,2). Bolest je udružena sa HLA-B27 genotipom kao i Reiterova bolest i sacroileitis (1).

Razlikuju se tri temeljna oblika psorijatičnog artritisa: distalni psorijatični artritis, koji asimetrično zahvaća distalne interfalangealne zglobove šaka i stopala, što dovodi do otoka i boli; mutilirajući psorijatični artritis obilježen osteolizom i erozijom kostiju malih zglobova; te psorijatični poliartritis, koji započinje asimetrično i vodi k izoliranom oštećenju zglobova (1).

### 1.1.3.6. Psorijaza vlasišta, intertriginoznih predjela, retroaurikularne i genitalne regije

Unatoč tome što je psorijatični uzorak u pravilu isti i sastoji se od eritematoskvamoznih papula i plakova, pojedine lokalizacije kožnih lezija imaju svoja posebna, drugačija obilježja (1).

Psorijaza vrlo često zahvaća vlasište u obliku oštro ograničenih eritematoznih žarišta smještenih obično uz prednji rub i s bočnih strana vlasišta, sa izuzetno obilnim ljuštenjem (1,2). Opadanja kose najčešće nema (1). Ono se može javiti samo izuzetno rijetko, kod pustulozne ili eritrodermijske psorijaze, uslijed jakog ljuštenja vlasišta (1,2).

Toplina i vlažnost intertriginoznih područja, kao što su aksilarni, submamarni i ingvinalni predjeli, te perianalno uzrokuju gubitak srebrnih ljuskica, dok su psorijatična žarišta oštro ograničena i lagano infiltrirana (1). Svrbež je čest (1).

Retroaurikularna psorijaza je obilježena oštro ograničenim upalno promijenjenim plakovima smještenim iza uha uz izrazito jaki svrbež (1). Psorijazu genitalne regije obilježavaju oštro ocrтана, eritematozna, blago infiltrirana žarišta s jedva naznačenim ljuštenjem (1).

### 1.1.3.7. Nokti

Promjene noktiju se javljaju u oko 30-50% svih bolesnika s psorijazom (1). Mogu se javiti u dva oblika: jedan koji zahvaća maticu i drugi koji zahvaća ležište nokta (1).

Psorijaza matice nokta obilježena je punktiformnim udubinama na površini nokta (*psoriasis punctata unguium*) veličine do glavice pribadače prisutnim često u vrlo velikom broju, te katkada i na svim noktima (1). Udubine nastaju kao rezultat sitnih areala parakeratoze u matici nokta (1).

Psorijaza ležišta nokta obilježena je subungualnim psorijatičnim žarištima promjera nekoliko milimetara, koji zbog njihove žućkaste boje nalikuju uljnoj mrlji na površini nokta ("psoriatic oil spot") (1). Promjene se postepeno povećavaju usporedo s rastom nokta i dostižu slobodni rub nokta (1).

Psorijaza matice i ležišta nokta može se javiti istovremeno, te u tom slučaju rezultirati gubitkom čitavog nokta (1). Nokat je zamijenjen žućkastim, keratotičnim materijalom, što se naziva psorijatičnim distrofičnim noktom (1).

Psorijatična klinička slika može nestati spontano ili tijekom terapije, bez ožiljaka (1). Rijetko se na mjestima nekadašnjih lezija mogu vidjeti hiperpigmentacije ili psorijatična leukoderma (1). Pseudoleukoderma može nastati nakon terapije psorijaze antralinom (1).

### 1.1.4. Patohistološke promjene u psorijazi

U preparatima dobivenim biopsijom psorijatično promijenjene kože nalaze se mikroskopske promjene kako u epidermisu tako i u gornjem dermisu (6).

#### 1.1.4.1. Patohistološke promjene u kroničnoj stacionarnoj psorijazi

Epidermis je pravilno zadebljan i od 4 do 5 puta deblji od zdravog epidermisa (1). Epidermalne pregrade su izdužene i uske, a u donjim dijelovima nešto deblje (1). Iznad vrhova papila epidermis je sveden na samo nekoliko slojeva stanica (1). Poremećaji keratinizacije očituju se u hiperkeratozi i parakeratozi, te ponekad i potpunoj

odsutnosti zrnatog sloja (2). Unutar parakeratotičnog epidermisa vide se Munroovi mikroapscesi (2).

Papilarni dermis je obilježen izduženim papilama, koje su edematozne često sa perivaskularnom, upalnom infiltracijom histiocita, limfocita i pojedinačnih neutrofilnih leukocita, te širokim i dilatiranim kapilarama ("cotton balls") (1).

U dermisu je također prisutan perivaskularni upalni infiltrat, koji se sastoji od histiocita, limfocita i mastocita (1).

#### *1.1.4.2. Patohistološke primjene u eruptivnoj (kapljičastoj) psorijazi*

Psorijaza gutata se histološki razlikuje od vulgarne psorijaze u tome što je epidermalna hiperplazija slabije izražena, a epidermalne pregrade su znatno manje izdužene (2,6). Zrnati sloj samo mjestimice nedostaje (2,6).

#### *1.1.5. Imunopatogeneza psorijaze*

##### *1.1.5.1. Poremećaj keratinocitnog rasta u psorijazi*

Etiologija epidermalne hiperproliferacije, koja je patohistološko obilježje psorijaze, još se uvijek ispituje (8). Smatra se da može nastati kao posljedica povećanog postotka matičnih stanica, koje sudjeluju u staničnoj diobi ili broja staničnih ciklusa koje stanice u diobi prolaze prije nego uđu u terminalnu apoptozu (8,9,10).

Da bi razjasnili ovu nepoznanicu, Bata-Csorgo i suradnici su proučili stanice proliferativnog odjeljka zdravog epidermisa i epidermisa psorijatičnih lezija (9). Te su stanice obilježili  $\beta$ -integrin (CD29), K1/K10 i PCNA (od engl. proliferating cell nuclear antigen) biljezima, te analizirali metodom protočne citometrije (9). CD29 molekula je obilježje stanica u diobi, dok se nazočnost K1/K10 keratina na keratinocitima smatra jednim od prvih znakova diferencijacije (9).

Rezultati dobiveni analizom zdravog epidermisa su pokazali da se proliferativni odjeljak sastoji od dvije subpopulacije epidermopoetskih stanica (9,10,11). Jedna subpopulacija je CD29+K1/K10- subpopulacija sporoproliferirajućih, nediferenciranih matičnih stanica smještena pretežno u bazalnom sloju (9,10,11). Druga skupina stanica je CD29+ K1/K10+, te stoga proliferativna i visoko diferencirana, smještena pretežno suprabazalno (9,10,11).

Analizirajući stanice psorijatičnog epidermisa, isti autori su pronašli povišen broj CD29+K1/K10- bazalnih matičnih stanica, dok je broj proliferirajućih CD29+K1/K10+ stanica sličan kod psorijaze i zdravog epidermisa (9,10). Nadalje, obilježavanje stanica anti-PCNA protutijelom je pokazalo, da sve CD29+ K1/K10- stanice promijenjenog psorijatičnog epidermisa, posjeduju visoku razinu PCNA, ukazujući na činjenicu da su potaknute u stanični ciklus (9,10). Na temelju ovih rezultata, Bata-Csorgo i suradnici smatraju da je najvjerojatnije hiperproliferativni poremećaj smješten u CD29+K1/K10- populaciji stanica, koja je u zdravom epidermisu bazalno smještena i mirna u odnosu na stanični ciklus (9,10,12).

Dakle, epidermalna hiperproliferacija kod psorijaze je rezultat povećane skupine stanica nastale iz matične stanice keratinocita, koje onda djeluju kao ciljna populacija za limfokine oslobođene od strane T limfocita (9,10,12).

#### *1.1.5.2. Fenotip limfocita T u psorijatičnim lezijama*

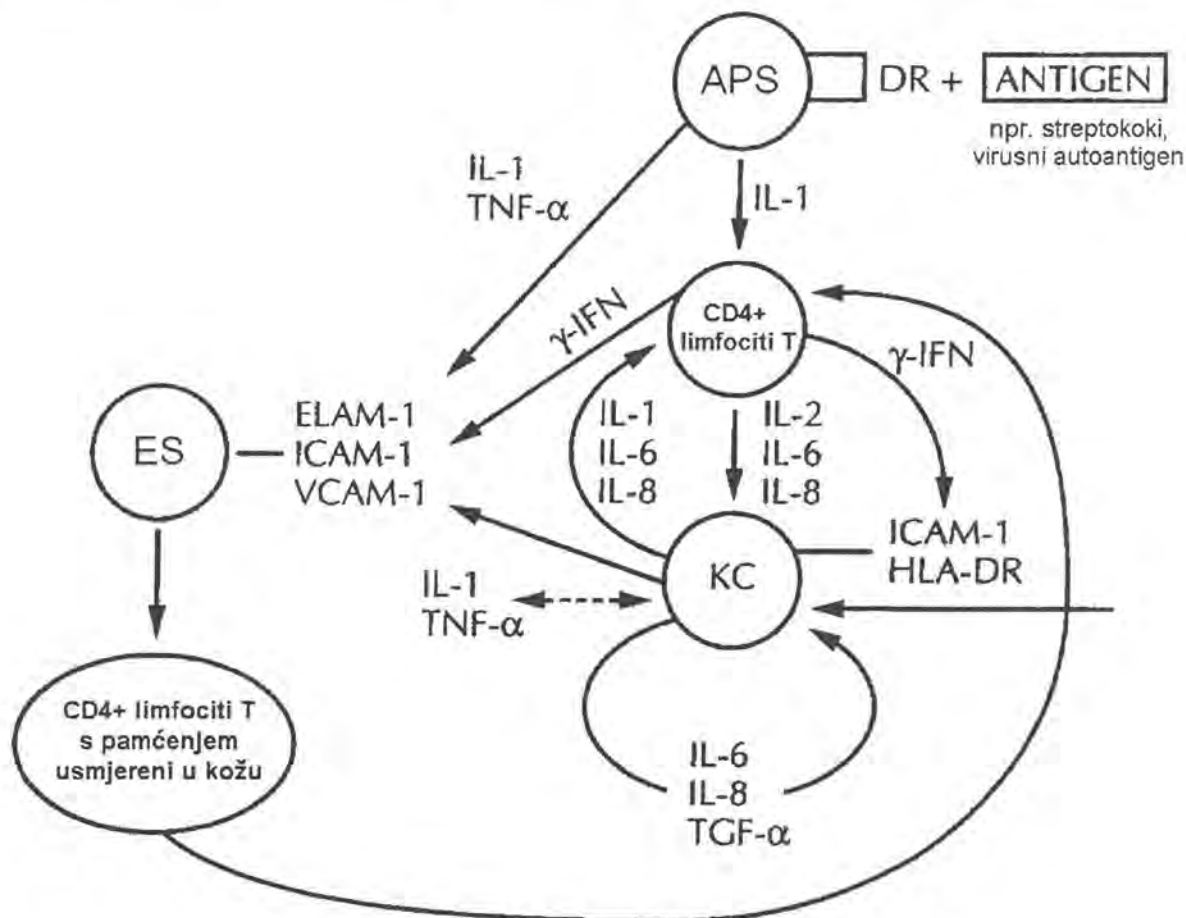
Patohistološka slika psorijatične kože pokazuje i nakupljanje upalnih stanica u epidermisu i dermisu, od kojih većinu čine limfociti T (13). Radi se o limfocitima T s pamćenjem: CD2+, CD3+, CD5+, CLA+, CD28, CD45RO+, od kojih većina ispoljava aktivacijske biljege HLA-DR, CD25 (IL-2R) i CD27 (13,14,15). Oko pitanja nazočnosti CD4 ili CD8 fenotipa u psorijatičnim žarištima dugo vremena nije postignut dogovor. Jedni su autori tvrdili da CD8+ stanice čine većinu limfocita T epidermisa, a CD4+ stanice prevladavaju u dermisu (14,15,16). Drugi su, pak, autori dokazali da nastanak novih kožnih lezija prate epidermalni prodor i aktivacija CD4+ limfocita T, dok su žarišta u remisiji obilježena epidermalnim ulaskom i aktivacijom CD8+ limfocita T (17).

Spornu nepoznanicu razjasnili su Nickoloff i suradnici dokazavši da aktivirani CD4+ limfociti T iz cirkulacije prelaze i nakupljaju se u dermisu (18). Tu se vežu za antigen predočne stanice (APC, od engl. antigen presenting cells) posredstvom CD40L-CD40 molekula (18). Antigen predočne stanice zatim prepoznaju CD8+ limfociti T iz epidermisa (18). Na taj način dermalni CD4+ limfociti T preko antigen predočnih stanica šalju pomagački signal za aktivaciju epidermalnih CD8+ limfocita T, koji onda luče citokine, te ostvaruju svoju ubilačku aktivnost (18). Osim T limfocita u upalnim infiltratima nalaze se i HLA-DR+/CD1a+ Langerhansove dendritičke stanice i HLA-DR+/CD68+ makrofazi (15).



## 1.1.5.3. Citokinski profil limfocita T u psorijatičnim lezijama (slika 1)

Većina autora se jednoglasno slaže da populacija limfocita T nakupljena u psorijatičnim upalnim infiltratima luči citokine tipa 1 (IL-2, IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ ), dok nema znakova za tip 2 citokinsku sekreciju (IL-4, IL-5, IL-10) (19,20). Nepromijenjena koža bolesnika sa psorijazom pokazuje također povišene razine mRNA tih istih citokina (19).



Slika 1. Model imunopatogeneze psorijaze. Predočavanje antigena od strane antigen predodne stanice CD4+ limfocitu T dovodi do lučenja citokina, koji potiču proliferaciju keratinocita i ispoljavanje adhezijskih molekula na endotelnim stanicama i keratinocitima, što onda omogućava daljnje nakupljanje leukocita u leziji.

(kratice: APS-antigen predodne stanice, KC-keratinociti, ES-endotelne stanice)

(prilagođeno prema slici iz: Ortonne JP i sur. Br J Dermatol 1999; 140 (suppl. 54): 1-7)

S druge strane, dvije grupe istraživača, Barna i suradnici (21), te Vollmer i suradnici (22), smatraju da limfociti T kod psorijaze luče IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\beta$  i IL-5 u odsustvu IL-4, te time pokazuju citokinski uzorak drugačiji od Th1 i Th2 tipa stanica nazvan Th3.

#### 1.1.5.4. Obilježja T staničnog receptora

Osim na temelju citokinskog profila, limfociti T se razlikuju i prema prirodni njihovog T staničnog receptora (TCR, od engl. T cell receptor) (23). Većina limfocita T u psorijatičnim infiltratima ispoljava  $\alpha/\beta$  TCR, iako su mjestimično nazočni i  $\gamma/\delta$  TCR+ limfociti T (23). Analizom ispoljavanja varijabilnog genskog segmenta  $\beta$  lanca ( $V_{\beta}$ ) TCR-a u promijenjenoj koži i perifernoj krvi psorijatičara dokazano je da dermalni limfociti T jače ispoljavaju  $V_{\beta}2$  i  $V_{\beta}6$  genske segmente (23,24,25), za razliku od epidermalnih limfocita T, koji pojačano ispoljavaju  $V_{\beta}3$  i/ili  $V_{\beta}13.1$  genske segmente i koji su ujedno i CD8 fenotipa (26). Postoje i pojedini radovi, koji ukazuju na ispoljavanje  $V_{\beta}19$  genskog segmenta u epidermalnih limfocita T, te  $V_{\beta}8$  genskog segmenta u limfocita T zahvaćenog dermisa (27). Ovaj uzorak ispoljavanja određenih  $V_{\beta}$  genskih segmenata mnogo govori o podrijetlu limfocita T u žarištima, o čemu će biti govora kasnije.

Međutim, sve ove studije ukazuju samo na nazočnost različitih subpopulacija limfocita T u upalnim lezijama bolesnika s psorijazom, ali ne i njihovu poticajnu ulogu na keratinocitni rast.

#### 1.1.5.5. Limfociti T kao izvor čimbenika rasta keratinocita

U nastojanju da se pronađe izvor keratinocitnih čimbenika rasta, dokazano je da supernatanti CD4+ T-staničnih klonova, podrijetlom iz psorijatičnih žarišta, sadrže visoke vrijednosti GM-CSF-a i IFN- $\gamma$ , te niske vrijednosti IL-3 i čimbenika nekroze tumora- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (28,29). Ti supernatanti potiču proliferaciju CD29+ K1/K10-PCNA- keratinocitnih matičnih stanica izoliranih samo iz nepromijenjene kože psorijatičara, a ne i iz kože zdravih osoba (29). Međutim, samo anti-IFN- $\gamma$  protutijela su neutralizirala ovaj učinak, te se zbog toga smatra da je IFN- $\gamma$  ključni citokin, koji potiče ulazak psorijatičnih matičnih stanica u aktivni stanični ciklus (29). Također se nameće i

zaključak da su CD29+ K1/K10- matične stanice nepromijenjene kože psorijatičara jače osjetljive na limfocitne čimbenike rasta u odnosu na matične stanice epidermisa zdravih osoba (29).

Wrone-Smith i Nickoloff su razvili pokusni mišiji model presađivanjem nepromijenjene kože psorijatičara i kože zdravih osoba na miševe s teškom kombiniranom imunodeficijencijom (SCID miševi) (30). Intradermalno su tim miševima ubrizgali autologne imunocite izdvojene iz krvi psorijatičara (30). Uočili su da svi presađeni uzorci nepromijenjene kože osoba oboljelih od psorijaze nakon ubrizgavanja autolognih imunocita poprimaju histološka obilježja psorijatičnog plaka što nije slučaj s uzorcima zdrave kože (30). Time su zaključili da je psorijaza uzrokovana isključivo sposobnošću patogenih imunocita periferne krvi da izazovu sekundarnu aktivaciju i nepravilan rast keratinocita i vaskularnog endotela (30).

Dakle, ovi rezultati daju naslutiti da su limfociti T glavni izvor čimbenika rasta keratinocita, te da samo keratinociti psorijatičara odgovaraju rastom na aktivirane limfocite T, ali ne i keratinociti zdravog epidermisa (30).

#### 1.1.5.6. Aktivacija limfocita T

Činjenica da limfociti T psorijatičnih kožnih lezija mogu potaknuti keratinocitni rast lučenjem određenih citokina, otvorila je pitanje čimbenika, koji uzrokuju žarišno nakupljanje i aktivaciju limfocita T. Moguća su dva puta aktivacije: u dodiru s keratinocitima ili s antigen predočnim stanicama (8).

##### 1.1.5.6.1. Dodir s keratinocitima

Molekule glavnog sustava tkivne podudarnosti (od eng. major histocompatibility complex, MHC ili HLA u čovjeka) razreda II su nazočne na monocitima, limfocitima B i dendritičkim stanicama uključujući Langerhansove stanice (31). Međutim, tijekom upale, HLA molekule razreda II mogu biti ispoljene i na drugim stanicama uključujući keratinocite (31). Strange i suradnici (31) su pokazali da HLA razred II+ keratinociti, u nazočnosti stafilokoknog enterotoksina B, mogu aktivirati CD4+ limfocite T. Dakle, hipotetski, CD4+ limfociti T mogu biti aktivirani dodirrom s keratinocitom koji predočava egzogeni antigen ili superantigen (8).



Slično je i sa HLA molekulom razreda I, koja je praktički prisutna na svim stanicama i koja može predočiti endogene peptide nastale iz promijenjenog keratina CD8+ limfocitima T (8).

#### 1.1.5.6.2. Dodir s antigen predočnim stanicama

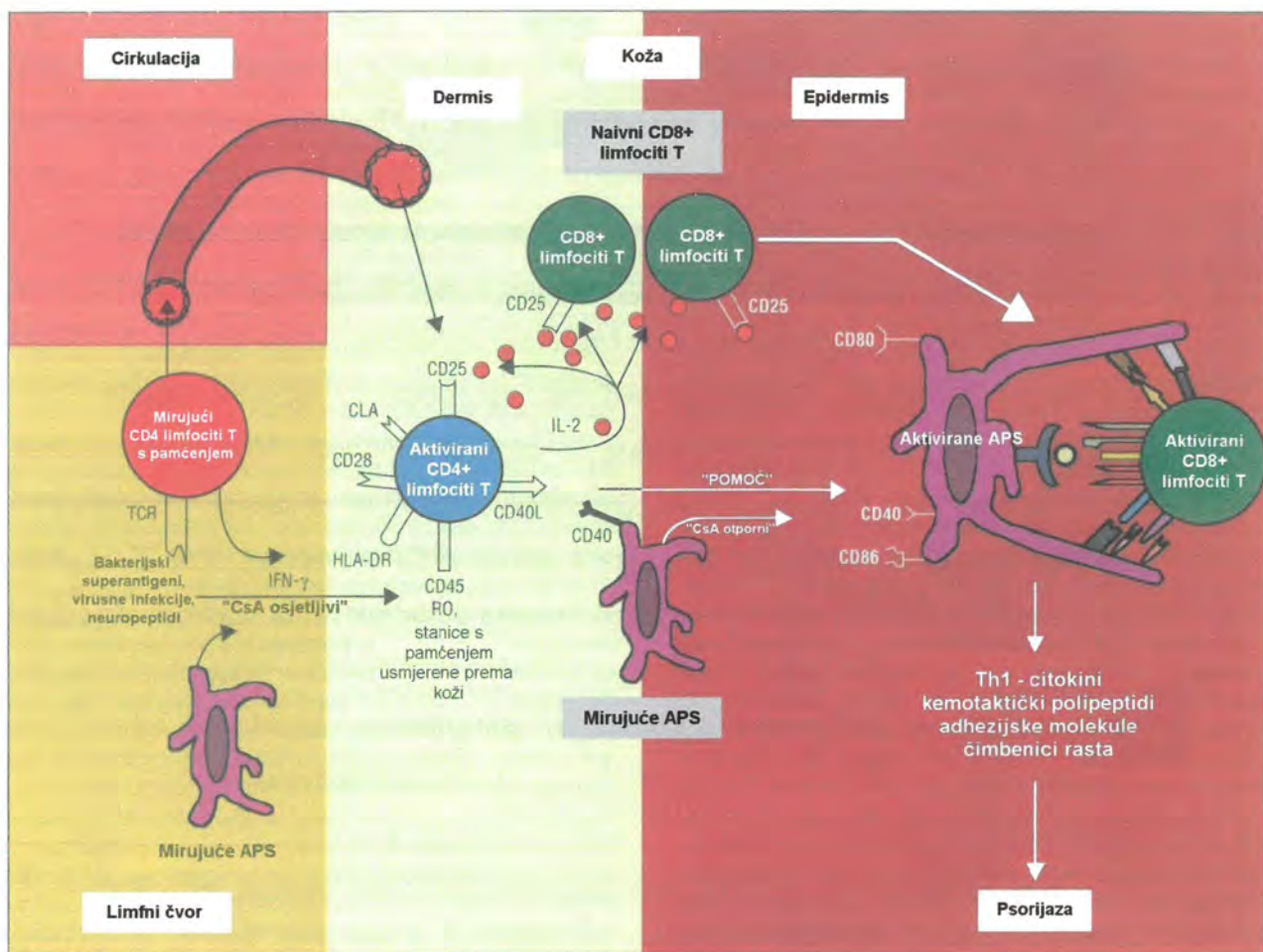
Nasuprot aktivaciji limfocita T putem keratinocita, oni mogu biti aktivirani i dodirom s antigen predočnim stanicama, npr. dendritičkim stanicama prisutnim unutar psorijatičnih kožnih lezija (8). Kao što je prije rečeno da aktivacija limfocita T može ići dodirom keratinocitnih HLA molekula razreda I i II združenih s endogenim ili egzogenim antigenom i T-staničnim receptorom ili preko vezanja sa superantigenom, tako ona može biti rezultat i premoštenja TCR-a sa HLA:antigen kompleksom ispoljenim na površini antigen predočne stanice (8). Ipak, usprkos tome, nazočnost APC-a u psorijatičnim kožnim lezijama ne ukazuje nužno na njihovu funkcionalnu ulogu (8).

#### 1.1.5.7. *Mogući antigeni stimulus*

Mnoga su istraživanja vođena u cilju otkrivanja antigena, koji predočen od strane keratinocita ili antigen predočne stanice aktivira limfocite T, te tako potiče imuni odgovor i posljedičnu pretjeranu proliferaciju keratinocita. Dugo su se vremena sukobljavale dvije znanstvene struje, jedna koja je važnost pridavala  $\beta$ -hemolitičkom streptokoku, te druga koja je podržavala aktivaciju putem vlastitog autoantigena (32).

##### 1.1.5.7.1. Uloga $\beta$ -hemolitičkog streptokoka kao superantigena u aktivaciji limfocita T (slika 2)

Budući da je kod većine bolesnika s kapljičastom psorijazom i kod mnogih bolesnika s egzacerbacijom kronične psorijaze bolesti prethodila streptokokna infekcija, postoje osnovane sumnje da je streptokokni superantigen mogući antigeni poticaj za nastanak ove kronične bolesti (33).



Slika 2. Imunološki model nastanka psorijaze.

Nakon prepoznavanja streptokoknog antigena, cirkulirajući CD4+ limfociti T ulaze u kožu, gdje pomoću lokalnih antigen predočnih stanica aktiviraju CD8+ limfocite T, koji onda luče citokine i čimbenike rasta važne u nastanku psorijatičnog plaka.

(prilagođeno prema slici iz: Nickoloff BJ i sur. Arch Dermatol 1999; 135: 1104-1110)

Lewis i suradnici su uočili povećan broj  $V\beta 2+$  limfocita T u dermisu i epidermisu promijenjene kože psorijatičara (23). Ovi limfociti proliferiraju nakon aktivacije streptokoknim superantigenom (23). Barker i suradnici su također dokazali da limfocitni klonovi izdvojeni iz psorijatičnih lezija proliferiraju nakon *in vitro* stimulacije streptokoknim antigenima grupe A (34).

Dokaze o poliklonskoj ekspanziji  $V\beta 2+$  limfocita T pribavili su i Leung i suradnici (35). Oni su utvrdili da streptokoki izolirani iz ždrijela bolesnika s kapljičastom psorijazom luče toksin SPEC, koji može djelovati kao superantigen i dovesti do proliferacije  $V\beta 2+$  limfocita T (35). Također su uočili i da stimulacija

mononuklearnih stanica periferne krvi psorijatičara stafilokoknim enterotoksinom B i streptokoknim piogenim egzotoksinima A i C dovodi do ispoljavanja kožnog limfocitnog biljega (od engl. cutaneous lymphocyte antigen, CLA) na limfocitima T (36).

Sličan nalaz su dobili Boehncke i suradnici (37). Aktivacija limfocita periferne krvi (LPK) psorijatičnih pacijenata superantigenom stafilokoknog enterotoksina B (SEB) i IL-2 potiče stvaranje psorijatične lezije kod SCID miša (37).

Dakle, moguća pretpostavka bi bila slijedeća. Superantigeni stvoreni streptokoknom infekcijom grla se vežu za predočne stanice u regionalnim limfnim čvorovima što dovodi do aktivacije i proliferacije  $V_{\beta}2+$  limfocita T (33). Nadalje,  $V_{\beta}2+$  limfociti T koji ispoljavaju CLA mogu krvlju otići u kožu i potaknuti izbijanje kapljičaste psorijaze ili egzacerbaciju kronične psorijaze (33,38).

#### 1.1.5.7.2. Uloga autoantigena, tj. klasičnog antigenskog prepoznavanja u aktivaciji limfocita T

Međutim, postoje autori koji osporavaju aktivaciju putem superantigena. Oni smatraju da se radi o klasičnom predočavanju antigena, budući da epidermalni CD8+ limfociti T pokazuju oligoklonalnu  $V_{\beta}$  ekspanziju obilježenu povećanim ispoljavanjem mRNA za  $V_{\beta}3$  i/ili  $V_{\beta}13.1$  antigenske regije (26,39,40). Takva  $V_{\beta}$  ekspanzija bila bi povezana s klasičnim predočavanjem antigena, a ne predočavanjem superantigena (26,39,40).

#### 1.1.5.7.3. Superantigenom aktivirani limfociti T kao začetnici patoloških događaja i klasičnim autoantigenom aktivirani limfociti T kao čuvari patologije u lezijama

Dokazana je sličnost u sekvencama između streptokoknog M6 proteina i epidermalnog K14 keratina (41), kao i nazočnost autoprotutijela u perifernoj krvi psorijatičara koja unakrsno reagiraju sa M proteinima i keratinom psorijatične kože (42). Valdimarsson i suradnici (33) smatraju da osobe s genetskom predispozicijom za psorijazu posjeduju posebne alelske oblike ili mutaciju jednog ili više keratinskih gena. Takav promijenjeni keratin je homologan sa streptokoknim M proteinom (33). Dakle, tijekom streptokokne infekcije aktiviraju se limfociti T specifični za streptokokni M



protein (33). Oni su zatim povučeni u kožu, zbog sličnosti M proteina s keratinom, gdje se dalje umnožavaju i tako održavaju kroničnu psorijatičnu upalu (33). Na ovaj način, specifični autoreaktivni limfociti T u lezijama pokazuju većinom uzorak varijabilnog lanca limfocita T karakterističan za određeni superantigen (33).

Sumnje o postojanju autoreaktivnih limfocita T potvrdili su i Gilhar i suradnici (43). Oni su presadili komadić psorijatičnog plaka na SCID miša (43). Deset tjedana od presađivanja psorijatični kožni transplantati su izgubili većinu psorijatičnih obilježja, koja su se vratila nakon ubrizgavanja limfocita T izoliranih iz kožnih lezija psorijatičara (43). Time su Gilhar i suradnici dokazali sposobnost limfocita T iz psorijatičnih kožnih lezija da održavaju psorijazu (43).

S druge strane, sposobnost limfocita periferne krvi psorijatičara da izazovu stvaranje psorijatičnog plaka su dokazali Nickoloff i Wrono-Smith (43). Oni su ubrizgali autologne limfocite T periferne krvi psorijatičara u dermis nepromijenjene kože psorijatičara presađene na SCID miša, te primijetili da dolazi do prijelaza do tada fenotipski zdrave kože u psorijatično primijenjenu (44). Svi ovi rezultati daju naslutiti postojanje autoreaktivnih T limfocita, tj. da je psorijaza uzrokovana T limfocitima usmjerenim protiv autoantigena, koji je prisutan u psorijatičnim kožnim lezijama (43). Konačno, Nickoloff i Wrono-Smith smatraju da su oba tipa limfocita T, superantigenom aktivirani limfociti T kao začetnici patoloških događaja i autoreaktivni limfociti T kao čuvari patologije u lezijama, uključeni u patogenezu ove imunološki posredovane bolesti (44). Oni predlažu moguću pretpostavku da superantigeni predočeni od strane HLA razred II+ antigen predočnih stanica u limfnim čvorovima, potiču poliklonsku aktivaciju populacije pomagačkih limfocita T, koji posjeduje određeni  $V_{\beta}$  lanac (44,45). Ovi  $CD4^{+}$  limfociti T s pamćenjem prelaze iz limfnih čvorova u cirkulaciju (44,45). Unutar ove cirkulirajuće skupine izdvaja se populacija autoreaktivnih limfocita T, koja nosi kožni biljeg limfocita CLA (od engl. cutaneous lymphocyte antigen), te tako ulazi u kožu (44,45). Ovdje prepoznaje autoantigen i započinje kaskadu staničnih i molekulskih promjena, koje dovode do stvaranja psorijatičnog plaka (keratinocitna hiperplazija, ubrzana diferencijacija i angiogena tkivna reakcija) (44,45). Snažna keratinocitna aktivacija i hiperplazija dovode do stvaranja novih antigenih epitopa i na taj način održavanje kronične psorijatične upale (44).

#### 1.1.5.7.4. Uloga ostalih čimbenika u aktivaciji limfocita T

Međutim, sve ove tvrdnje ne isključuju mogućnost da bolest ima neki drugi vanjski poticaj osim  $\beta$ -hemolitičkih streptokoka (32). Postoje bolesnici sa lokaliziranim psorijatičnim plakovima, koji nikada ne razviju diseminirani oblik psorijaze (32). Takvi bi kronični psorijatični plakovi mogli biti započeti retrovirusima, a održavani limfocitima T, koji prepoznaju i unakrsno reagiraju sa sličnim determinantama u psorijatičnoj koži (46). Slično je i sa *Staphylococcus aureusom* ili *Candidom albicans*, čija lokalna kožna infekcija može pogoršati psorijazu (46). Odgovornim za to se smatraju superantigeni *Staphylococcus aureusa* ili *Candide albicans*, otpušteni lokalno iz ovih mikroorganizama (46).

#### 1.1.5.8. Uloga citokina u patogenezi psorijaze (u nastanku i održavanju psorijatičnog plaka)

Osim limfocita T, koji pojačano luče citokine Th1 tipa (IL-2, IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ ), postoje i druge stanice u psorijatičnim žarištima, koje lučenjem svojih čimbenika dovode do nastanka i održavanja psorijatičnog plaka (19,20,21).

Koristeći se monoklonskim protutijelima protiv čimbenika tumorskog rasta- $\alpha$  (od engl. tumor growth factor-TGF), Gottlieb i suradnici su dokazali da keratinociti psorijatičnog epidermisa luče veće količine TGF- $\alpha$  u odnosu na zdrave keratinocite (47). Dakle, unatoč tome što je TGF- $\alpha$  važan autokrini i parakrini čimbenik normalnog epidermalnog rasta, on je nedvojbeno uključen i u patološku epidermalnu proliferaciju kod psorijaze (48). Također je utvrđena i pojačana ekspresija njegovog liganda, receptora za epidermalni čimbenik rasta (EGF, od engl. epidermal growth factor) na površini psorijatično promijenjenih keratinocita, što dodatno doprinosi rasvijetljavanju uloge ovih citokina u patološkom keratinocitnom rastu (48,49).

Važnu ulogu u proliferaciji keratinocita imaju i citokini IL-1 i IL-6, te nešto manje IL-3 i GM-CSF (48). Dokazano je povećano ispoljavanje mRNA za IL-6 u perifernoj krvi bolesnika sa psorijazom te u keratinocitima aktivnih psorijatičnih plakova (48,50). IL-6 potiče rast stanica u kulturi ljudskih keratinocita, što su dokazali Krueger i suradnici i time ukazali na moguću ulogu IL-6 u psorijatičnim lezijama (51).

Nadalje je dokazano i povećano ispoljavanje IL-1 receptora na keratinocitima djelovanjem IFN- $\gamma$  (52). IL-1 $\beta$  mRNA je također pojačano ispoljena u psorijatičnom epidermisu (52). IL-1 potiče ispoljavanje adhezijskih molekula na limfocitima kao što je ICAM-1 (od engl. intracellular cell adhesion molecule), te tako olakšava migraciju leukocita u psorijatično žarište (52).

Smatra se da i IFN- $\gamma$ , koji *in vitro* posjeduje inhibitorno djelovanje kako na rast drugih stanica, tako i na rast keratinocita, igra važnu ulogu u patogenezi psorijaze (48,53). Nickoloff i suradnici su pokazali da je antiproliferativni učinak IFN- $\gamma$  na keratinocite psorijatičnog plaka manji u odnosu na učinak ovog citokina na keratinocite nepromijenjene kože psorijatičara, te keratinocite zdrave kože (53,54). Fierlbeck i suradnici su uspjeli intradermalnim ubrizgavanjem IFN- $\gamma$  izazvati nastanak psorijatičnih kožnih lezija na nepromijenjenoj koži oboljelih od psorijaze (55). Razlog tome je vjerovatno sposobnost IFN- $\gamma$  da potakne ispoljavanje HLA-DR i ICAM-1 molekula na površini psorijatičnih keratinocita kao i ICAM-1 molekule na endotelnim stanicama i time omogući nakupljanje leukocita u epidermisu (56,57,58,59,60).

Budući da citokini pokazuju snažne plejotropne aktivnosti unutar mikrookoliša upaljenog tkiva, teško je odrediti ulogu pojedinih citokina *in vivo*, tj. objasniti patogenetske događaje prouzročene pojedinim citokinima (61).

#### 1.1.5.9. Uloga adhezijskih molekula u nakupljanju limfocita u lezijama

Adhezija stanica kao i kretanje prema izvorima kemotaksije postali su jedan od glavnih predmeta istraživanja tijekom zadnjih godina (16). Tako se nastoji rasvijetliti ispoljavanje adhezijskih receptorskih molekula na upalnim i endotelnim stanicama psorijatičnog žarišta (16).

De Boer i suradnici su dokazali povećanu ekspresiju ICAM-1 i E-selektina na endotelnim stanicama, ICAM-1 na T limfocitima, te ICAM-1 i LFA-1 molekula na Langerhansovim stanicama promijenjene i nepromijenjene kože psorijatičara (62). S druge strane, promijenjena koža psorijatičara pokazuje i slabu ekspresiju VCAM-1 molekule na endotelnim stanicama (62). E-selektin ili ELAM-1 je poznat kao površinska molekula uključena u priljublivanje polimorfonuklearnih leukocita, monocita i populacije T limfocita s pamćenjem (16). Njegova ekspresija se povećava pod utjecajem IL-1 ili TNF- $\alpha$  (16). Također je povećan i broj T limfocita, koji na svojoj površini ispoljavaju CLA antigen. Ovo je populacija "skin-homing" limfocita s

pamćenjem, koja se većinom veže za E-selektin što bi ukazivalo na tkivno-selektivno priljubljanje CLA+ T limfocita u upaljenoj psorijatičnoj koži (63).

## 1.2. Lihen planus

Lihen planus je nezarazna, subakutna ili kronična, upalna, papulozna kožna bolest, praćena svrbežom i vrlo često osim kože zahvaća i sluznicu, a ponekad i samo sluznicu usne šupljine (64).

Lihen planus se javlja u manje od 1% ljudske populacije (65). Iako se može javiti u bilo kojoj životnoj dobi, bolest je rijetka u djece mlađe od 5 godina, te u starijih (65,66). U dvije trećine slučajeva javlja se u dobi između 30-te i 60-te godine, u muškaraca nešto ranije nego u žena (65).

### 1.2.1. Nasljeđivanje

Iako nije dokazano genetsko nasljeđivanje bolesti, zabilježeni su slučajevi lihen planusa u pojedinim obiteljima (64). Činjenica da oko 10% bolesnika ima pozitivnu obiteljsku anamnezu podržava pretpostavku da su čimbenici nasljeđa važni u nastanku bolesti (66).

Stoga se lihen planus dijeli na obiteljski i neobiteljski tip (65). Premda jedan dio genetičara govori o HLA-B7 kao najčešće ispoljenom genskom lokusu u obiteljima s lihen planusom, drugi nalazi upućuju na povezanost obiteljskog lihen planusa s HLA-Aw19, B18 i Cw6 genima (65). Neobiteljski lihen planus je obilježen povećanom učestalošću HLA-A3, A5, A28, B8, B16 i Bw35 genskih lokusa (65). Ispoljavanje HLA-B8 gena češće nalazimo u bolesnika sa oralnim lihen planusom kao jedinom promjenom, dok je HLA-Bw35 gen vezan za kožni lihen planus (65). Od HLA gena razreda II, HLA-DR1, DR9 i DQ1 su najučestaliji (65).

### 1.2.2. Etiologija

Iako etiologija lihen planusa još nije u potpunosti razjašnjena, postoji nekoliko čimbenika, čija se uloga trenutačno razmatra (65). Vrlo je vjerojatno da čimbenici okoliša, kao što su infekcije, te neki lijekovi mogu potaknuti nastanak bolesti u genetski predisponiranih osoba (64). Upravo se stoga lihen planus dijeli na tri oblika: idiopatski



(klasični) oblik, medikamentozni oblik i oblik izazvan drugim bolestima uključujući infekcije (65).

Uloga infekcije u nastanku lihen planusa posljednjih godina sve više raste (65). Dokazana je povezanost bolesti sa sifilisom, infekcijama uzrokovanim herpes simplex virusom tip 2 i HIV-om, te amebijazom i kroničnom infekcijom mokraćnog mjehura (65). U zadnje vrijeme postoje dokazi i o povezanosti virusnog hepatitisa C sa lihen planusom (65). Na osnovu nazočnosti svrbeža, te pojave lihen planusa zajedno sa siringomijelijom, perifernim neuritisom i bulbarnom paralizom postoji mogućnost da i neurološki čimbenici imaju određenu ulogu (64).

Bolest može biti izazvana i lijekovima, pogotovo antimalaricima, solima zlata, izonijazidom ili spojevima arsena (64). Također se razmatra i mogućnost psihogenog uzroka bolesti, jer se prema anamnestičkim podacima lihen planus javlja često nakon ozbiljne psihičke traume (smrt u obitelji, nesreće, te druge stresne situacije) (64). Na temelju histoloških i imunopatoloških nalaza, lihen planus se objašnjava i kao autoimuni fenomen, jer se javlja zajedno sa bilijarnom cirozom, morfeom, eritematoznim lupusom i GvH reakcijom (od engl. graft versus host, tj. reakcija presađka protiv primaoca) (64).

### ***1.2.3. Klinički oblici lihen planusa***

Lihen planus započinje ružičastom makulom na pregibnoj strani zapešća, koja kroz nekoliko tjedana prelazi u purpurnu papulu, veličine 1-3 mm (65). Dakle, osnovna kožna promjena lihen planusa je lagano ružičasta do ljubičasta poligonalna papula, ravnog krova, voštanog sjaja, koja katkada pokazuje središnje udubljenje (65,67). Na površini papule se nalaze tanke, transparentne i adherentne ljuske, te nježne, bjeličaste točke ili mreže nazvane Wickhamove strije (65). Papule se mogu međusobno spajati čineći veća žarišta raznih oblika (67). U stadiju regresije boja papula se mijenja, te one od purpurnih postaju smeđe pigmentirane (67). Lihen planus je obično obilježen jakim svrbežom, iako postoje bolesnici koji se na taj simptom ne žale (65). Stupanj svrbeža je obično povezan s opsegom zahvaćenosti kože i sluznica, te je stoga snažniji u generaliziranim slučajevima (65).

Bolest se s obzirom na morfološku sliku i smještaj lezija dijeli na dva klinička oblika: egzantematski lihen planus i lihen planus mukoznih membrana (65). Međutim, kao posljedica specifične lokalizacije lihenskih lezija, njihovog trajanja i daljnjeg



razvoja, mogu nastati posebni oblici lihen planusa, kao što su: folikularni lihen planus, hipertrofični lihen planus, atrofični i nodularni lihen planus, bulozni lihen planus, erozivni i ulcerativni lihen planus, te aktinični lihen planus (64).

#### *1.2.3.1. Egzantematski lihen planus*

Egzantematski oblik lihen planusa (*lichen planus exanthematicus*) je obilježen subakutnim nastajanjem pojedinačnih, diseminiranih papula, koje se kasnije mogu spajati čineći velike, lihenificirane plakove (64,66). Izbijanje promjena može biti praćeno povišenom tjelesnom temperaturom (66). Promjene su smještene simetrično, sa predilekcijskim mjestima u pregibnim stranama zapešća, podlakticama, na lateralnim stranama vrata, bedrima, sakrumu, anogenitalnoj regiji, penisu i nožnom zglobu (64). Nakon povlačenja kožnih promjena, koje nastaje za otprilike osam mjeseci, može ostati tamnosmeđa, postinflamatorna pigmentacija (66). Generalizaciju egzantema mogu uzrokovati neki lijekovi, a u teškim slučajevima bolest može završiti sekundarnom eritrodermijom (64).

#### *1.2.3.2. Lihen planus mukoznih membrana*

Promjene mukoznih membrana kao što su sluznica usne šupljine, vagine, uretre, anusa, jednjaka, nosa i dušnika, te konjunktiva javljaju se u 25-70% bolesnika sa kožnim lihen planusom, iako postoje i izolirani slučajevi lihen planusa usne šupljine, te genitalne i analne regije (64,65).

Oralni lihen planus je obilježen izostankom tipičnih poligonalnih, purpurnih papula (64,66). Javljaju se samo Wickhamove strije u obliku linearnih, retikularnih ili razgranatih bjeličastih pruga na sluznici usne šupljine (64). Promjene na jeziku su obično poput plakova ili prugastih žarišta, koja teže atrofiji, tj. gubitku papila jezika (64).

Genitalni smještaj na muškom spolnom organu nalazi se u 20% oboljelih od lihen planusa (64). Najčešće je zahvaćen glans penisa sa malim, cirkumskriptnim tipičnim papulama (64). U većini slučajeva promjene regrediraju u središtu i postaju anularne perifernim napredovanjem (*lichen planus anularis*) (64). Slične promjene povremeno nastaju i na skrotumu (64). Promjene ženskog spolnog organa uključuju

žarišta leukoplakije i eritroplakije, nekad s erozijama i povremeno žarišta deskvamativnog vaginitisa (65).

Perianalna lokalizacija lihen planusa nije rijetka, a obilježena je razgranatim, bjeličastim prugama poput onih na oralnoj sluznici (64). Često je prisutan i analni svrbež (64).

#### 1.2.3.3. Nokti

Promjene noktiju nalaze se rijetko i to obično u starijih osoba (64,66). Obilježene su longitudinalnim prugama i utorima, te onihodistrofijom i subungualnom keratozom (64,66). U malog broja bolesnika može doći i do destrukcije nokatne ploče s gubitkom čitavog nokta (64,66).

#### 1.2.3.4. Folikularni lihen planus

Folikularni lihen planus, poznat još i kao *lichen planopilaris*, *planus follicularis*, *peripilaris* ili *acuminatus*, može nastati sam ili udružen sa drugim oblicima kožnog ili sluzničnog lihen planusa (64,65,66). Obilježen je izoliranim ili grupiranim, mekanim, crvenim, hiperkeratotičnim, papularnim promjenama, veličine glavice pribadače, smještenim u sebacealnim folikulima (64,66). Predilekcijska mjesta su pregibne strane zglobova, gornji dio trupa, vrat i medijalna strana bedara, te sakralna regija (64).

Folikularni lihen planus može zahvatiti i vlasište s posljedičnim razvojem ožiljkaste alopecije, tj. pseudopelada što se još naziva i *lichen planus follicularis decalvans* (64,66). Kombinacija simptoma folikularnog lihen planusa na trupu i vlasištu sa distrofijom noktiju opisuje se kao *Lassueur-Graham-Little sindrom* (64).

#### 1.2.3.5. Hipertrofični lihen planus

Ovaj oblik lihen planusa najčešće zahvaća pregibne strane skočnih zglobova i zglobove prstiju (64). Lezije su diseminirani, mnogobrojni, čvrsti papulonodusi ili plakovi do veličine dlana, debele, bradavičaste, hiperkeratotične, smeđe-crvene ili purpurno-crvene površine, te od tuda naziv i *lichen planus verrucosus* (64,65). Svrbež može biti intenzivan (64). Kod ovih bolesnika je često prisutna i kronična venska insuficijencija (64). Lezije perzistiraju mjesecima ili godinama, u prosjeku oko 8 godina

(66). Nakon što se povuku na tim mjestima obično ostaju tamnosmeđe pigmentacije ili rjeđe hipopigmentacije i ožiljci (65,66).

#### 1.2.3.6. *Atrofični i nodularni lihen planus*

Osnovno obilježje atrofičnog lihen planusa je pojava samo nekoliko lezija najčešće smještenih na trupu i donjim ekstremitetima (64,65). Lezije se sastoje od oštro ograničenih, bjeličastih ili plavkastih papula s centralnom atrofijom veličine oko 2-5 mm u promjeru (64,65). Postoji mogućnost spajanja lezija što dovodi do nastanka oštro ograničenih, bjeličastih, atrofičnih plakova (64). Nodularni lihen planus je obilježen diseminiranim nodusima keratotične ili zadebljale površine, koji se vidi kod manjeg broja oboljelih od lihen planusa (64).

#### 1.2.3.7. *Bulozni lihen planus*

Lezije ovog oblika lihen planusa su vezikule i bule (od tuda i naziv *lichen planus pemphigoides*), smještene pretežno na ekstremitetima, histološki nastale većinom iz lihenskih papula, a rjeđe na nepromjenjenoj koži likvefakcijom stanica bazalnog sloja (64,65). Bulozne promjene se mogu naći i na sluznici usne šupljine, gdje vode nastanku bolnih erozija (64). Ovaj oblik lihen planusa je primijećen u kombinaciji sa tumorima unutarnjih organa (64).

#### 1.2.3.8. *Erozivni i ulcerativni lihen planus*

Erozivni i ulcerativni lihen planus je rijetki oblik lihen planusa, obilježen kroničnim buloznim eflorescencijama, koje prelaze u erozije i ulceracije, smještene između prstiju i na tabanima (64,65). Lezije nemaju tendenciju zacjeljivanja i vrlo su bolne (64). Ovaj je oblik lihen planusa često praćen tipičnim kožnim promjenama, promjenama noktiju i mukoznih površina, što olakšava postavljanje dijagnoze (64,65). Česti su i trajan gubitak noktiju stopala, te cikatricijalna alopecija vlasišta (65). Budući da se karcinom skvamoznih stanica može razviti u lezijama ulcerativnog lihen planusa, trajne ulceracije, koje ne zaraštavaju su sumnjive na malignu alteraciju, te je stoga opravdana biopsija (65). Ako konzervativna terapija kod ovog oblika lihen planusa ne daje rezultate, treba razmotriti mogućnost kirurške ekscizije i transplantacije kože (65).

### 1.2.3.9. *Aktinični lihen planus*

Ovaj je oblik lihen planusa poznat još i kao *lichen planus subtropicus*, *lichen planus tropicus*, *summertime actinic lichenoid eruption*, *lichen planus actinicus*, *lichen planus atrophicus annularis* i *lichenoid melanodermatosis* (65). Javlja se u suptropskim i tropskim zemljama u proljeće i ljeto kao posljedica djelovanja sunčevog zračenja (64,65). Predilekcijska mjesta su dijelovi tijela izloženi svjetlu kao npr. lice, dorzalne strane šaka i podlaktice, te vrat (65). Bolest je obilježena izbijanjem hiperpigmentiranih, tj. ljubičasto-smeđih, oštro ograničenih anularnih papula, koje teže spontanom cijeljenju (64,65). Svrbež i ljuskanje su rijetki (65).

### 1.2.3.10. *Lihen planus dlanova i tabana*

Lihen planus dlanova i tabana se obično javlja kao samostalna pojava, bez popratnih obilježja lihen planusa drugih dijelova tijela, te tada predstavlja znatnu dijagnostičku poteškoću (64,66). Obilježen je papulokeratotičnim ili papulonodularnim žarištima, voštane površine, pretežno smještenim na vrhovima prstiju i dlanovima, okruženim upalnim haloom (64,65,66).

### 1.2.4. *Patohistološke promjene kod lihen planusa*

Osnovne patohistološke značajke lihen planusa su epidermalne promjene, te vrpčasti upalni infiltrat smješten u dermisu, uz epidermo-dermalnu granicu (64). Epidermalne promjene se sastoje od akantozе u obliku zubaca pile, koja je uz hiperkeratozu naročito naglašena kod hipertrofičnog oblika lihen planusa, te laganog zadebljanja epidermisa (64,67). Stratum korneum je ortokeratotičan, sa pojedinim izdvojenim otočićima parakeratoze (64). Postoji i mjestimična hipergranuloza, što se klinički manifestira Wickhamovim strijama (64,67). Stanice bazalnog sloja pokazuju hidropsku degeneraciju, što objašnjava pojavu mjehura kod posebnih oblika lihen planusa (64). Melanin otpušten iz oštećenih bazalnih stanica biva fagocitiran makrofazima i uvučen u papilarni dermis (64). Hijalina koloidna tjelešca (Civatte bodies), koja predstavljaju multiple apoptotične stanice, smještena su u epidermisu, blizu bazalnog sloja (64).

Neposredno ispod epidermisa nalazi se vrpčasti, oštro ograničeni limfohistiocitni infiltrat (64). Dermalne papile nisu izdužene, već proširene i kupolastog oblika (64).

### *1.2.5. Imunopatogeneza lihen planusa*

Na osnovu dugogodišnjeg proučavanja patogeneze lihen planusa, danas se zna da imunološki mehanizmi nepobitno posreduju nastanku ove kožne bolesti (65). Iako je uloga imunoglobulinskih molekula u razmatranju, do sada nisu dokazane veće promjene imunoglobulinskih frakcija, te se smatra da je humoralni imunitet samo sekundarni odgovor u imunopatogenezi lihen planusa (65).

S druge strane, na temelju limfocitnog nakupljanja i lihenoidne reakcije, smatra se da imunitet posredovan stanicama igra glavnu ulogu u patogenezi lihen planusa (65). Limfociti T se aktiviraju dodirrom s antigen predočnim stanicama, kao što su Langerhansove stanice i keratinociti, te kostimulirajućim molekulama (65). Još uvijek nepoznati poremećaj, kao što je prepoznavanje promijenjenog "vlastitog" ili "stranog" antigena putem ovih stanica započinje imunološku reakciju (65).

#### *1.2.5.1. Fenotip limfocita T u žarištima lihen planusa, te perifernoj krvi oboljelih*

U žarištima lihen planusa nalazimo nakupine aktiviranih limfocita T, te povećano ispoljavanje citokina i adhezijskih molekula (68,69). U nastojanju da razjasne porijeklo T limfocitnog infiltrata, Bhan i suradnici su dokazali da većina upalnih stanica u kožnim lezijama lihen planusa pripada pomagačkoj staničnoj populaciji, a manje citotoksično/supresorskoj staničnoj populaciji (70).

Nešto kasnije, Buechner je došao do spoznaje da je određeni broj citotoksično/supresorskih stanica prisutan u bazalnom sloju ranih lezija, dok pomagačke stanice prevladavaju kod bolesnika sa starijim lezijama lihen planusa (71). Buechner je također primijetio nakupljanje citotoksično/supresorske populacije stanica u papilarnom dermisu i unutar epidermisa na mjestu hidropske degeneracije bazalnog sloja (71).

S druge strane Takauchi i suradnici (72), te Robertson i suradnici (73) su dokazali da u većini bioptata promijenjene bukalne sluznice oboljelih od lihen planusa prevladava citotoksično/supresorska subpopulacija, što bi dakle govorilo u prilog



činjenici da ova skupina stanica ima vodeću ulogu izvršnih stanica u citotoksičnosti usmjerenoj prema keratinocitima.

Također je utvrđeno da značajno smanjenje broja pomagačke, a porast broja citotoksične subpopulacije limfocita T u kožnim lezijama lihen planusa nastaje s dužim trajanjem bolesti (74).

Slično se kretanje limfocitnih subpopulacija nalazi i u perifernoj krvi. Yamamoto i suradnici (75) su pokazali da limfociti periferne krvi oboljelih od oralnog lihen planusa pojačano ispoljavaju CD8 i CD11b biljege karakteristične za citotoksičnu subpopulaciju T limfocita, te aktivacijske CD3 i HLA-DR biljege u usporedbi sa limfocitima T periferne krvi zdravih pojedinaca (75).

Do istog zaključka došli su Shimizu i suradnici (76), koji su izučavali ulogu grenzima B i perforina (od engl. pore forming protein, proteina koji stvara pore) u epidermalnom oštećenju kod lihen planusa (76). Oni su imunohistokemijskim tehnikama pokazali da CD8+ stanice u kožnim infiltratima lihen planusa posjeduju grenzim B (76). Imunoelektronskom mikroskopijom postaje jasno da molekule grenzima B luče limfociti u smjeru keratinocita, koji tada doživljavaju programiranu staničnu smrt, tj. apoptozu (76).

Na ovim nalazima se temelji pretpostavka da imunološka reakcija posredovana CD8+, tj. citotoksičnim limfocitima T (CTL) usmjerenim protiv aktiviranih keratinocita, koji ispoljavaju HLA molekulu razreda I, dovodi do destrukcije epidermalnih stanica i nastanka kliničke slike lihen planusa (65).

#### *1.2.5.2. Obilježja T staničnog receptora*

Većina autora se slaže da limfociti T izolirani iz lezija lihen planusa posjeduju  $\alpha/\beta$  T-stanični receptor (77,78). Ti limfociti ujedno ispoljavaju i CD8 molekulu, te CD45RO molekulu, koja je obilježje stanica s pamćenjem (77,78). Samo mali broj limfocita T ispoljava CD4 molekulu (78). Manji broj limfocita T izoliranih iz lezija posjeduje  $\gamma/\delta$  T stanični receptor i oni su CD4-CD8- (79,80,81).



### 1.2.5.3. Citokinski profil limfocita T u perifernoj krvi i u lezijama lihen planusa

Karagouni i suradnici su uočili smanjene serumske vrijednosti TNF- $\alpha$ , IL-2, IFN- $\gamma$  i IL-6, te povećanu sekreciju IL-1 $\beta$  i limfotoksina (LT) u oboljelih od oralnog lihen planusa nakon stimulacije fitohemaglutininom A (82). Nasuprot tome, supernatanti nestimuliranih kultura kao i serumi oboljelih sadrže povišene koncentracije TNF- $\alpha$  i IL-6 (82).

Druga skupina autora, predvođena Yamamotom je pokazala da limfociti T izolirani iz bioptata oralnog lihen planusa luče veće količine IL-6, GM-CSF-a i TNF- $\alpha$ , dok limfociti periferne krvi prethodno stimulirani IL-2 stvaraju veće količine GM-CSF, te manje količine IFN- $\gamma$  i IL-1 $\beta$  u usporedbi s limfocitima periferne krvi zdrave populacije (83). Nadalje, Yamamoto i suradnici (84) su dokazali i povišene serumske vrijednosti IL-6 i TNF- $\alpha$  (84). Nalazi citokinskog profila periferne krvi i kožnih žarišta oboljelih od lihen planusa govore u prilog kronične upalne prirode ove kožne bolesti (84).

### 1.2.5.4. Keratinociti kao izvor citokina i čimbenika rasta

Keratinociti smješteni u kožnim i sluzničnim lezijama lihen planusa mogu se ponašati kao imunociti sa sposobnošću predočavanja antigena limfocitima T, te lučenja upalnih citokina (68,86).

Yamamoto i suradnici su *in vitro* istraživanjima pokazali da keratinociti izdvojeni iz lezija oralnog lihen planusa pojačano stvaraju IL-6, TNF- $\alpha$  i GM-CSF u usporedbi s keratinocitima oralne gingive zdrave populacije (83). Dakle, pretpostavlja se da stvarajući velike količine citokina aktiviraju limfocite T u lezijama, dovode do migracije i infiltracije monocita i makrofaga u lezije, kao i proliferacije limfocita B, te potiču druge oblike upalnog odgovora (83). Oni također povećavaju ispoljavanje specifičnih keratinskih gena, te površinskih adhezijskih molekula i integrina, koji se vežu za receptor limfocita T i ostale specifične receptore adhezijskih i integrinskih molekula (86).

#### 1.2.5.5. *Prisustvo dendritičnih stanica u lezijama lihen planusa*

Bhan i suradnici, te Tosca i suradnici su dokazali da Langerhansove stanice i njihovi prekursori, koji ispoljavaju T6 antigen na svojoj površini postoje u povećanom broju u epidermisu i dermisu promijenjene kože oboljelih od lihen planusa (70,87).

Do istog zaključka došli su Regezi i suradnici koristeći se monoklonskim protutijelima na HLA-DR antigen i S-100 protein, biljege Langerhansovih stanica (88). Njihovo istraživanje je potvrdilo povišen broj ovih stanica u lezijama oralnog lihen planusa (88).

Pitigala-Arachchi i suradnici, te Rich i suradnici su, koristeći se indirektnom peroksidaza tehnikom i monoklonskim protutijelima na ljudski CD1 timocit (OKT 6) i HLA-DR antigen, dokazali veću zastupljenost T6 i DR+ epidermo-dermalnih keratinocita u biopatima promijenjene bukalne sluznice lihen planusa nego u uzorcima bukalne sluznice zdrave populacije (89,90).

Rezultati nakupljanja Langerhansovih stanica u većem broju u lezijama lihen planusa, obično smještenih u grupama od nekoliko stanica u blizini bazalnog staničnog sloja, govore u prilog snažnoj uključenosti ovih stanica u predočavanje antigena infiltrirajućim T limfocitima (91).

### 1.3. Molekularni mehanizmi stanične citotoksičnosti

Stanična citotoksičnost je neizostavni dio obrane od virusnog i unutarstaničnog bakterijskog napada, antitumorskog odgovora, odbacivanja transplantata i autoimunih bolesti. Zato je važno razumijeti točan mehanizam putem kojeg citotoksični T limfociti (CTL), NK stanice i limfokinima aktivirane stanice ubojice (LAK) uništavaju ciljne stanice (92-95). Najsvježiji nalazi ukazuju na postojanje dva puta s brzim citolitičkim učinkom, a posredovani su: jedan perforinom, te drugi sustavom Fas ligand-Fas molekulama (92,94). Treći mehanizam je relativno spor litički proces posredovan molekulama TNF- $\alpha$ , koji djeluje tek nakon duže inkubacije s ciljnim stanicama (18 sati i dulje) (92,94,96).

### 1.3.1. Citotoksičnost posredovana perforinom

#### 1.3.1.1. Građa perforina

Perforin (od engl. pore forming protein), također poznat i kao citolizin, je citoplazmatski granularni citolitički protein molekularne mase 70 kDa, istovjetan C9 komponenti komplekta (97,98). Kao i C9 komponenta komplekta stvara se i pohranjuje u citoplazmatskim granulama CTL-a i NK stanica (97,98). Perforin je citotoksin, topiv u vodi i sposoban utisnuti se u biološke membrane i umjetne lipidne dvosloje, te se zato svrstava u obitelj proteina koji stvaraju pore (99).

U nestimuliranim limfocitima periferne krvi perforin je konstitutivno nazočan u NK stanicama i  $\gamma\delta$  TCR+ limfocitima T (99). Perforin je nazočan i u subpopulaciji CD8+ limfocita T, koji su istovremeno i CD11b+, a može se inducirati u CD11b-subpopulaciji (99). Manje je prisutan i u CD4+ stanicama, ali se postotak perforin pozitivnih CD4+ stanica može povećati u brojnim fiziološkim i patološkim stanjima (99). Perforin nije nazočan u makrofazima i limfocitima B i ne može se u ovim stanicama inducirati (99).

#### 1.3.1.2. Mehanizam citolize posredovane perforinom

Perforinski mehanizam citolize započinje dodirrom i prepoznavanjem ubilačke i ciljne stanice. To se odvija vezanjem TCR/CD3 kompleksa i koreceptora na ubilačkoj stanici sa antigenima HLA, koji predočavaju peptid i koreceptorima na ciljnoj stanici (96). Tako nastaje aktivacijski signal, koji dovodi do utoka iona kalcija ( $\text{Ca}^{2+}$ ) u CTL i NK stanice, te preorijentacije njihovog sekretornog aparata prema membrani ciljne stanice. Zatim slijedi egzocitoza granula bogatih perforinom, grenzimima i drugim serinskim esterazama, u zonu dodira s ciljnom stanicom. (93,100). Nakon oslobađanja iz granula i u prisustvu iona kalcija, perforinski se monomeri vežu na fosforilkolinske nastavke na membrani ciljne stanice, te zatim polimeriziraju čineći cilindrične kanale građene od lipofilne vanjske i hidrofилne unutarnje površine (101). Oko 20 udruženih monomera stvara tubularnu strukturu, unutrašnjeg promjera od 5 do 20 nm, koja je izravno utisnuta u lipidni dvosloj (101,102). Perforinski kanali služe kao visoko vodljivi, neselektivni ionski kanali, kroz koje voda i molekule niske molekularne mase mogu slobodno ući u ciljnu stanicu (103,104). Na taj način nastaje poremećaj koloidno-

osmotskog gradijenta i smrt stanice nekrozom (103,104). Dakle, perforin je u stanju sam izazvati smrt ciljne stanice (104). Međutim, postoji opće mišljenje da je osnovna uloga perforinskih pora stvoriti prolaz grenzima i drugim apoptotičnim molekulama u ciljnu stanicu (96).

### 1.3.1.3. Uloga grenzima u citolizi posredovanoj perforinom

Do sada je pronađeno sedam mišjih i tri ljudska grenzima, od kojih su najbolje proučeni grenzim A (proteaza sa tripsinskom aktivnošću) i grenzim B (proteaza koja cijepa ostatke aspartatne kiseline) (105). Iako su sami grenzimi necitolitični, oni sudjeluju u procesu staničnog ubijanja (106). U miševa sa izbačenim perforinskim genom (od engl. knock-out), citolitička aktivnost limfocita ubojica je održana, iako znatno smanjena (107). S druge strane, citotoksični limfociti miševa sa izbačenim genom za grenzim B, iako su sposobni da ubiju ciljne stanice *in vitro*, ne uzrokuju brzu DNA fragmentaciju (107). Ovi rezultati potvrđuju pretpostavku da je citolitička akcija limfocita T rezultat suradnje perforina i grenzima (108).

Mehanizmi putem kojih grenzimi izazivaju DNA fragmentaciju i apoptozu nisu dovoljno poznati (95). Smatra se da nakon ulaska u ciljnu stanicu, grenzimi potiču apoptozu posredno u citoplazmi, aktivirajući citoplazmatske proteaze, kao što su kaspaza-3, -7, -8 i -10 ili izravno u jezgri cijepajući neki još uvijek nedovoljno istraženi supstrat smrti (93,95,109-112).

### 1.3.2. Citotoksičnost posredovana FasL/Fas putem, te putem TNF- $\alpha$

#### 1.3.2.1. Obilježja Fas liganda i receptora

FasL ili CD95L je membranski protein tipa II, molekularne mase 40 kDa, čiji se N-terminalni dio nalazi u citoplazmi, dok C-terminalni dio zadire u izvanstanični prostor (113). Fas L zajedno sa limfotoksinom, ligandima za CD30, 4-1BB, CD40 i CD27, te TRAIL-om spada u TNF obitelj citokina. FasL se nalazi ispoljen na limfocitima T, NK i LAK stanicama, te stanicama trofoblasta testisa i oka (113). Receptor za FasL naziva se Fas (poznat i kao APO-1 ili CD95). Spada u membranske proteine tipa I, ima molekularnu masu 45 kDa i član je TNF receptorske obitelji. Fas je konstitutivno ispoljen na većini tjelesnih stanica (113). Vezanje FasL-a za Fas ili

unakrsno vezanje Fas-a s agonističnim protutitijelima potiče apoptozu stanica koje nose Fas. Većina ostalih receptora iz TNF receptorske obitelji vode aktivacijske i stimulacijske signale, iako neki od njih, kao npr. CD40 i CD30 mogu također inhibirati rast, uzrokujući vjerovatno apoptozu (113).

#### 1.3.2.2. Citolitički put FasL/Fas

Vežanje Fas-a za FasL dovodi do trimerizacije i aktivacije Fas-a, čija citoplazmatska regija prenosi aktivacijski signal na FADD/MORT1 molekulu (Fas vezan protein sa smrtonosnom domenom, od eng. Fas associated protein with death domain) (113). Dvije istraživačke grupe, Boldin i suradnici, te Muzio i suradnici, su otkrili istu molekulu, koju su nazvali FLICE (od engl. FADD-like ICE) ili MACH (MORT-1 vezan CED-3 homolog, od engl. MORT-1 associated CED-3 homologue) (114,115). FLICE/MACH molekula spada u obitelj kaspaza, te se prema toj nomenklaturi naziva kaspaza-8 (114,115,116). Kaspaza-8 se preko dvije smrtonosne domene (od engl. "death domains"-DED) na N- terminalnom kraju veže na FADD/MORT-1, čineći tako DISC (od engl. death inducing signaling complex) (113). C-terminalna regija kaspaze-8 je vezana na ostale članove kaspaza obitelji, tj. na kaspazu-3 (po starijoj nomenklaturi CPP32 molekula) (113). Dakle, nishodna aktivacija kaspaze-8 oligomerizacijom FADD/MORT-1 molekule dovodi do cijepanja supstrata kaspaze-3, čime se aktivira kaskada cijepanja ICE proteaza, odnosno kaspaza, što predstavlja uvod u proces programirane stanične smrti, tj. apoptoze (113)

#### 1.3.2.3. Citolitički put posredovan TNF- $\alpha$ -om

Vežanje TNFR1 receptora za TNF- $\alpha$  dovodi do trimerizacije TNFR-a, čija citoplazmatska regija prenosi aktivacijski signal na TRADD interakcijom njihovih smrtonosnih domena (118). TRADD (TNFR1-vezana smrtonosna domena, od engl. TNFR1-associated death domain protein), za razliku od FADD/MORT-1 molekule, nema smrtonosnu izvršnu domenu, nego se TRADD veže na FADD/MORT-1, što onda dovodi do prijenosa aktivacijskog signala nishodno od FADD/MORT-1 molekule na kaspazu-8 (117). Dakle, prijenos signala nishodno od FADD/MORT-1 molekule je zajednički za TNF i FasL/Fas citolitičke puteve (117,118).



Međutim, uz ovaj put, TNF- $\alpha$  koristi i drugi put, koji vodi u apoptozu (117,118). Na TRADD je vezan i RIP (protein u interakciji s receptorom, od engl. receptor interacting protein), tj. serin/treoninska kinaza, koja se aktivira vezanjem smrtonosnih domena TRADD-a i RIP-a (119). Na RIP je, nadalje, vezan RAIDD (RIP-vezan Ich-1/CED homologni protein sa smrtonosnom domenom, od engl. RIP associated Ich-1/CED-3 homologous protein with death domain), koji spada u Ich obitelj proteaza, nazvan i kaspaza-2 (120). Apoptotični put nishodno od RIP-a i kaspaze-2 je trenutačno još uvijek nedovoljno rasvijetljen (119,120).

S druge strane, RIP se veže za TRAF2 (čimbenik vezan na TNF receptor, od engl. TNF receptor-associated factor), koji prenosi aktivacijski signal sa RIP-a na I $\kappa$ B (117,118). Za I $\kappa$ B je vezan NF- $\kappa$ B (od engl. nuclear factor  $\kappa$ B) (117,118). Aktivacijom i fosforilacijom I $\kappa$ B dolazi do cijepanja NF- $\kappa$ B, koji se na ovaj način aktivira, ulazi u jezgru i tu potiče ispoljavanje gena za preživljavanje, tj. gena koji inhibiraju citotoksičnost potaknutu TNF-om (117,118). Dakle, signal koji potiče od Fas-a je isključivo vezan za apoptozu, dok ostali članovi TNF receptorske obitelji, uključujući TNFR1, mogu potaknuti ili spriječiti apoptozu (113).

### **1.3.4. Kaspaze i njihova uloga u citolizi**

#### *1.3.4.1. Vrste kaspaza i njihova obilježja*

Do sada je otkriveno 13 kaspaza, koje se na osnovu strukture i uloge, dijele na tri podgrupe (ICE-slične, CPP-32 slične i Ich-1 slične proteaze) (113,119). Za sve njih je zajedničko da su građene od dvije velike (p17) i dvije male (p10) podjedinice koje nastaju proteolitičkim cijepanjem neaktivnih prekursora. Aktivacija kaspaza uključuje proteolitičko cijepanje među domenama što dovodi do uklanjanja prodomena i vezne regije, te spajanja velike i male podjedinice u aktivnu tetramernu strukturu (110). Kaspaze su dobile ime prema svojoj ulozi. One su cistein usmjerene aspartat specifične proteaze, koje cijepaju supstrat nakon aspartata (113). Neke od kaspaza, kao npr. kaspaza-4, -5 i -11 nisu uključene u apoptozu (119). Članovi obitelji kaspaza, koji imaju ulogu tijekom apoptoze, uključuju začetničke kaspaze (kaspazu-8, -9 i -10) i izvršne (npr. kaspaza-2,-3,-6 i -7). Osnovna uloga kaskade kaspaza je cijepanje različitih smrtonosnih supstrata, koji uključuju proteine citosola i jezgrine proteine koji



sudjeluju u DNA replikaciji i popravku, RNA cijepanju i staničnoj diobi, što onda vodi u apoptozu (110).

#### 1.3.4.2. *Proteolitičko cijepanje kaspazama*

Kaskada cijepanja kaspazama započinje aktivacijom začetničke kaspaze-8 cijepanjem njezinog inaktivnog prekursora (110). Kaspaza-8 aktivira kaspazu-3 iz prokaspaze-3, koja onda može s jedne strane sama cijepati stanične proteine i proteine jezgre, a s druge strane osloboditi enzim DNAazu, nazvanu CAD (od engl. caspase activated DNase) iz veze s njezinim inhibitorom (110). CAD dovodi do cijepanja kromosomske DNA, što je jedno od osnovnih obilježja apoptoze (110). S druge strane, kaspaza-8 može u citoplazmi cijepati Bid, stvarajući 15 kDa težak protein, koji putuje u mitohondrij i dovodi do oslobađanja citokroma c (110). Citokrom c se veže na Apaf-1 molekulu (od engl. apoptotic protease activating factor-1) i prokaspazu-9, čineći kompleks koji aktivira začetničku kaspazu-9. Kaspaza-9 može kao i kaspaza-8 aktivirati kaspazu-3, što onda vodi do cijepanja DNA i apoptoze (110).

Regulacija kaskade cijepanja kaspazama odvija se posredstvom grupe gena iz Bcl-2 obitelji (110). Neki članovi ove genske obitelji, kao što su Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w mogu spriječiti aktivaciju kaspaza, tj. apoptozu, inaktivacijom Apaf-1 molekule ili stabilizacijom mitohondrijalne membrane, što tada sprječava otpuštanje citokroma c (110). S druge strane, u Bcl-2 genskoj obitelji postoje i geni koji potiču stanično ubijanje, kao što su Bax, Bak, Bcl-x<sub>s</sub> (110). Njihovo ispoljavanje dovodi do stvaranja pora u vanjskoj membrani mitohondrija kroz koje se otpušta apoptogeni čimbenik citokrom c u citosol (110).

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Budući da najnovije studije psorijazu i lihen planus jasno definiraju kao autoimune bolesti posredovane isključivo T-staničnim imunitetom, ovo istraživanje je zamišljeno sa svrhom rasvjetljavanja mehanizama stanične citotoksičnosti u patogenezi ovih kožnih bolesti.

Stoga su glavni ciljevi ovoga rada bili slijedeći:

1. Rasvijetliti ulogu perforin posredovane citolize u imunopatogenezi psorijaze i lihen planusa
  - a) ispitivanjem zastupljenosti i kretanja limfatičnih subpopulacija osobito citotoksičnih T limfocita, te NK stanica u perifernoj krvi bolesnika u stadijima egzacerbacije i remisije, te uspoređivanjem s nalazima istih parametara kod zdravih osoba
  - b) ispitivanjem prisustva i kretanja perforin pozitivnih stanica u perifernoj krvi bolesnika u stadijima egzacerbacije, remisije i u zdravoj populaciji, te određivanjem udjela perforin pozitivnih stanica u sveukupnoj T limfocitnoj populaciji i populaciji NK stanica
  - c) određivanjem zastupljenosti perforina i drugih relevantnih biljega (CD4, CD8, CD16, CD56) u infiltratima kožnih lezija i susjedne nepromjenjene kože imunohistokemijskom metodom u stadijima egzacerbacije i remisije
  - d) određivanjem zastupljenosti i smještaja perforin pozitivnih stanica i drugih T limfocita u kožnim lezijama s obzirom na slojeve kože (npr. epidermis, dermis, krvne žile)
  
2. Istražiti i dokazati moguću ulogu drugog brzog puta stanične citotoksičnosti (Fas-FasL put) u imunopatogenezi psorijaze i lihen planusa
  - a) određivanjem zastupljenosti Fas (CD95) i FasL (CD95L) biljega u infiltratima kožnih lezija i susjedne nepromjenjene kože imunohistokemijskom metodom u stadijima egzacerbacije i remisije
  - b) određivanjem zastupljenosti i smještaja Fas i FasL pozitivnih stanica u kožnim lezijama s obzirom na slojeve kože (npr. epidermis, dermis, krvne žile)

3. Ispitati zastupljenost dendritičnih stanica u lezijama psorijaze i lihen planusa, te njihovu moguću ulogu u imunopatogenezi bolesti i mehanizmima stanične citotoksičnosti
  - a) analizom prisustva CD80, CD83 i CD1a biljega imunohistokemijskom metodom u stadijima egzacerbacije i remisije

### 3. ISPITANICI I METODE RADA

#### 3.1. Ispitanici

Ovo istraživanje je dio projekta, koji financira Ministarstvo znanosti (projekt br.062041 "Imunopatogenetski mehanizmi u psorijazi"), a odobreno je od strane etičke komisije Medicinskog fakulteta, Sveučilišta u Rijeci. Istraživanje je obuhvatilo oboljele od psorijaze i lihen planusa u stadijima egzacerbacije i remisije bolesti, koji su liječeni ambulantno i/ili stacionarno na Klinici za kožne i spolne bolesti, Kliničkog bolničkog centra Rijeka. Svi bolesnici su imali klinički jasnu i patohistološki potvrđenu psorijazu, odnosno lihen planus. Nitko od bolesnika nije uzimao sistemsku terapiju najmanje godinu dana prije, te lokalnu terapiju najmanje tjedan dana prije testiranja.

##### 3.1.1. Grupe bolesnika s psorijazom

Za analizu uzoraka periferne krvi protočnim citometrom, te kožnih biopata imunohistokemijom, sastavljene su dvije skupine bolesnika: oboljeli od psorijaze u egzacerbaciji bolesti (akutni stadij psorijaze), te psorijatičari u kroničnoj, remitentnoj, stabilnoj fazi. Stupanj bolesti je određen prema kliničkoj slici i ljestvici pokazatelja težine bolesti (od engl. psoriasis area and severity index scale-PASI scale)(122).

U mjerenju PASI-ja, razmatrana je proširenost bolesti na četiri glavna dijela tijela: glavu ( $g_l$ ), trup ( $t$ ), gornje ekstremitete ( $g_o$ ) i donje ekstremitete ( $d_o$ ). Postotak zahvaćenosti ove četiri regije ( $A_{g_l}$ ,  $A_t$ ,  $A_{g_o}$ ,  $A_{d_o}$ ) je prikazan brojevima od nule do šest: 0- bez zahvaćenosti, 1- manje od 10% zahvaćenosti, 2- 10-30%, 3- 30-50%, 4- 50-70% zahvaćenosti kože, 5- 70-90% zahvaćenosti kože, te 6- 90-100% zahvaćenosti kože. Ozbiljnost psorijatičnih lezija je procjenjivana trima simptomima: eritemom (E), infiltratom (I) i ljuštenjem (D) prema ljestvici od 0 do 4, gdje 0 znači potpuni nedostatak, a 4 najteže moguće predstavljanje kožnih promjena. PASI indeks je izračunavan prema formuli:  $PASI = 0,1(E_{g_l}+I_{g_l}+D_{g_l}) A_{g_l} + 0,3(E_t+I_t+D_t) A_t + 0,2(E_{g_o}+I_{g_o}+D_{g_o}) A_{g_o} + 0,4(E_d+I_d+D_o) A_d$ .

U skupinu oboljelih u remisiji psorijaze uključeni su psorijatičari s rijetkim, kroničnim, stabilnim psorijatičnim plakovima smještenim prvenstveno na koljenima, laktovima i lumbosakralnoj regiji, bez prisustva novih, diseminiranih lezija, niti povećanja starih. Svi ovi bolesnici su imali niski PASI indeks. Osobama s aktivnom

bolešću smatrane su one kod kojih su obje ove karakteristike bile prisutne, odnosno uz povećanje stabilnih plakova došlo je i do pojave novih papula veličine od zrna graška do kovanice smještenih po koži trupa i udova. Ovi bolesnici su se isticali visokim PASI indeksom.

U analizu periferne krvi uključeno je osamnaest bolesnika u stadiju egzacerbacije (akutni stadij bolesti), od toga 7 žena i 11 muškaraca (Tablica 1). Do pogoršanja bolesti je došlo od 10 dana do 5 mjeseci prije ispitivanja ( $2,13 \pm 1,44$  mjeseci, srednja vrijednost  $\pm$ SD). Godine života bolesnika su se kretale između 21 i 60 godina (srednja vrijednost godina života je bila  $43,6 \pm 12,8$  godina), PASI indeks je bio između 30,3 i 66,8 (srednja vrijednost PASI indeksa  $43,3 \pm 12,2$ ). Bolesnici u stabilnoj fazi bolesti (faza remisije) (13 bolesnika; 8 žena i 5 muškaraca) su bili od mjesec dana do šest mjeseci ( $3,47 \pm 1,98$  mjeseci, srednja vrijednost  $\pm$ SD) bez ikakvih znakova aktivne bolesti. Godine su varirale između 28 i 60 godina (srednja vrijednost 45 godina života), PASI indeks između 2,0 i 8,9 ( $4,32 \pm 2,2$ ) (Tablica 1).

Tablica 1. Osnovna obilježja oboljelih od psorijaze, lihen planusa, te zdrave kontrolne skupine uključenih u analizu parametara periferne krvi

	psorijaza		lihen planus		kontrolne
	akutna faza	faza remisije	akutna faza	faza remisije	
<b>No.</b>	18	13	15	11	24
<b>spol</b>	M 11 Ž 7	M 5 Ž 8	M 6 Ž 9	M 4 Ž 7	M 10 Ž 14
<b>godine života</b>	21-60 sr. vrij. 43,6	28-60 sr. vrij. 45	21-67 sr. vrij. 55,14	21-67 sr. vrij. 50,18	20-57 sr. vrij. 45,2
<b>PASI</b>	33,3-66,8 sr. vrij. 43,3	2,0-8,9 sr. vrij. 4,32			



Biopati promijenjene i nepromijenjene kože, uzeti su od devet ispitanika, mahom muškaraca, u stadiju egzacerbacije bolesti (Tablica 2). Pogoršanje je nastupilo od 10 dana do 8 mjeseci (srednja vrijednost 1,5 mjeseci) prije uzimanja uzoraka. Godine života oboljelih su se kretale između 22 i 62 godine (srednja vrijednost  $43,25 \pm 2$  godine), PASI indeks između 21,3 i 51,0 (srednja vrijednost PASI indeksa 34,47). Obuhvaćeno je i osam oboljelih u remisiji (četiri muškarca i četiri žene), koja je trajala od 1 mjesec do 2 godine prije uzimanja biopsije. Godine života su varirale od 24 do 65 godina (srednja vrijednost 46,63 godine), PASI indeks od 0,6 do 9,3 (srednja vrijednost 3,27) (Tablica 2).

Tablica 2. Osnovna obilježja oboljelih od psorijaze, lihen planusa, te zdrave kontrolne skupine uključenih u imunohistokemijsku analizu kožnih lezija

	psorijaza		lihen planus	kontrolne
	akutna faza	faza remisije	akutna faza	
<b>No.</b>	9	8	10	8
<b>spol</b>	M 9 Ž 0	M 4 Ž 4	M 5 Ž 5	M 3 Ž 5
<b>godine života</b>	22-62 sr. vrij. 43,25	24-65 sr. vrij. 46,63	21-66 sr. vrij. 56,2	33-68 sr. vrij. 56,66
<b>PASI</b>	21,3-51,0 sr. vrij. 34,47	0,6-9,3 sr. vrij. 3,27		

### 3.1.2. Grupe bolesnika s lihen planusom

Kod lihen planusa su, kao i kod psorijaze, za analizu uzoraka periferne krvi protočnim citometrom, te kožnih biopata imunohistokemijom sastavljene dvije skupine bolesnika: lihen planus u egzacerbaciji (akutni stadij), te lihen planus u remisiji. Stadij bolesti je određen prema kliničkoj slici. Kod osoba u akutnom stadiju vidjele su se



purpurne, poligonalne papule voštanog sjaja, veličine od glavice pribadače do zrna graška, smještene prvenstveno na zapešćima, podlakticama i po trupu, a rjeđe i potkoljenicama (klinički tip lichen ruber exanthematicus). Kod većine ovih bolesnika našli smo i promjene sluznice usne šupljine u obliku Wichamovih strija. Isti bolesnici su ispitivani i u remisiji, stabilnoj fazi lihen planusa kada su pokazivali uredan dermatološki status, potpuno bez kožnih promjena.

Analizom periferne krvi obuhvaćeno je petnaest bolesnika u stadiju egzacerbacije (akutni stadij) (9 žena i 6 muškaraca). Akutni stadij bolesti je počeo oko 6 tjedana do 4 mjeseca (sr. vrijednost $\pm$ SD, 3,84 $\pm$ 0,54) prije ispitivanja. Godine života bolesnika su se kretale između 21 i 67 godina (srednja vrijednost godina života 55,14). Bolesnici, koji su pripadali stabilnoj fazi bolesti (remisija) (11 bolesnika; 7 žena i 4 muškarca) su bili 1-2 godine bez ikakvih znakova aktivne bolesti. Godine života bolesnika su varirale između 21 i 67 godina (srednja vrijednost 50 godina) (Tablica 1).

Analizirani su i bioptati promijenjene i nepromijenjene kože deset oboljelih od lihen planusa (pet muškaraca i pet žena) u akutnom stadiju bolesti. Pogoršanje je nastupilo 8 dana do 6 mjeseci prije ispitivanja. Godine života bolesnika su se kretale između 21 i 66 godina (srednja vrijednost 56,2 godine) (Tablica 2).

### 3.1.3. Kontrolna grupa zdravih osoba

Kao kontrolna skupina u analizi periferne krvi, uzete su 24 zdrave osobe, većinom osoblje laboratorija i dobrovoljci (14 žena i 10 muškaraca), koji su odgovarali izučavanim skupinama po dobi i spolu. Dob kontrolne skupine je varirala između 20 i 57 godina (srednja vrijednost 45,2 godina) (Tablica 1). U analizi bioptata psorijatičnih i lihenskih lezija, kontrolnu skupinu je sačinjavalo osam osoba (tri muškarca i pet žena), dobi između 33 i 68 godina (srednja vrijednost 56,66 godina) (Tablica 2).

## 3.2. Materijal

### 3.2.1. Kemikalije

Ethylenediaminetetraacetate- $\text{Na}_2$ -salt (EDTA), Merck

Fetal calf serum (FCS), Gibco

Hepes, Serva

Kalcij-klorid,  $\text{CaCl}_2$ , Kemika  
 Kalij dihidrogenfosfat,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , Kemika  
 Kalij klorid,  $\text{KCl}$ , Kemika  
 Lymphoprep Gentamicyn sulfat, Serva  
 L-Glutamin, Merck  
 Magnezij klorid-6-hidrat,  $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ , Kemika  
 Merkaptoethanol, Merck 805740  
 Natrij azid,  $\text{NaN}_3$ , Difco  
 Natrij-dihidrogenfosfat-2-hidrat,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , Kemika  
 Natrij-klorid,  $\text{NaCl}$ , Kemika  
 Paraformaldehid, Kemika  
 Penicilin, Grunenthal, Stolberg  
 Propidium jodid, Serva 33671  
 Saponin, Sigma  
 Streptomycin sulfat, Merck  
 Tripansko modriilo (Tripin blue), Serva  
 Vodikov peroksid,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , Hospitalija

### 3.2.2. Mediji i pufferi

#### 1. Pufferirana fiziološka otopina (PBS)

Natrij-klorid ( $\text{NaCl}$ ) 140 mM, kalij-klorid ( $\text{KCl}$ ) 2,7 mM, natrij-hidrogenfosfat-2-hidrat ( $\text{NaHPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ) 6,5 mM, kalij-dihidrogenfosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 1,5 mM, kalcij-klorid ( $\text{CaCl}$ ) 0,7 mM, magnezij-klorid-6-hidrat ( $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ ) 0,7 mM.

#### 2. Medij za kulturu tkiva (RPMI medij)

L. glutamin 2mM, 2-Merkaptoetanol  $5 \times 10^{-5}$ , Hapes (pH 7,2) 10 mM, Penicilin  $1 \times 10^5$  U/l, Streptomycin sulfat 0,1 g/l, Gentamycin sulfat 0,05 g/l, Serum goveđeg fetusa (FCS) 5-10%

#### 3. Medij za protočni citometar

PBS 11, EDTA 10 mM, Hapes (pH 7,2) 20 mM, serum goveđeg fetusa 2%, natrij-azid ( $\text{NaN}_3$ ) 0,1%.

4. 4% paraformaldehid (pH 7,4) za fiksaciju staničnih membrana  
Paraformaldehid 40 g/L, natrij-hidrogenfosfat-2-hidrat ( $\text{NaHPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ) 16,83 g/L, natrij-hidroksid (NaOH) 3,85 g/L, glukoza 5,4 g/L.
5. Saponin pufer  
PBS, saponin 0,1%, serum goveđeg fetusa 2%, EDTA 1 mM.
6. LSAB-HRPO kit za imunohistokemiju, DAKO
  - 6.1. Otopina za blokiranje:  
PBS koji sadržava nosač proteina, natrij-azid 15 mM.
  - 6.2. Otopina sekundarnih protutijela:  
Biotinizirana protu-zečja i protu-mišja protutijela, PBS koji sadržava nosač
  - 6.3. Otopina za razrjeđenje streptavidina:  
Tris-HCl pufer
  - 6.4. Koncentrat streptavidina  
Streptavidin konjugiran s «horseradish» peroksidazom u tris-HCl puferu, natrij-azid 15 mM.
7. Diaminobenzidin + vodikov peroksid, DAB
8. Histomount medij za uklapanje stakalaca, DAKO

### 3.2.3. Protutijela

Za određivanje nazočnosti perforina u limfocitima periferne krvi, koristilo se mišje protuljudsko perforinsko protutijelo MoPt  $\delta\text{G9}$  (IgG2b) pročišćeno iz ascitesa Balb/C miševa (poklon od Dr. E.R. Podack, Miami). Panel ostalih monoklonskih protutijela bio je komercijalne proizvodnje tvrtke Becton-Dickinson: CD3(PE), CD4(PE), CD8(PE), CD16(PE) i CD56(PE) uz izotipsku IgG kontrolu. Protutijela su konjugirana s fikoeritriinom i FITC-om za dvostruko bojenje i analizu na FACS-u (Tablica 3). Za određivanje prisustva perforina i površinskih biljega u kožnim lezijama koristila su se komercijalno dobivena protutijela tvrtke DAKO: CD4, CD8, CD16, CD56, CD1a, CD80 i CD86, te tvrtke Pharmingen: perforin i FasL (Tablica 4).

Tablica 3. Prikaz protutijela korištenih u direktnoj i indirektnoj imunofluorescenciji

Protutijelo	Proizvođač	Razrjeđenje	Specifičnost
protu-CD3	Becton-Dickinson	1:100	Timociti, T-limfociti
protu-CD4	Becton-Dickinson	1:100	Podvrsta timocita, pomoćnički i upalni T-limfociti (oko 2/3 perifernih T-limfocita, monociti, makrofazi)
protu-CD8	Becton-Dickinson	1:100	Podvrsta timocita, citotoksični T-limfociti (oko 1/3 perifernih T-limfocita)
protu-CD16	Becton-Dickinson	1:100	Neutrofili, NK stanice, makrofazi
protu-CD56	Becton-Dickinson	1:100	NK stanice
protu-perforin	Dr. E. Podack	1:100	Citotoksični T-limfociti, NK stanice

Tablica 4. Prikaz protutijela korištenih u imunohistokemiji

Protutijelo	Proizvođač	Razrjeđenje	Specifičnost
protu-CD3	DAKO	1:35	Timociti, T-limfociti
protu-CD4	DAKO	1:35	Podvrsta timocita, pomoćnički i upalni T-limfociti (oko 2/3 perifernih T-limfoc, monociti, makrofazi)
protu-CD8	DAKO	1:50	Podvrsta timocita, citotoksični T-limfociti (oko 1/3 perifernih T-limfocita)
protu-CD16	DAKO	1:35	Neutrofili, NK stanice, makrofazi
protu-CD56	DAKO	1:20	Timociti, T-limfociti
protu-perforin	Pharmingen	1:70	Citotoksični T-limfociti, NK stanice
protu-Fas (CD95)	DAKO		
protu-FasL (CD95L)	DAKO	1:10	
protu-CD1a	BD Pharmingen		Kortikalni timociti, Langerhansove stanice, dendritičke stanice
protu-CD80	BD Pharmingen		B-limfociti
protu-CD83	BD Pharmingen		aktivirani B-limfociti, aktivirani T-limfociti, cirkulirajuće dendritičke stanice

### 3.3. Biološki materijal

#### 3.3.1. Dobivanje suspenzije limfocita periferne krvi

Uzorak od 10 mL periferne krvi uziman je od bolesnika liječenih ambulantno ili hospitaliziranih na Klinici za kožne i spolne bolesti, KBC Rijeka, iz kubitalne vene, u plastične šprice sa 0,5 mL heparina, da bi se spriječilo zgrušavanje. Izdvajanje limfocita, te određivanje zastupljenosti perforina i površinskih biljega u perifernoj krvi vršilo se u laboratoriju Zavoda za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta, Sveučilišta u Rijeci.

Limfociti periferne krvi (LPK) izdvojeni su naslojavanjem na 10 mL Lymphoprep i centrifugiranjem kroz 20 minuta na 800 xg. Izdvojeni prsten stanica pažljivo je pokupljen Pasteurovom pipetom i ispran dva puta u hladnom RPMI mediju, a zatim resuspendiran u konačnoj koncentraciji od  $1 \times 10^6$  limfocita periferne krvi po uzorku u mediju za protočni citometar (FACS mediju). Vijabilnost stanica je prethodno određena pomoću tripanskog modrila i uvijek je bila veća od 95%.

### 3.3.2. Biopsije kože

Uzorci promijenjene kože (cca 0,5 cm u promjeru) uzimani su u lokalnoj lidokainskoj infiltracijskoj anesteziji s ruba stabilnog (faza remisije) ili napredujućeg (faza egzacerbacije) psorijatičnog plaka, te novonastale lihenoidne papule. Uzorci nepromijenjene kože istog bolesnika uzimani su na mjestu udaljenom najmanje 3 cm od zahvaćene kože.

Odmah po uzimanju biopsije su dopremljene na Zavod za patologiju, Medicinskog fakulteta, Sveučilišta u Rijeci, gdje su smrznute i zatim narezane u aparatu za smrznute rezove (Cryocut) na debljinu od 3-4  $\mu\text{m}$  na predmetna stakla (DAKO chemate capillary gap microscope slides). Potom su tkivni rezovi osušeni na sobnoj temperaturi i pohranjeni na  $-20^{\circ}\text{C}$  do obilježavanja.

## 3.4. Laboratorijske metode

### 3.4.1. Određivanje perforina metodom indirektno imunofluorescencije

Pripremljena suspenzija stanica jednom je isprana i resuspendirana u hladnom FACS mediju. Podešenoj koncentraciji stanica od  $1 \times 10^6$  /100 $\mu\text{L}$  dodano je 100  $\mu\text{L}$  4% otopine paraformaldehida u PBS-u radi fiksacije i stabilizacije stanične membrane. Nakon inkubacije od 10 minuta na sobnoj temperaturi stanice su isprane u hladnom FACS mediju, te resuspendirane u 100  $\mu\text{L}$  0,1% saponinskog pufera radi permeabilizacije stanične membrane. Nakon inkubacije od 20 minuta na sobnoj temperaturi, dodana su monoklonska mišja protu-humana protu-perforinska protutijela, 3 $\mu\text{L}$  po uzorku, razrijeđena u 100 $\mu\text{L}$  saponinskog pufera, te inkubirana 30 minuta na  $+4^{\circ}\text{C}$ . Nakon toga uzorci su dva puta isprani u saponinskom puferu, da bi uklonili nevezana primarna protutijela. Zatim smo dodali sekundarno protutijelo GAM-FITC



(eng. Goat-Anti-Mouse) obilježeno fluorescentnom bojom fluorescein-izo-tio-cijanatom (FITC) 1 $\mu$ g po uzorku, razrijeđeno u 100  $\mu$ L saponinskog pufera, inkubirali 30 minuta na +4 $^{\circ}$ C, te ponovno isprali dvaput u saponinskom puferu. Na talog smo stavljali 0,5 mL FACS medija, koji je imao zadaću zatvoriti saponinom permeabiliziranu staničnu membranu.

#### 3.4.2. Obilježavanje membranskih biljega direktnom i indirektnom imunofluorescencijom

Kod direktne imunofluorescencije, stanice, prethodno resuspendirane u FACS mediju u koncentraciji od  $1 \times 10^6$  stanica/ 100 $\mu$ L, pomiješane su s istim volumenom razrijeđenog monoklonskog protutijela konjugiranog s fluorescentnom bojom. U svim testovima protutijela su bila otopljena u FACS mediju, u koncentraciji od 0,5-1  $\mu$ g protutijela po probi. Nakon inkubacije od 30 do 45 minuta na +4 $^{\circ}$ C, stanice su isprane dva puta sa 1 mL hladnog FACS medija i resuspendirane u istom volumenu FACS medija, koji je sadržavao i 1 $\mu$ g/mL propidij jodida.

Kod indirektno imunofluorescencije, nakon inkubacije od 30 minuta na +4 $^{\circ}$ C i dva ispiranja u mediju za protočni citometar, stanice su ponovo inkubirane 30 minuta na +4 $^{\circ}$ C sa sekundarnim protutijelom GAM-FITC, 1  $\mu$ g po uzorku, u razrijeđenju 1:100. Stanice su potom isprane dvaput u mediju za protočni citometar i na talog je dodano 0,5 mL FACS medija, te smo ih tako pripremili za uzimanje na protočnom citometru.

#### 3.4.3. Istovremeno obilježavanje dvaju antigena, unutarstaničnog (perforina) i površinskog (membranskog) antigena

Ovom metodom moguće je dokazati prisustvo dvaju antigena, od kojih je jedan prisutan u stanici, a drugi na površini stanice. Prethodno fiksirane i permeabilizirane stanice, resuspendirane su u 100  $\mu$ L 0,1% saponinskog pufera u koncentraciji  $1 \times 10^6$  stanica po uzorku, te inkubirane 30 do 45 minuta s primarnim protutijelom (anti-humani perforin). Primarno protutijelo je prethodno razrijeđeno u saponinskom puferu, tako da je konačno razrijeđenje bilo 5 $\mu$ g po uzorku. Stanice su isprane dva puta u saponinskom puferu, a zatim smo suspenziji dodali sekundarno protutijelo konjugirano s fluorokromom (GAM-FITC), u koncentraciji 0,5-1 $\mu$ g po probi, te inkubirali daljnjih 30-45 minuta na +4 $^{\circ}$ C. Stanice smo isprali dva puta u saponinskom puferu, te

resuspendirali u 1 mL PBS-a i ostavili daljnjih 10 minuta na  $+4^{\circ}\text{C}$ , kako bi se oporavile stanične membrane. Na centrifugiranjem istaložene stanice dodali smo primarno protutijelo za obilježavanje membranskih antigena. Nadalje je slijedio postupak kao u direktnoj ili indirektnoj imunofluorescenciji, kojeg je diktirala kvaliteta upotrebljenog primarnog protutijela. Na kraju smo stanice resuspendirali u 1 mL FACS medija, te 10000 stanica svakog uzorka analizirali protočnim citometrom.

#### 3.4.4. Protočna citometrija

Tako pripremljeni stanični uzorci analizirani su FACS-calibar programom protočnog citometra (Becton-Dickinson), uz standardne parametre FSC (parametar veličine stanica), SSC (parametar granuliranosti stanica), FL1 (intenzitet zelene fluorescencije GAM-FITC-a) i FL2 (intenzitet crvene fluorescencije PE-a).

#### 3.4.5. Imunohistokemijsko bojanje zasnovano na LSAB (od engl. labelled streptavidin biotin) vizualizacijskom sistemu

Obilježavanje antigena u tkivnim rezovima vršilo se na Zavodu za patologiju LSAB vizualizacijskim sistemom (DAKO kit). Predmetna stakla s histološkim rezovima, izvađena iz hladnjaka, sušila su se 30 minuta na sobnoj temperaturi. Potom su se tkivni rezovi fiksirali u acetonu, rashlađenom na  $+4^{\circ}\text{C}$  kroz 10 minuta, te ponovo sušili na sobnoj temperaturi 10 minuta. Stakla su zatim stavljena u aparat za imunološko bojanje (DAKO TECHmate horizon automated immunostainer, Biosystem Inc.), te je pokrenut program MSIP-a (od engl. microwave streptavidin immunoperoxidase protocol). Obilježavanje tkiva određenim protutijelima obavljalo se u slijedećim koracima. Nespecifično vezanje izbjeglo se inkubacijom u otopini za blokiranje (blokirajući serum, DAKO) kroz dvije minute, a potom su stanice inkubirane 25 minuta sa primarnim protutijelima razrijeđenim u otopini za razrjeđivanje antitijela (LSAB kit, DAKO). Nakon toga na stakla je nakapano biotinizirano sekundarno protumišje ili protuzeđe protutijelo (LSAB kit, DAKO) i inkubirano 25 minuta. Na stakla se zatim nakapala peroksidaza blokirajuća otopina (LSAB kit, DAKO) za inaktivaciju endogene peroksidaze, kroz 8 minuta, te streptavidin-HRP (DAKO kit) i inkubirana 25 minuta. Specifična reakcija vezanja prikazana je diaminobenzidinom (DAB), supstratnim sistemom, koji uključuje dvije komponente, otopinu koncentriranog diaminobenzidina,

te pufersku otopinu, koja sadrži vodikov peroksid (inkubacija 15 minuta). Jezgre su obojane hematoksilinom (inkubacija 1 minutu). Između svakog navedenog koraka, osim nakon dodavanja blokirajuće otopine, rezovi su ispirani u puferskoj otopini proizvođača (DAKO). Cijeli protokol je trajao 2 sata i 10 minuta. Nakon bojenja hematoksilinom tkivni materijal je rehidriran u 70%-tnom alkoholu (3 minute), 96%-tnom alkoholu (3 minute), te 100%-tnom alkoholu (3 minute). Nakon toga rezovi su dva puta ispirani u ksilenu i ostavljeni da stoje 10 minuta. Potom su se rezovi uklapali u histomount medij (DAKO) i pokrivali pokrovnim staklima.

Brojanje pozitivnih stanica vršeno je pod mikroskopom, pod povećanjem od 400x, u 10 nasumice izabranih vidnih polja. Rezultati brojenja su prikazani kao postotak pozitivnih stanica u ukupnom broju stanica izbrojenih u tih 10 nasumice izabranih vidnih polja.

### 3.5. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu rezultata koristili smo neparametrijski Mann-Whitney U test za male nezavisne uzorke. Za usporedbu malih zavisnih uzoraka koristili smo Wilcoxon test. Razlike srednjih vrijednosti između pokusnih uzoraka s vjerojatnošću standardne greške manje od 0.05 ( $p < 0.05$ ) smatrali smo statistički značajnim. Statistika je rađena kompjuterskim programom Statistica for Windows, Kernel release 5.5A (Statsoft Inc, Tulsa, OK, USA), dok su rezultati prikazani kompjuterskim programom Sigma Plot for Windows, version 6.1 (Jandel Scientific Software, Chicago, IL, USA) i programom Power Point (Microsoft Office 98).

## 4. REZULTATI

### 4.1. Kretanje limfocitnih subpopulacija i ispoljavanje perforinske molekule u perifernoj krvi oboljelih od psorijaze

Fenotipska obilježja limfocita periferne krvi analizirana su metodom indirektna ili direktne imunofluorescencije, ovisno o vrsti monoklonskog protutijela koje je korišteno u postupku, uz kontrolu odgovarajućim izotipskim protutijelima. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost postotka uz naznačenu standardnu pogrešku i razinu statističke značajnosti.

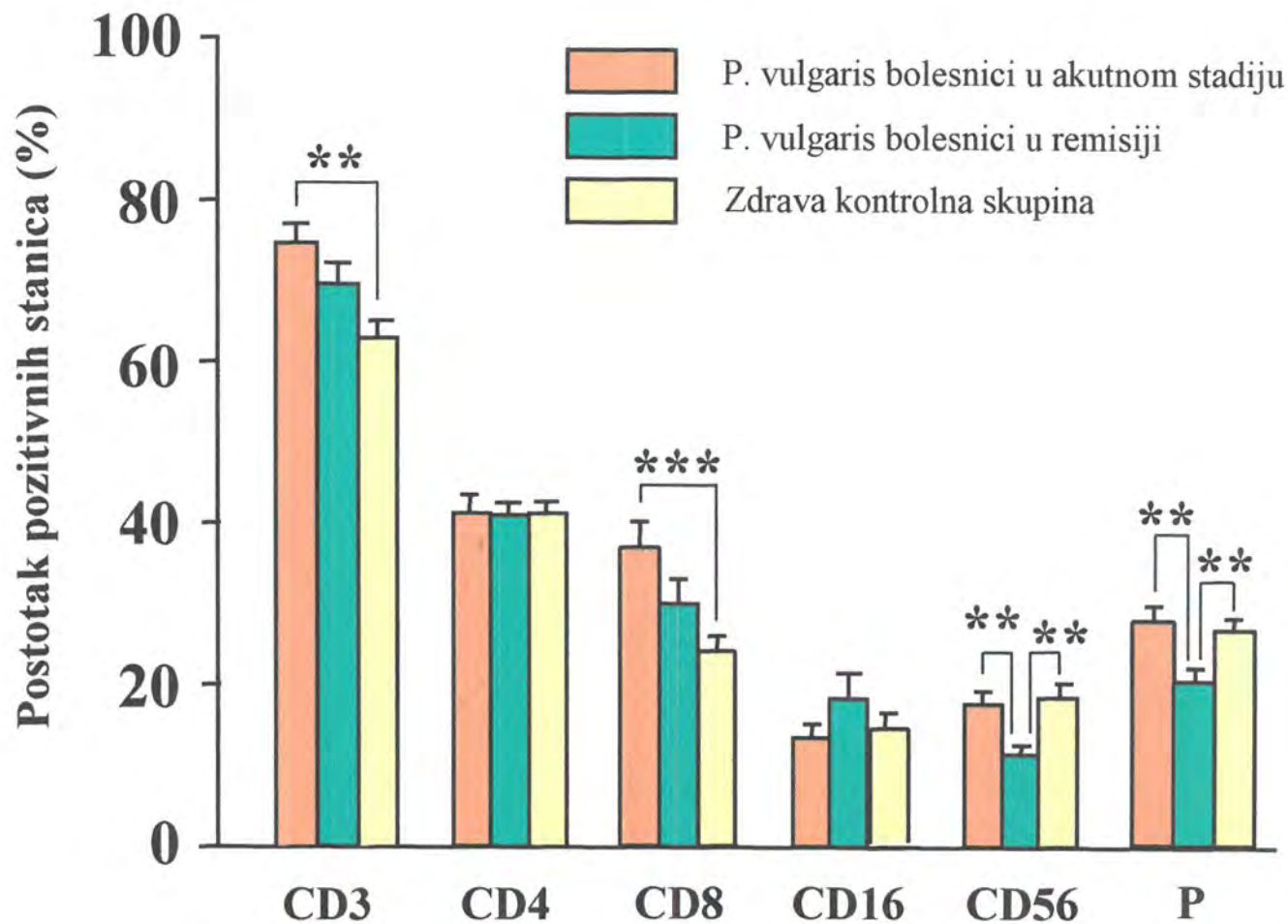
#### 4.1.1. Promjene fenotipskih obilježja limfocita periferne krvi (LPK) u bolesnika s psorijazom tijekom akutnog stadija i remisije: Veći postotak citotoksičnih limfocita T i NK stanica u akutnom stadiju psorijaze u odnosu na remisiju

Analizirajući fenotipske karakteristike LPK tijekom akutnog stadija psorijaze i njene remisije, te uspoređujući sa nalazima zdrave populacije podudarne s ispitivanom u dobi i spolu, uočili smo slijedeće razlike.

U akutnom stadiju psorijaze postoji snažna zastupljenost CD3 biljega na limfocitima periferne krvi (75%), dok je u remisiji taj postotak nešto manji (70%). Zastupljenost ovoga biljega na LPK u akutnom stadiju je statistički značajno veća nego u zdravih kontrola ( $p < 0,01$ ) (slika 3).

Naši rezultati ukazuju da tu razliku stvara prvenstveno subpopulacija CD8+ limfocita T, koja je u akutnom stadiju psorijaze zastupljenija nego u remisiji (37% prema 30%), te znatno veća nego kod zdravih osoba (24%) ( $p < 0,001$ ) (slika 3). S druge pak strane, nema razlike u ispoljavanju CD4 biljega na LPK oboljelih od psorijaze bez obzira na stadij bolesti, te u usporedbi sa zdravom populacijom (slika 3).

Među NK stanicama, uočava se statistički značajna razlika u ispoljavanju CD56 biljega između akutnog stadija psorijaze i njezine remisije (slika 3). Visoka razina ispoljavanja ove molekule uočena je u akutnoj fazi bolesti (18%) da bi se u remisiji taj postotak značajno smanjio (11%;  $p < 0,01$ ) (slika 3). Postotak zastupljenosti ove molekule u remisiji je značajno niži i u usporedbi sa zdravom kontrolnom skupinom



Slika 3. Fenotipske karakteristike limfocita periferne krvi (LPK) u oboljelih od psorijaze (stupanj statističke značajnosti: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ )



( $p < 0,01$ ). Nasuprot tome, ispoljavanje CD16 molekule je naj snažnije u remisiji bolesti (18%), za razliku od akutne faze (14%) i zdravih pojedinaca, ali ta razlika nije statistički značajna (slika 3). Vrlo je interesantan nalaz da je u remisiji postotak CD16+ stanica viši od postotka CD56+ stanica što bi govorilo u prilog nazočnosti skupine CD56+ stanica, koja ne ispoljava CD16 molekulu (slika 3).

#### *4.1.2. Ekspresija perforina u LPK: Veći postotak perforin pozitivnih stanica među LPK tijekom akutnog stadija psorijaze u odnosu na remisiju*

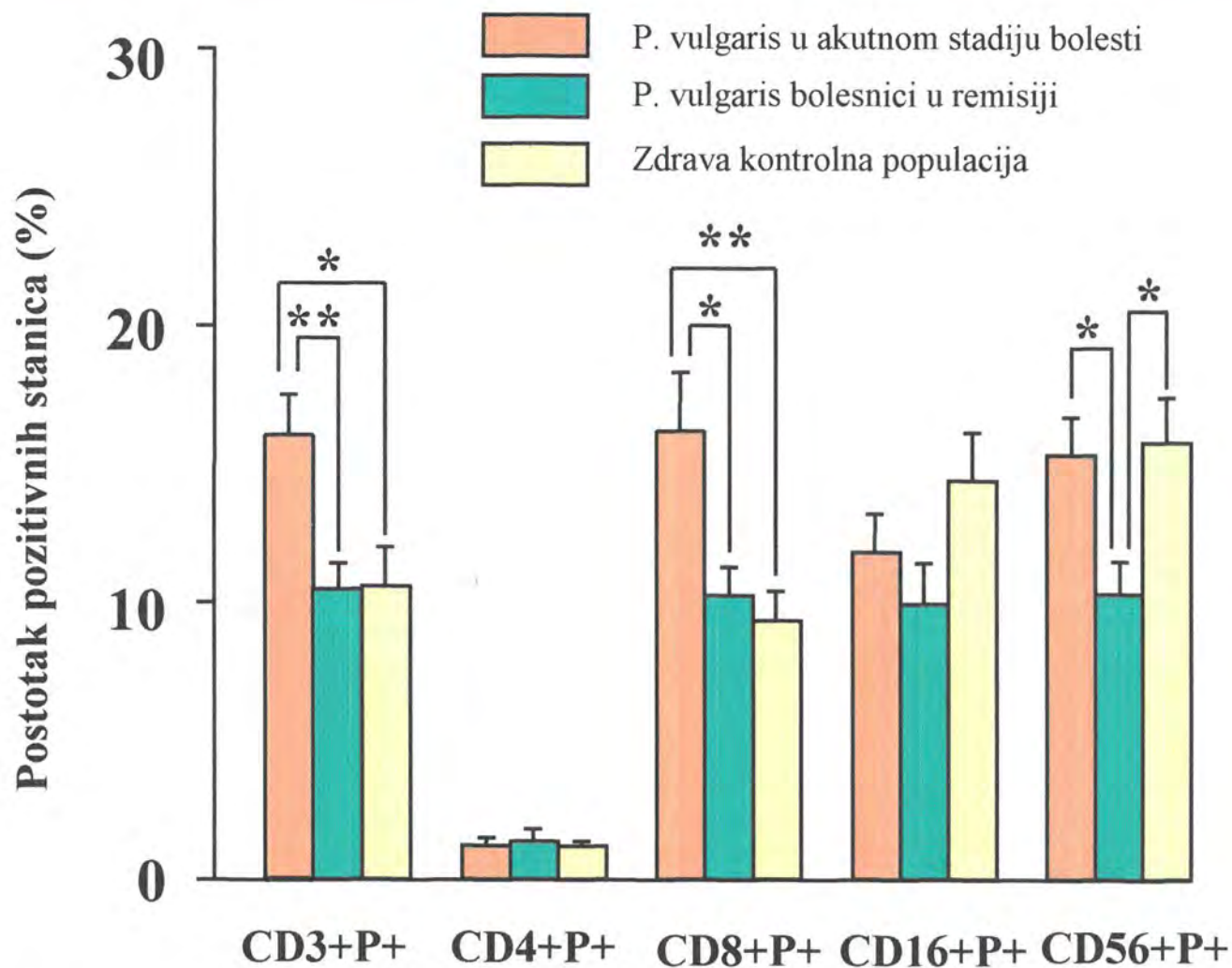
Ovdje smo određivali ukupan postotak perforin pozitivnih stanica u skupini limfocita periferne krvi, tj. postotak stanica koje sadrže perforin, bez obzira na broj molekula po stanici i fenotipska obilježja stanica.

Na temelju dobivenih rezultata vidimo da LPK u akutnom stadiju psorijaze ispoljavaju u znatno većem postotku citotoksičnu molekulu perforin (oko 28%) nego u remisiji bolesti (20%,  $p < 0,01$ ). Ispoljavanje ove molekule u LPK u remisiji je također značajno niže nego u kontrolnoj skupini ( $p < 0,01$ ) (slika 3).

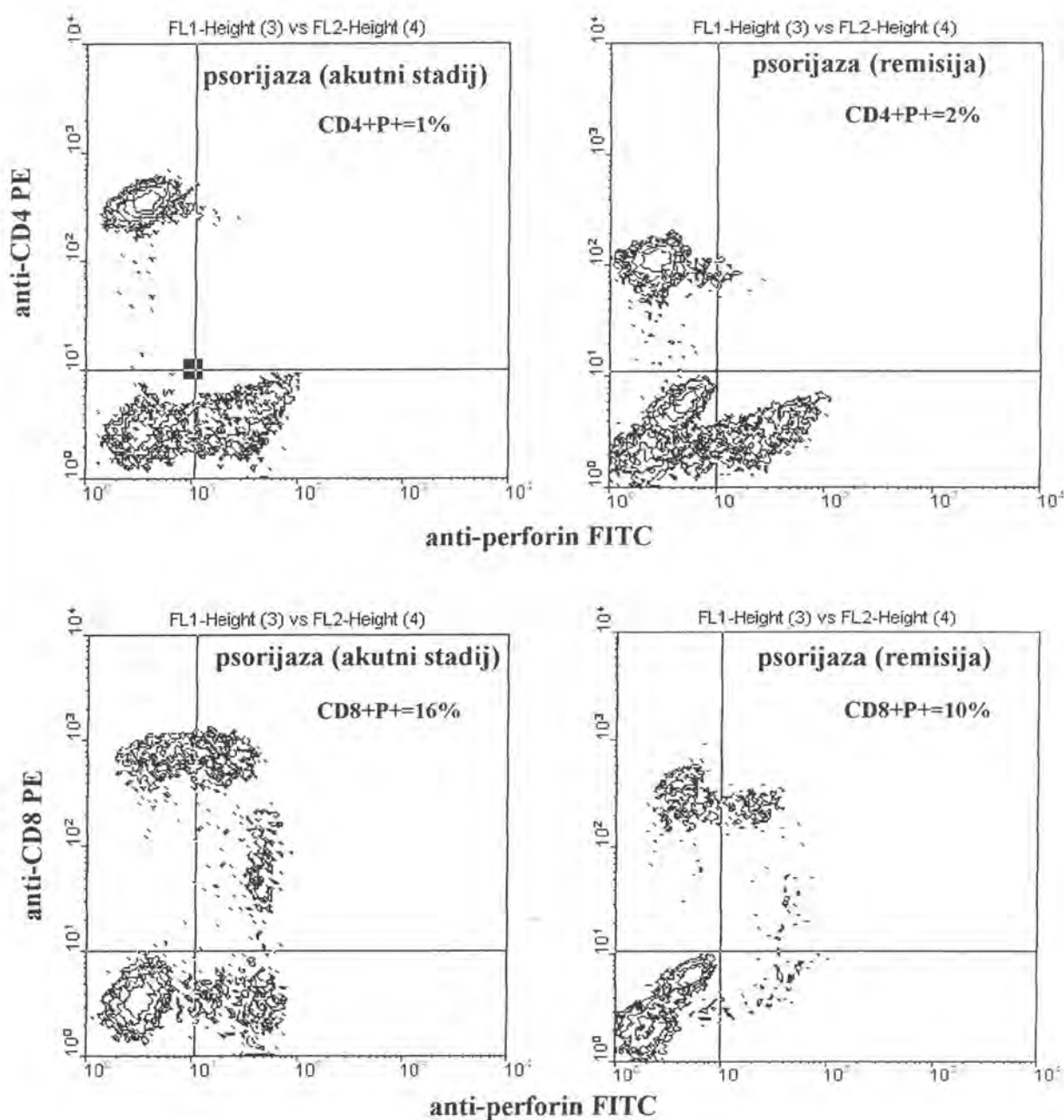
#### *4.1.3. Usporedno ispoljavanje (koekspresija) perforinske molekule i površinskih biljega na citotoksičnim limfocitima T i NK stanicama periferne krvi: Porast broja CD3+P+ i CD8+P+, te CD56+P+ stanica u akutnom stadiju psorijaze*

Metodom dvostrukog obilježavanja odredili smo usporedno ispoljavanje perforina i površinskih biljega u citotoksičnim limfocitima T i NK stanicama, te tako dobili uvid u rasprostranjenost perforinske ekspresije. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost postotka zastupljenosti dvostrukopozitivnih stanica (površinski antigen+ i P+) u suspenziji LPK (slike 4, 4a i 4b).

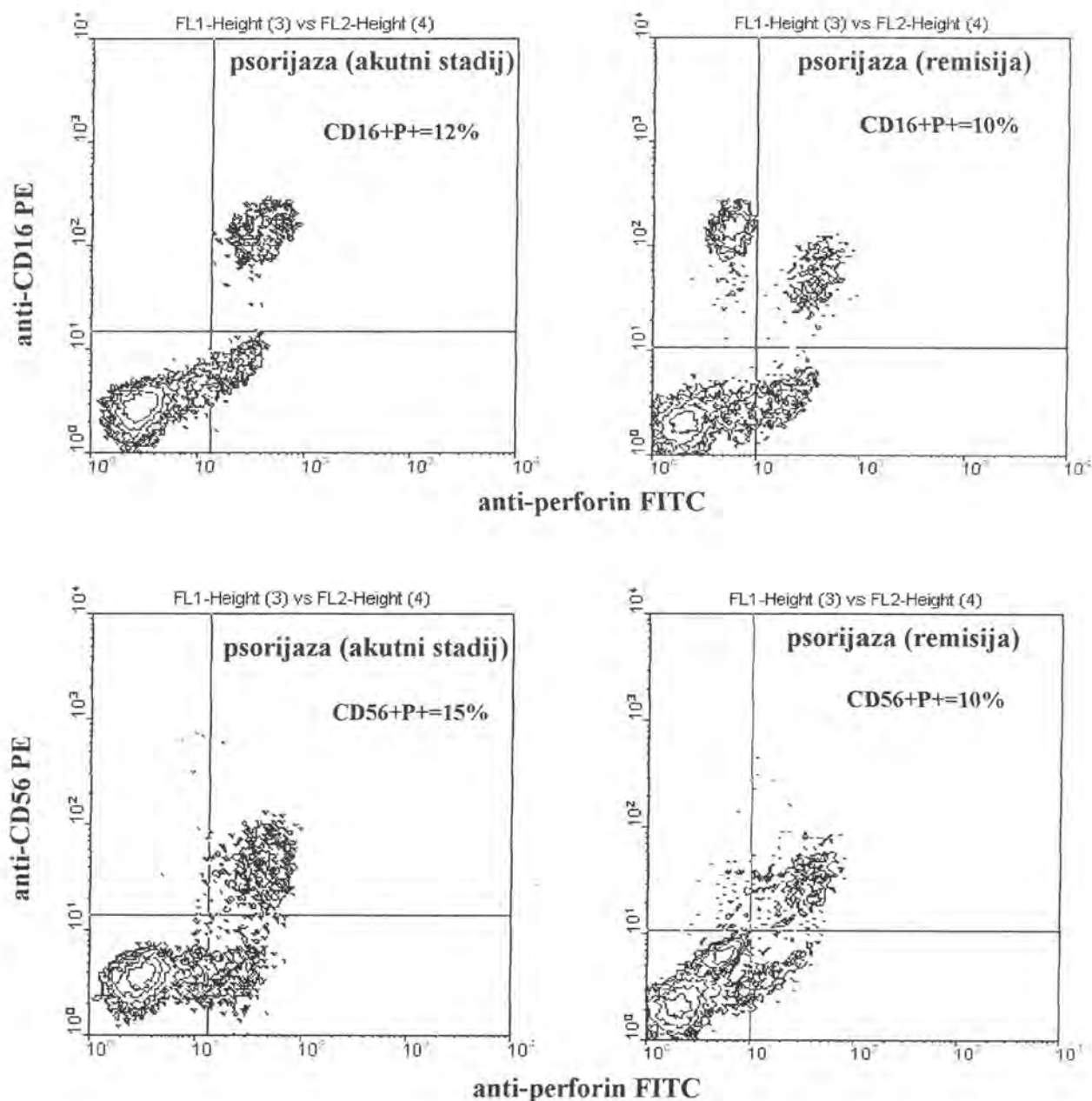
Postotak dvostrukopozitivnih limfocita T (CD3+P+ stanice) u akutnom stadiju psorijaze iznosi oko 16%, što je značajno više nego u remisiji (10%;  $p < 0,01$ ), te među zdravom populacijom (11%;  $p < 0,05$ ). Takav omjer prvenstveno nastaje zahvaljujući udjelu subpopulacije CD8+P+ citotoksičnih stanica. Naime, gotovo čitavu skupinu CD3+P+ stanica čini CD8+P+ skupina stanica, koja je u akutnom stadiju zastupljena sa 16%, dok je u remisiji njen postotak znatno manji (10%;  $p < 0,05$ ). Nema promjene u



Slika 4. Postotak dvostrukopozitivnih (P i površinski biljeg) limfocita periferne krvi u psorijatičara (stupanj statističke značajnosti: \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).



Slika 4a. Prikaz analize protočnim citometrom dvostruko pozitivnih (perforin+ marker+) LPK oboljelih od psorijaze (postotak na 10 000 stanica)



Slika 4b. Prikaz analize protočnim citometrom dvostruko pozitivnih (perforin+ marker+) LPK oboljelih od psorijaze (postotak na 10 000 stanica)

zastupljenosti CD4+P+ subpopulacije limfocita T u LPK tijekom akutnog stadija i remisije, a postotak pozitivnih stanica je vrlo nizak (1-2%) (slika 4).

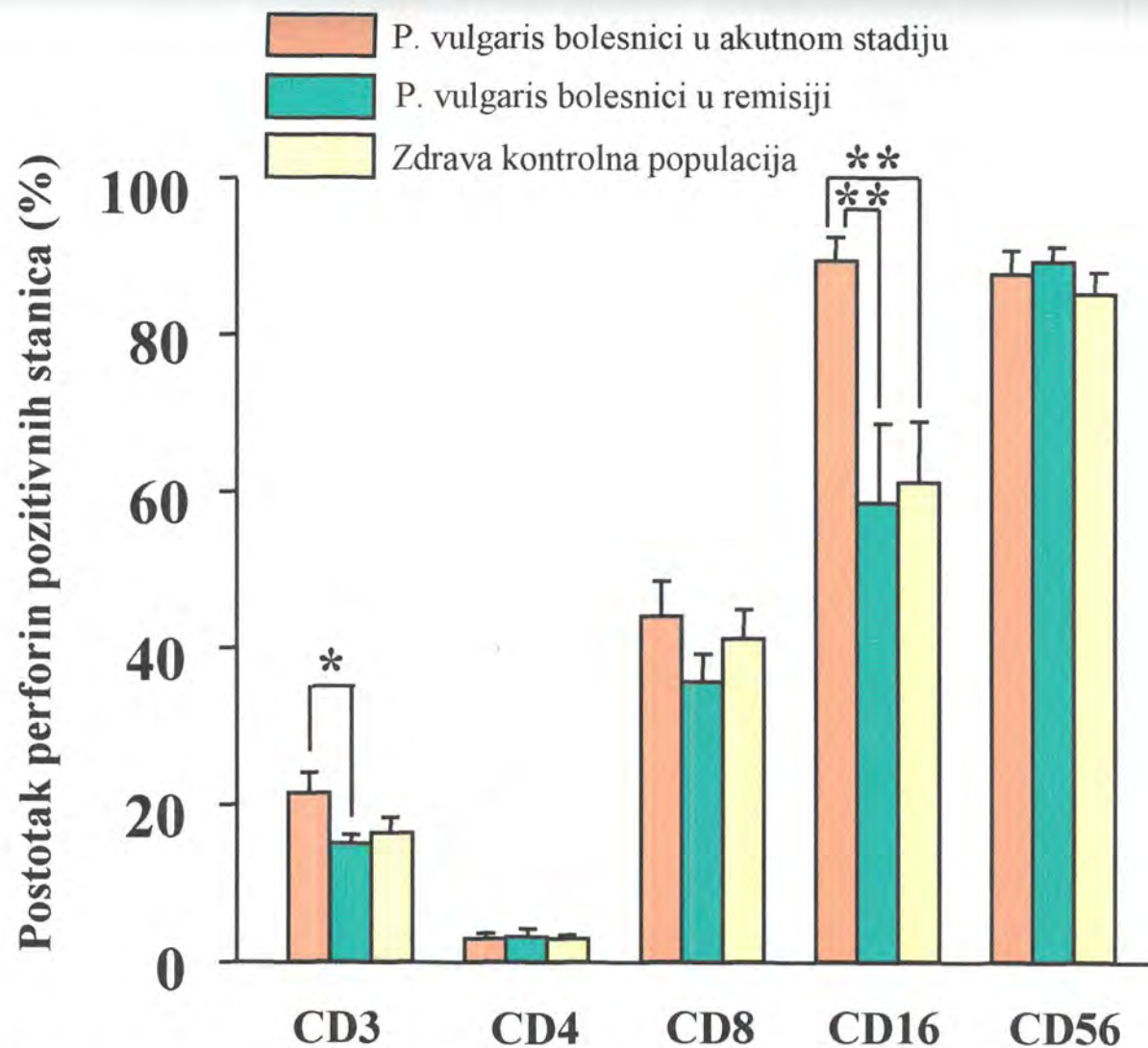
Istovremeno ispoljavanje (koekspresija) perforina i CD16 molekule, te perforina i CD56 molekule najviše je u akutnoj fazi bolesti (12% za CD16+P+ i 15% za CD56+P+), dok u remisiji taj postotak pada (10% za CD16+P+ subpopulaciju i 10% za CD56+P+ subpopulaciju) s time da je za potonju subpopulaciju razlika statistički značajna ( $p < 0,05$ ). Kod zdrave populacije postotak dvostrukopozitivnih stanica je za obje subpopulacije visok i za CD56+P+ subpopulaciju statistički značajno viši nego u remisiji psorijaze ( $p < 0,05$ ) (slika 4).

*4.1.4. Ekspresija perforina među pojedinim limfocitnim podvrstama periferne krvi u oboljelih od psorijaze: Citotoksični limfociti T i NK stanice snažnije ispoljavaju perforin u akutnom stadiju psorijaze u odnosu na remisiju*

Ako usporedimo ekspresiju perforina među različitim limfocitnim fenotipima uočavamo da populacija limfocita T periferne krvi snažno ispoljava perforinsku molekulu i to u značajno većem postotku u akutnom stadiju bolesti (21%) u usporedbi sa remisijom (15%;  $p < 0,05$ ), te zdravom populacijom (16%) (slika 5). Među limfocitima T perforin je nekoliko puta više zastupljen u CD8+ subpopulaciji limfocita T (oko 40%) u usporedbi s CD4+ limfocitima T (oko 3%) ( $p < 0,001$ ), kako u akutnom stadiju tako i u remisiji psorijaze, te kod zdravih osoba (slika 5).

Nadalje, zastupljenost perforina u CD8+ subpopulaciji je nešto veća u akutnom stadiju (44%), nego u remisiji (36%), mada razlika nije statistički značajna. U skladu s očekivanim postoji gotovo tri puta veća zastupljenost perforinske molekule u NK stanicama nego u limfocitima T, kako u CD16+ tako i u CD56+ subpopulaciji. Ispoljavanje perforinske molekule u CD16+ subpopulaciji u akutnom stadiju iznosi oko 90%, što je statistički značajno više nego u remisiji (oko 60%;  $p < 0,01$ ), te u skupini zdravih osoba (61%;  $p < 0,01$ ) (slika 5).





Slika 5. Ispoljavanje perforina u pojedinom fenotipu LPK psorijatičara (stupanj statističke značajnosti: \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

*4.1.5. Fenotipska obilježja perforin pozitivnih LPK u bolesnika s psorijazom: Perforin pozitivni limfociti periferne krvi mijenjaju fenotipska obilježja tijekom kliničkih stadija psorijaze: Osjetan pad citolitičkih CD8+P+ stanica u populaciji P+ stanica u remisiji u odnosu na akutni stadij*

Analizirajući protočnim citometrom samo perforin pozitivne LPK dobivene su značajne razlike u njihovim fenotipskim obilježjima tijekom psorijaze (slika 6).

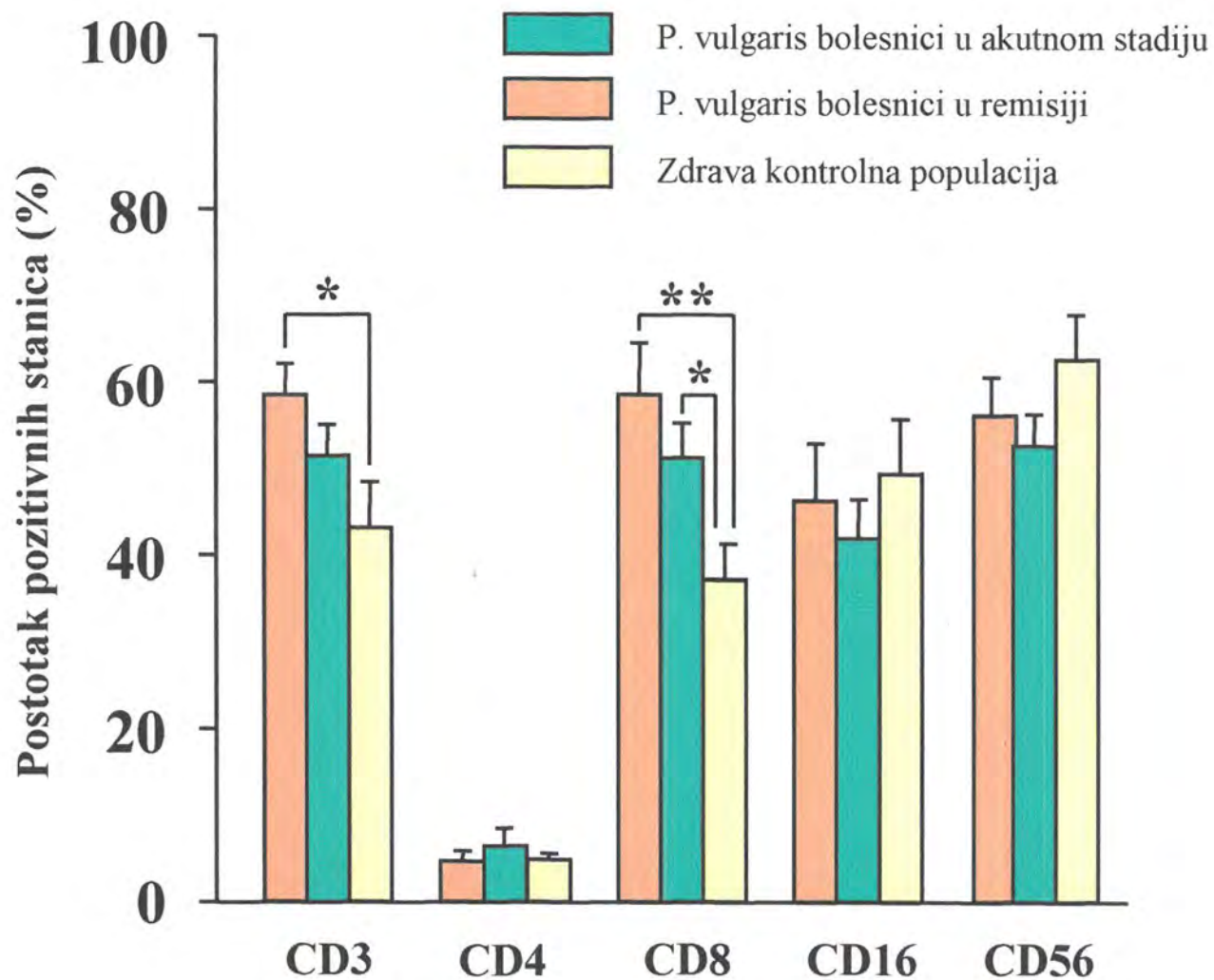
Dominantnu populaciju P+ stanica psorijaze čine limfociti T i CD56+ NK stanice (oko 60%). Gotovo svi P+ limfociti T pripadaju CD8+ subpopulaciji, dok je CD4+ subpopulacija zastupljena u vrlo malom postotku. Postotak limfocita T koji ispoljavaju perforinsku molekulu u akutnom stadiju psorijaze je najveći u odnosu na remisiju, te kontrolnu skupinu zdravih osoba ( $p < 0,05$ ). Isto vrijedi za CD8+ subpopulaciju P+ LPK koja je u akutnom stadiju psorijaze najzastupljenija (60%), dok je postotak ovih stanica manji u remisiji (51%), te kod zdravih osoba ( $p < 0,01$ ). Također je statistički značajna i razlika u postotku CD8+ stanica, koje ispoljavaju perforin, u remisiji i kod zdravih kontrola ( $p < 0,05$ ) (slika 6).

U skladu s očekivanim, perforin pozitivne stanice u visokom postotku ispoljavaju CD16 i CD56 molekule i to u akutnom stadiju psorijaze nešto više nego u remisiji, ali ta razlika nije statistički značajna. Visok postotak ispoljavanja nalazimo i kod zdravih osoba za obje subpopulacije stanica čak nešto više nego kod oboljelih od psorijaze (slika 6).

*4.1.6. Određivanje količine perforina po stanici u obliku srednje vrijednosti intenziteta fluorescencije (AFI)*

Analizirali smo i intenzitet fluorescencije za perforin, što direktno ukazuje na gustoću zastupljenosti tog antigena u stanici. Rezultate smo prikazali putem srednje vrijednosti intenziteta fluorescencije (AFI) za perforin (AFI/P) u LPK uz naznačenu standardnu pogrešku (tablica 5).

Zanimljivo je primijetiti da je unatoč velikog postotka P+ stanica u LPK oboljelih od psorijaze, a naročito dvostruko pozitivnih limfocita T, razina ispoljavanja P u limfocitima T (AFI) u oba stadija psorijaze niža nego kod zdravih pojedinaca (tablica 5), s naznakom da je u egzacerbaciji bolesti nešto viša nego u njoj remisiji. Isto se



Slika 6. Fenotipske karakteristike perforin pozitivnih LPK psorijatičara (stupanj statističke značajnosti: \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

**Tablica 5. Količina perforina po stanici izražena u obliku srednje vrijednosti intenziteta fluorescencije (AFI vrijednosti) (srednja vrijednost ± standardna pogreška) kod oboljelih od psorijaze**

	<b>CD3+P+</b>	<b>CD4+P+</b>	<b>CD8+P+</b>	<b>CD16+P+</b>	<b>CD56+P+</b>
<b>akutni stadij psorijaze</b>	30,3 ± 3,58	27,07 ± 3,46	33,20 ± 3,99	47,66 ± 5,58	41,83 ± 5,50
<b>remisija psorijaze</b>	22,61 ± 2,10	17,64 ± 2,00	29,28 ± 3,07	53,53 ± 11,51	55,55 ± 9,66
<b>zdrava populacija</b>	32,51 ± 3,49	38,02 ± 7,96	47,75 ± 7,21	85,81 ± 17,64	56,88 ± 5,72

Statistička značajnost  $p < 0,05$  za: CD4+P+ akutni stadij prema remisiji

očituje i u CD4+P+, te CD8+P+ subpopulacijama, gdje je količina perforina po stanici u akutnom stadiju veća nego u remisiji bolesti ( $p < 0,05$  za CD4+P+ subpopulaciju), ali ipak dosta niža u usporedbi s količinom perforina u zdravih osoba (tablica 5).

Gustoća zastupljenosti perforina unutar NK stanica je također nešto manja u obje faze bolesti u usporedbi sa zdravim osobama, a u remisiji je nešto veća nego u egzacerbaciji bolesti (tablica 5).

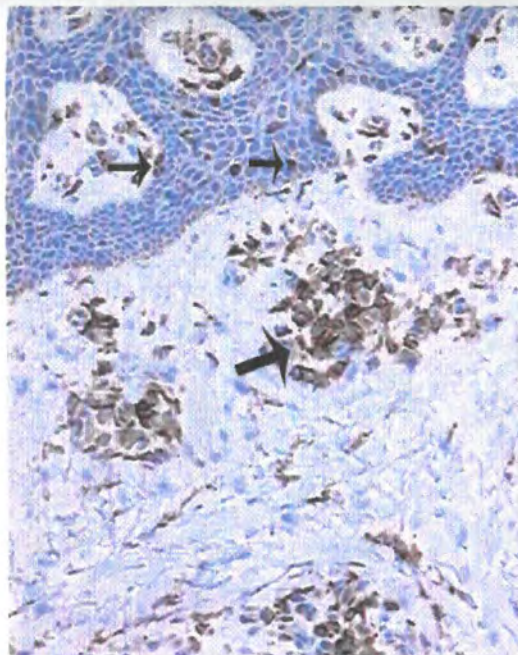
#### **4.2. Imunohistološki prikaz nazočnosti pojedinih limfocitnih biljega, perforinske molekule, FasL molekule i biljega antigen predočnih stanica u akutnom plaku, kroničnom plaku, te nepromijenjenoj koži psorijatičara u akutizaciji i remisiji bolesti**

Ispoljavanje površinskih antigena i unutarstanične molekule perforina u promijenjenoj i nepromijenjenoj koži psorijatičara dokazali smo jednostrukim imunohistokemijskim bojanjem serijskih kožnih rezova. Na imunohistokemijskim rezovima promatrali smo smještaj i raspored pojedinih limfocitnih biljega, biljega antigen predočnih stanica, te citolitičkih molekula perforina i FasL-a, nastojeći rasvijetliti njihove međusobne odnose, te ulogu koju imaju u akutnom i kroničnom plaku, te nepromijenjenoj koži bolesnika u egzacerbaciji i remisiji bolesti. Također smo izbrojali pozitivne stanice u deset vidnih polja pod povećanjem  $\times 400$  i rezultate izrazili u obliku srednje vrijednosti postotka pozitivnih stanica u ukupnom broju mononuklearnih stanica.

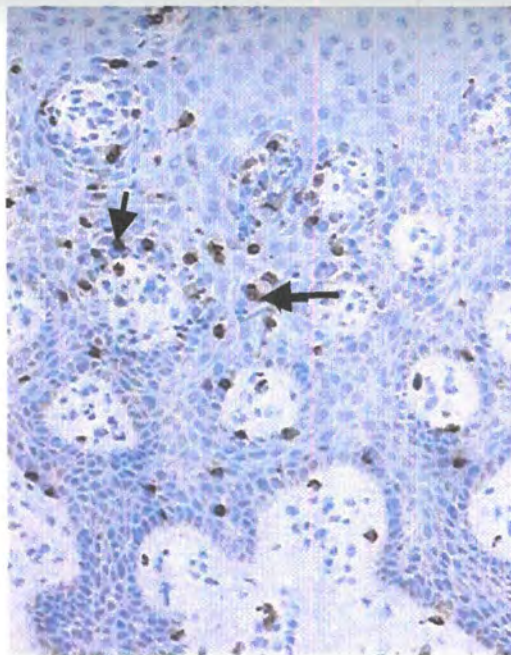
##### *4.2.1. Fenotipska obilježja stanica, te njihov udio u akutnom plaku, kroničnom plaku, i nepromijenjenoj koži psorijatičara u akutizaciji i remisiji bolesti: Citotoksične stanice prevladavaju u epidermisu promijenjene kože, naročito kroničnog psorijatičnog plaka*

Na prikazanim slikama psorijatičnog plaka mogu se zamijetiti osnovna patohistološka obilježja psorijaze (slike 7, 16-20). Epidermis je zadebljan sa izraženom fokalnom hiperkeratozom i parakeratozom. Epidermalne prečke su izdužene, zbog povećanog broja mitozu u bazalnom i suprabazalnom sloju. Rožnati sloj epidermisa privlači neutrofile, koji unutar njega stvaraju nakupine i mikroapscese. U dermisu se

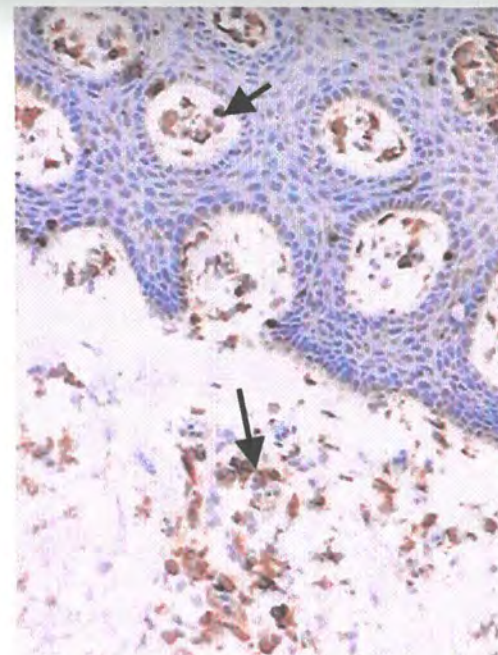




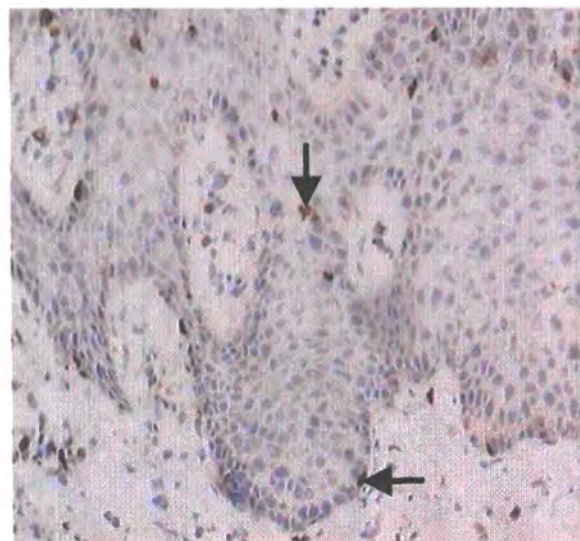
**CD4+ stanice**



**CD8+ stanice**



**CD56+ stanice**



**CD16+ stanice**

**Slika 7. Imunohistokemija psorijatičnog plaka na limfocitne biljege – povećanje x200 (pozitivne stanice su označene strelicama)**

zamjećuju izdužene papile uz suženje suprapapilarnog epidermisa, te nakupljanje upalnog infiltrata u papilama i dublje u dermisu. Zbog kosog presjeka bioptata, na pojedinim se imunohistokemijskim slikama, unutar epidermisa zamjećuju otočići papilarnog dermisa ispunjeni staničnim infiltratom (slike 7, 16-20).

Imunohistološkim bojanjem na limfocitne antigene (CD3, CD4 i CD8 biljezi) zamijetili smo snažno ispoljavanje CD3 (biljeg nije prikazan na slici) i CD4 biljega u papilarnom dermisu, većinom u obliku infiltrata, te nešto rjeđe u epidermisu psorijatičnog plaka (slika 7). S druge strane CD8 biljeg dominira u epidermisu iako se CD8+ stanice mogu rjeđe naći i u dermisu (slika 7). Brojanjem pozitivnih stanica i izražavanjem rezultata u obliku postotka pozitivnih stanica od ukupnog broja mononuklearnih stanica dobili smo slijedeće nalaze u akutnom i kroničnom plaku, te nepromijenjenoj koži istih bolesnika.

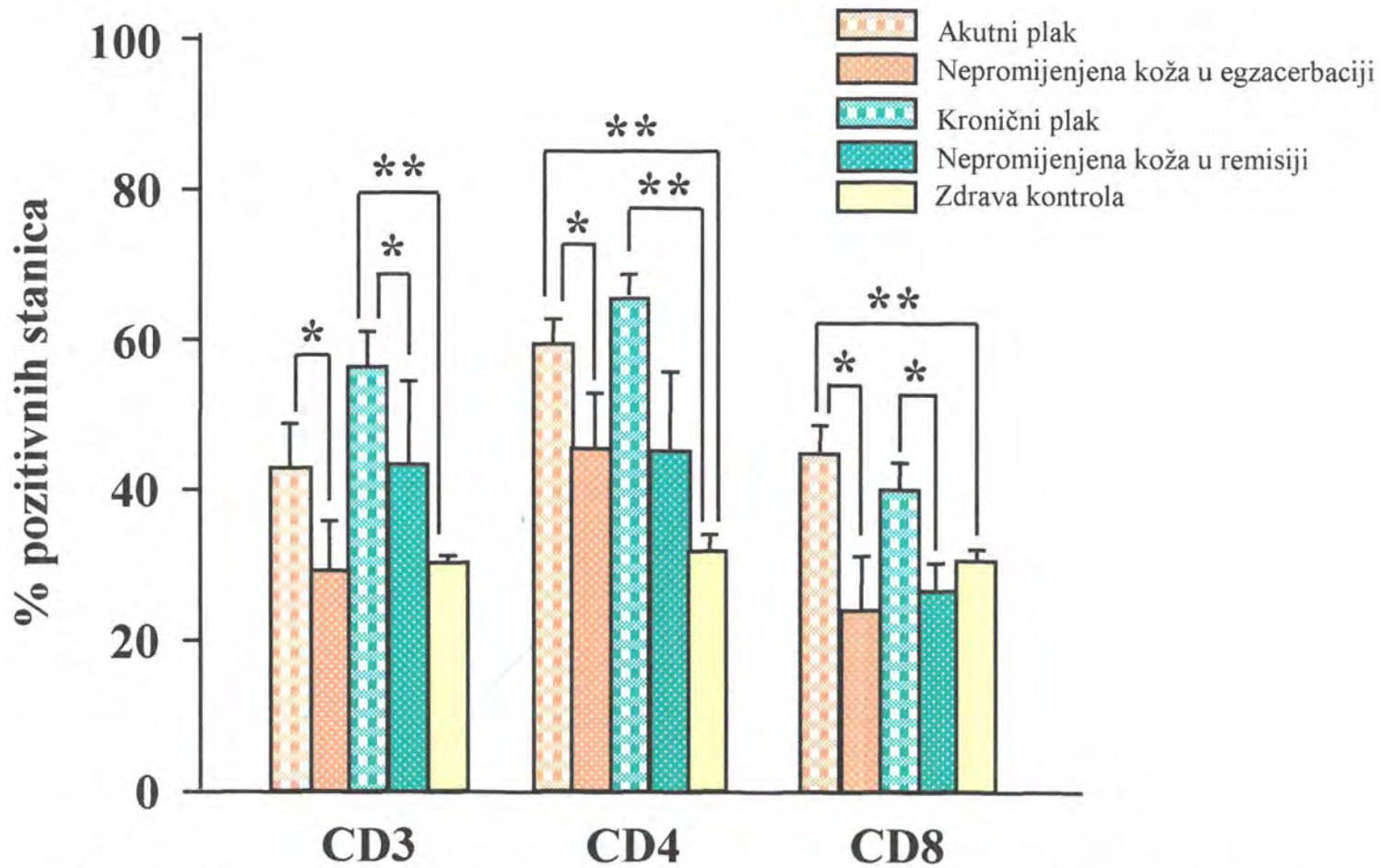
U skladu s očekivanim uočili smo značajno veću infiltraciju limfocita T (slika 8), te CD4+ i CD8+ stanica u psorijatičnom plaku u odnosu na nepromijenjenu kožu bolesnika kako u egzacerbaciji ( $p < 0,05$ ) tako i u remisiji bolesti ( $p < 0,05$ ), te u odnosu na kožu zdravih osoba ( $p < 0,01$ ) (slika 8). Slične razlike smo uočili i zasebno u kožnim slojevima, epidermisu i dermisu (slike 9 i 10).

Usporedbom ispoljavanja CD3 i CD4 biljega između akutnog i kroničnog psorijatičnog plaka, nismo uočili većih razlika kako ukupno u koži (slika 8) tako i u njezinim slojevima (slike 9 i 10). Međutim, usporedbom ispoljavanja ovih biljega između epidermisa i dermisa uočena je značajna razlika u ispoljavanju CD8 biljega, koji je gotovo dvostruko više nazočan u epidermisu kroničnog plaka, u odnosu na dermis (53% prema 35%,  $p < 0,05$ ) (slika 11). U akutnom plaku također postoji nešto veća zastupljenost CD8 biljega u epidermisu (51%) u odnosu na dermis (43%), ali razlika nije statistički značajna (slika 11).

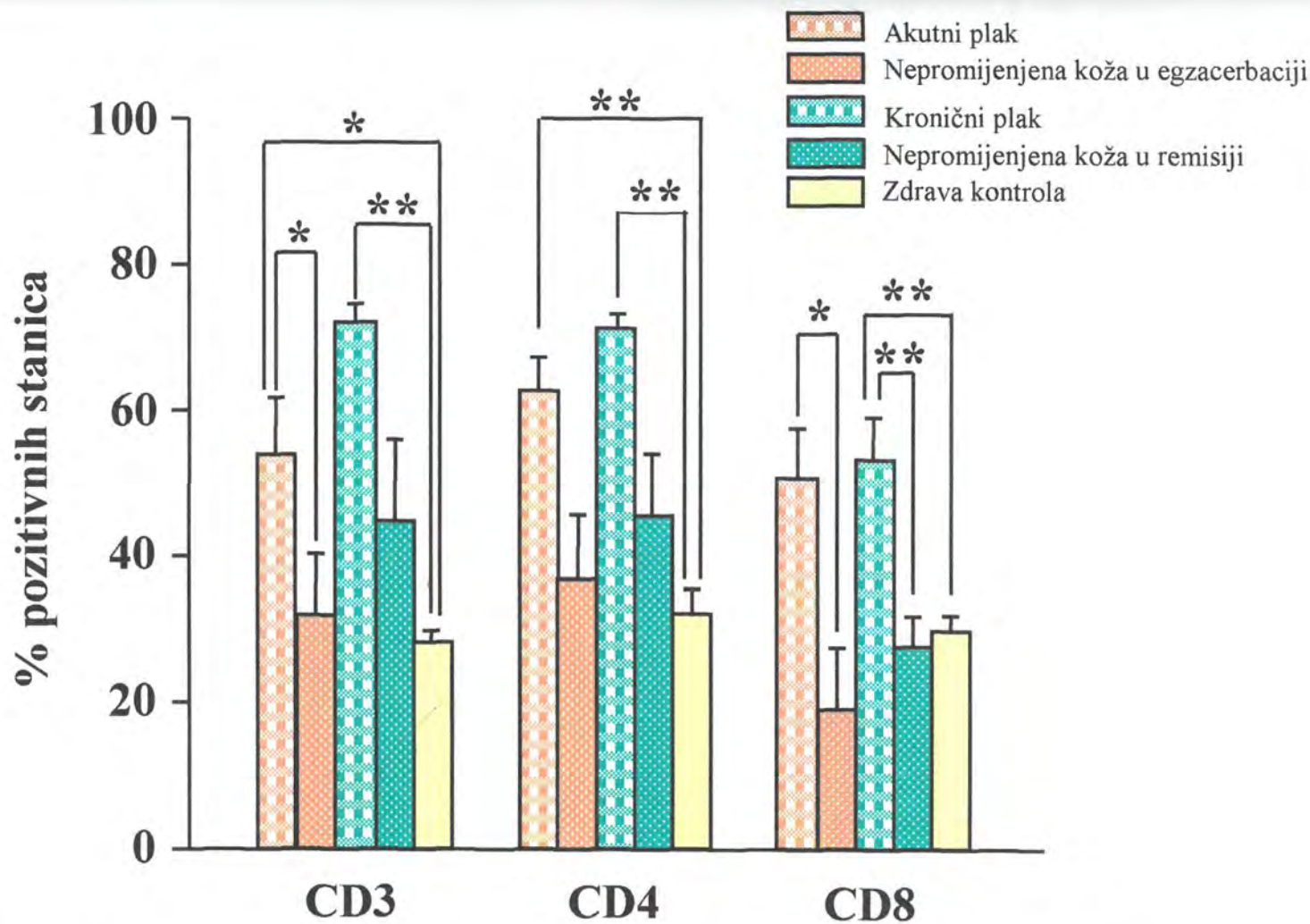
#### *4.2.2. Nazočnost biljega NK stanica i njihov udio u akutnom plaku, kroničnom plaku, te nepromijenjenoj koži psorijatičara u akutizaciji i remisiji bolesti*

Promatrajući ispoljavanje biljega NK stanica, CD16 i CD56 molekule na imunohistološkim slikama, zamijetili smo pojedinačno nakupljanje ovih molekula u epidermisu i uz epidermodermalnu granicu, te u obliku infiltrata u papilarnom dermisu (slika 7). Međutim, izraženo postotkom NK stanica u ukupnom broju mononukleara

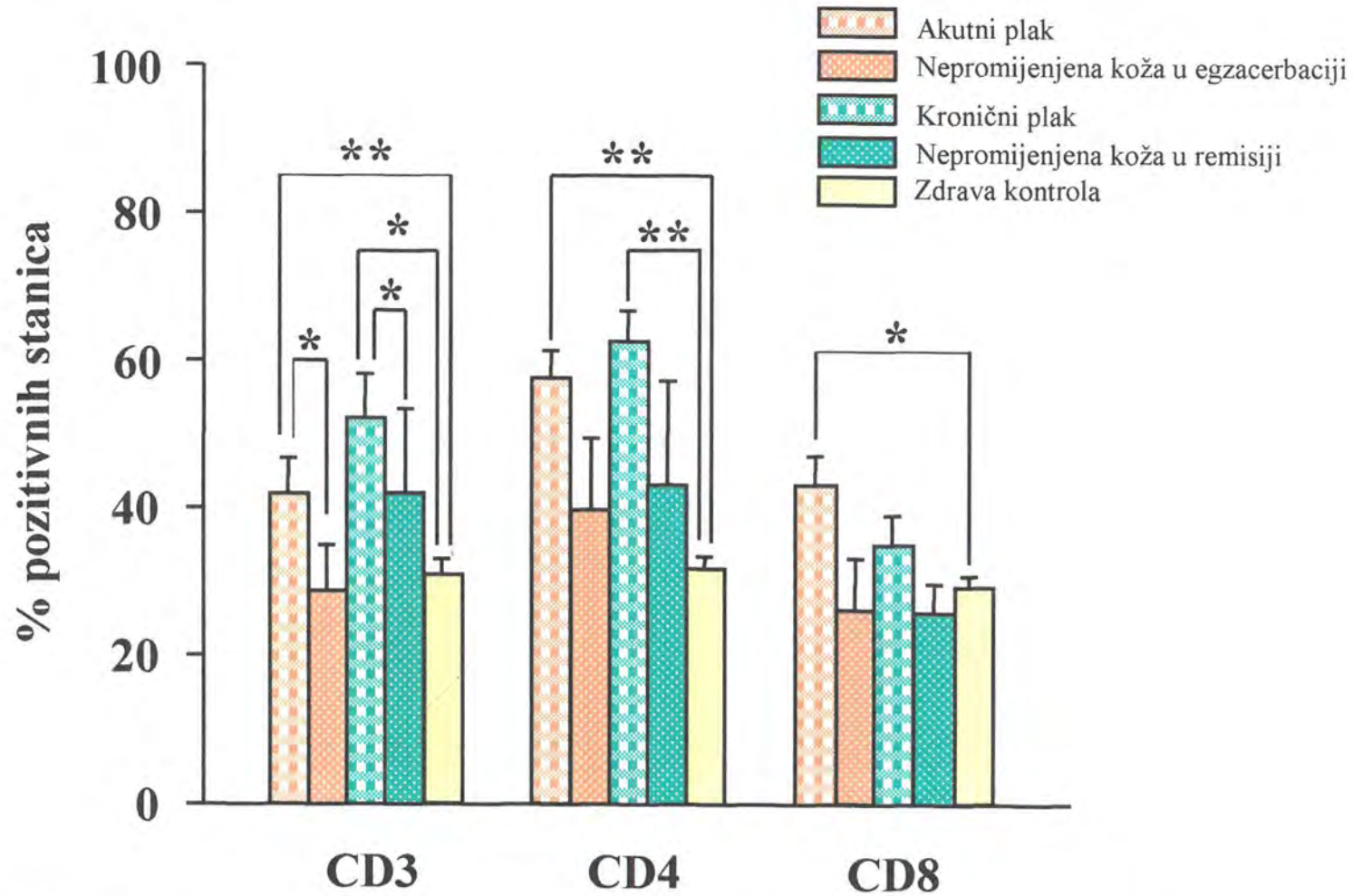




Slika 8. Ispoljavanje limfocitnih biljega ukupno u epidermisu i dermisu kožnih lezija i nepromijenjene kože oboljelih od psorijaze (stat. značajnost: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ )

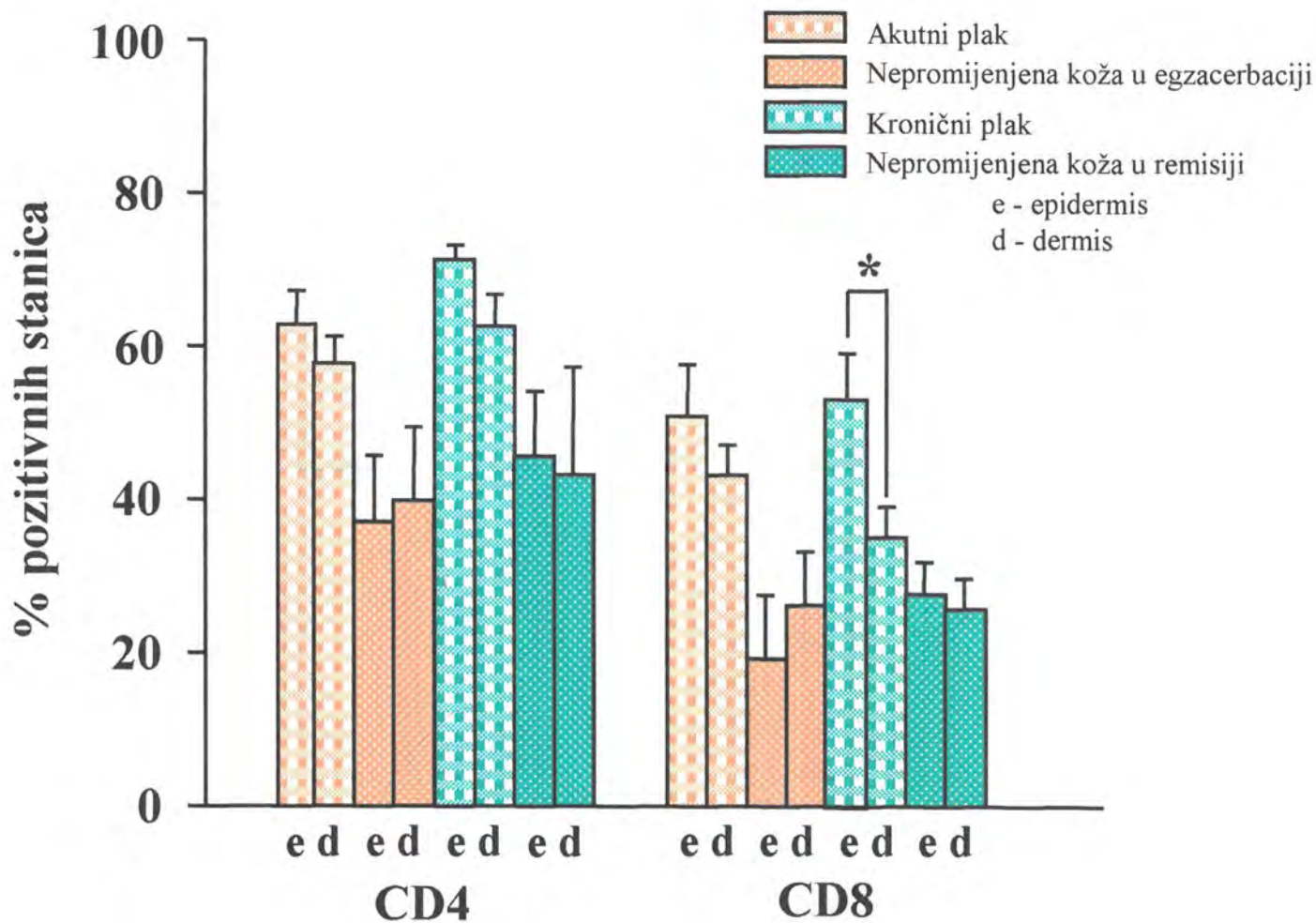


Slika 9. Ispoljavanje limfocitnih biljega u epidermisu kožnih lezija i nepromijenjene kože oboljelih od psorijaze (stat. značajnost: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ )



Slika 10. Ispoljavanje limfocitnih biljega u dermisu kožnih lezija i nepromijenjene kože oboljelih od psorijaze (stat. značajnost: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ )





Slika 11. Usporedba ispoljavanja limfocitnih biljega u epidermisu i dermisu kožnih lezija i nepromijenjene kože oboljelih od psorijaze (stat. značajnost: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ )



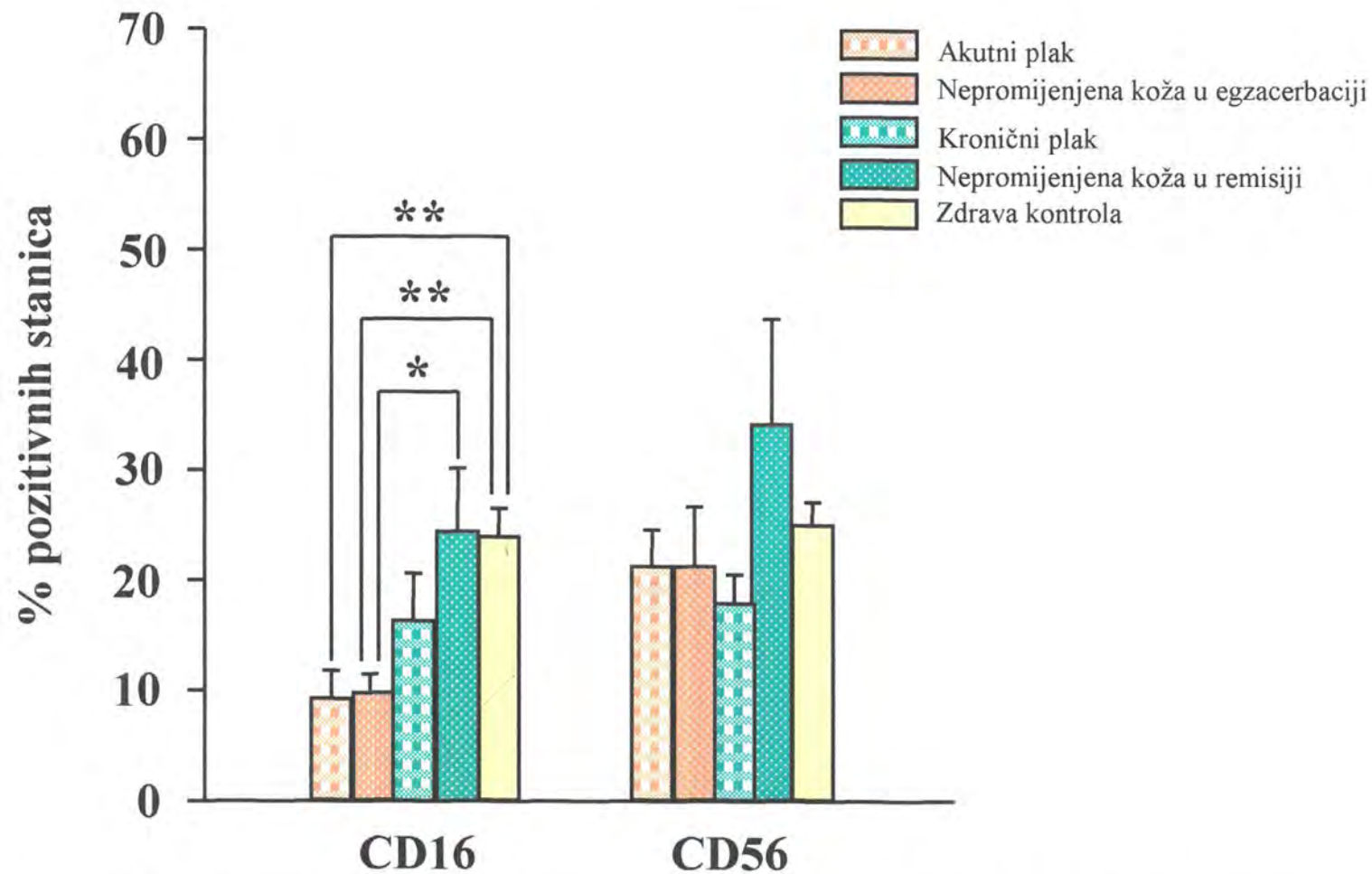
vidimo da je udio ovih stanica u promijenjenoj i nepromijenjenoj koži oboljelih od psorijaze vrlo mali (oko 10-20%)(slika 12) u odnosu na udio limfocita T (40-50%).

Usporedbom ispoljavanja CD16 biljega između akutnog i kroničnog plaka, te nepromijenjene kože bolesnika u egzacerbaciji i remisiji uočili smo da oba plaka, te nepromijenjena koža bolesnika u egzacerbaciji ispoljavaju ovaj biljeg u znatno manjem postotku u odnosu na nepromijenjenu kožu bolesnika u remisiji, te kožu zdravih osoba ( $p < 0,05$  i  $p < 0,01$ ), što se može uočiti ukupno u koži (slika 12), ali i u pojedinim slojevima, epidermisu i dermisu (slike 13 i 14). Nepromijenjena koža bolesnika u remisiji, naročito dermis, ispoljava i vrlo veliki broj CD56+ stanica (41%), ali zbog većeg rasapa rezultata razlike u odnosu na psorijatične plakove i nepromijenjenu kožu bolesnika u egzacerbaciji nisu statistički značajne (slika 14).

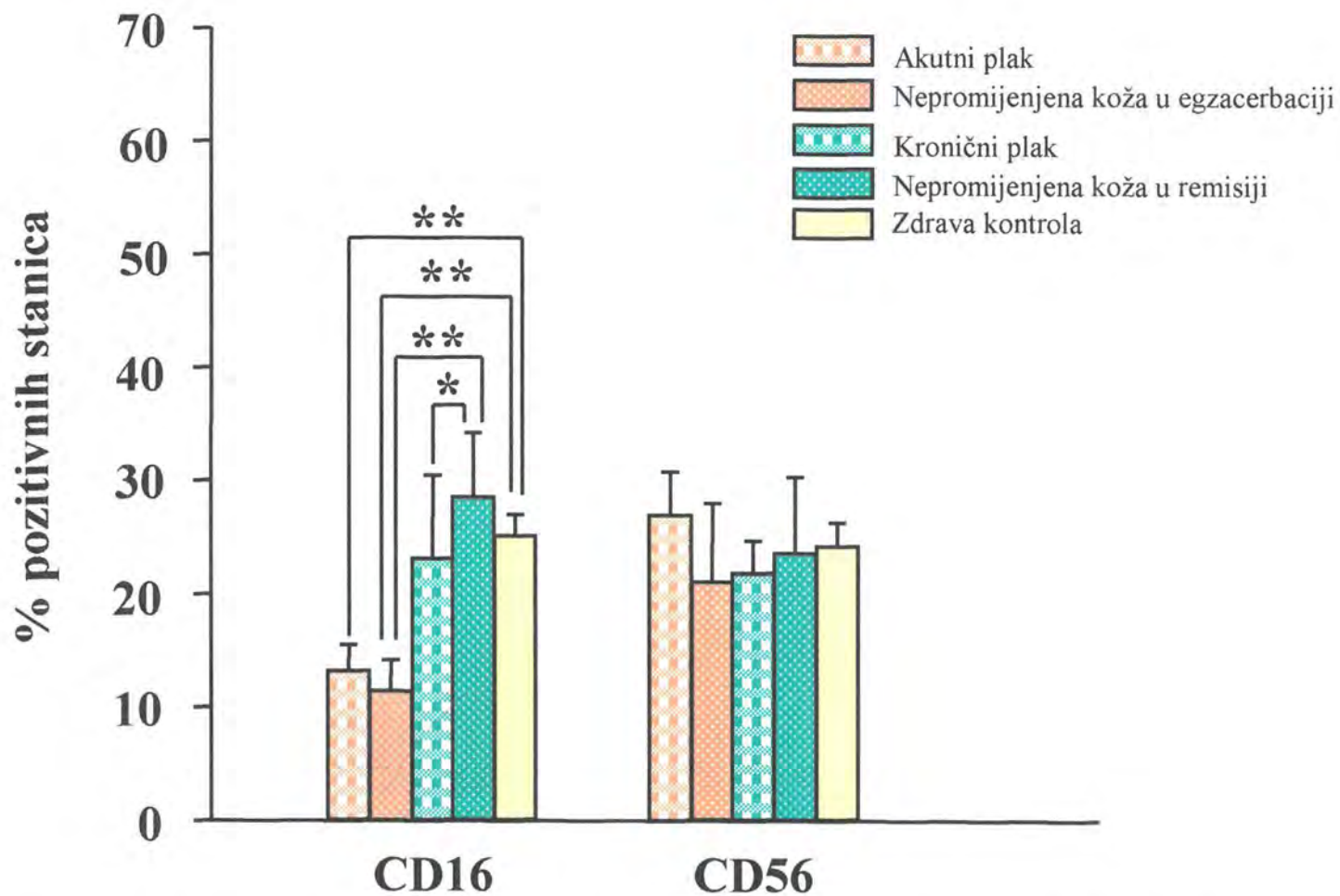
Usporedbom ekspresije pojedinih biljega karakterističnih za NK stanice između epidermisa i dermisa nalazimo tri puta veći postotak CD16 molekule u epidermisu kroničnog psorijatičnog plaka u odnosu na dermis (23% prema 8%;  $p < 0,05$ ), te nešto veći postotak u epidermisu akutnog psorijatičnog plaka (13% prema 9%) u odnosu na dermis (slika 15). Dakle, u epidermisu kroničnog psorijatičnog plaka većina CD56+ stanice su ujedno i CD16+. Nema statistički značajne razlike u ispoljavanju CD56 biljega između epidermisa i dermisa akutnog plaka, kroničnog plaka i nepromijenjene kože (slika 15). Postoji nešto snažnije nakupljanje CD56+ stanica u dermisu nepromijenjene kože bolesnika u remisiji, koje međutim zbog većeg rasapa rezultata nije statistički značajno.

#### *4.2.3. Ispoljavanje perforina u akutnom plaku, kroničnom plaku, te nepromijenjenoj koži psorijatičara u akutizaciji i remisiji bolesti: P<sup>+</sup> stanice se nakupljaju u epidermisu akutnog i kroničnog plaka*

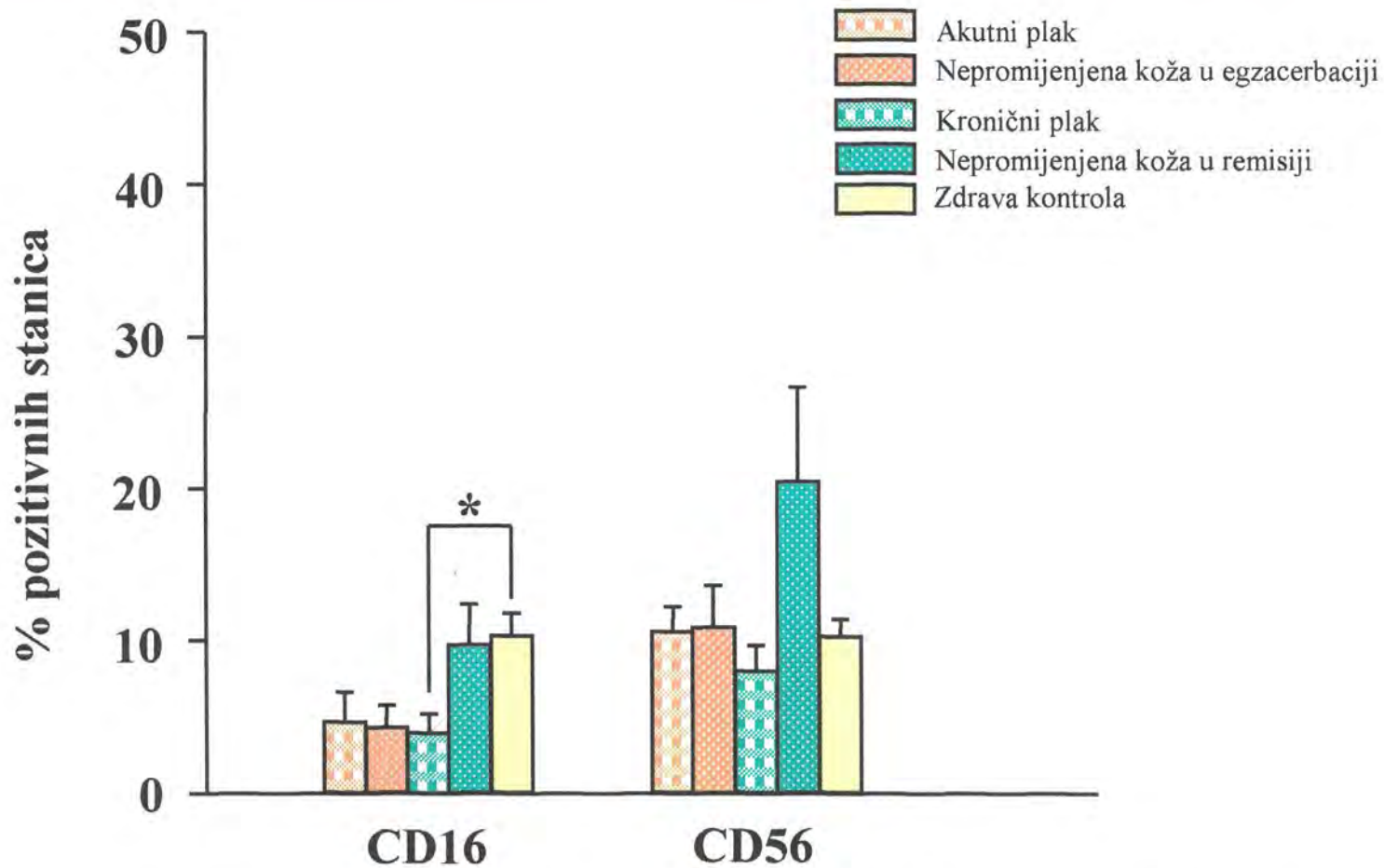
Imunohistološke slike smještaja perforina u akutnom psorijatičnom plaku (slike 16 i 17) govore u prilog velike nazočnosti perforin pozitivnih stanica u hipertrofičnom epidermisu, pretežno u njegovom bazalnom sloju, te također u manjem broju u znatnom i nazubljenom sloju (slike 16 i 17). U dermisu su perforin pozitivne stanice znatno manje zastupljene. Pojedinačne pozitivne stanice nalazimo rijetko, većinom su nazočne u obliku manjih nakupina. Na pojedinim mjestima u imunohistološkim rezovima nalazimo opsežnije infiltrate upalnih stanica, velikim dijelom perforin pozitivnih, koje



Slika 12. Ispoljavanje biljega NK stanica ukupno u epidermisu i dermisu kožnih lezija i nepromijenjene kože oboljelih od psorijaze (stat. značajnost: \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001)

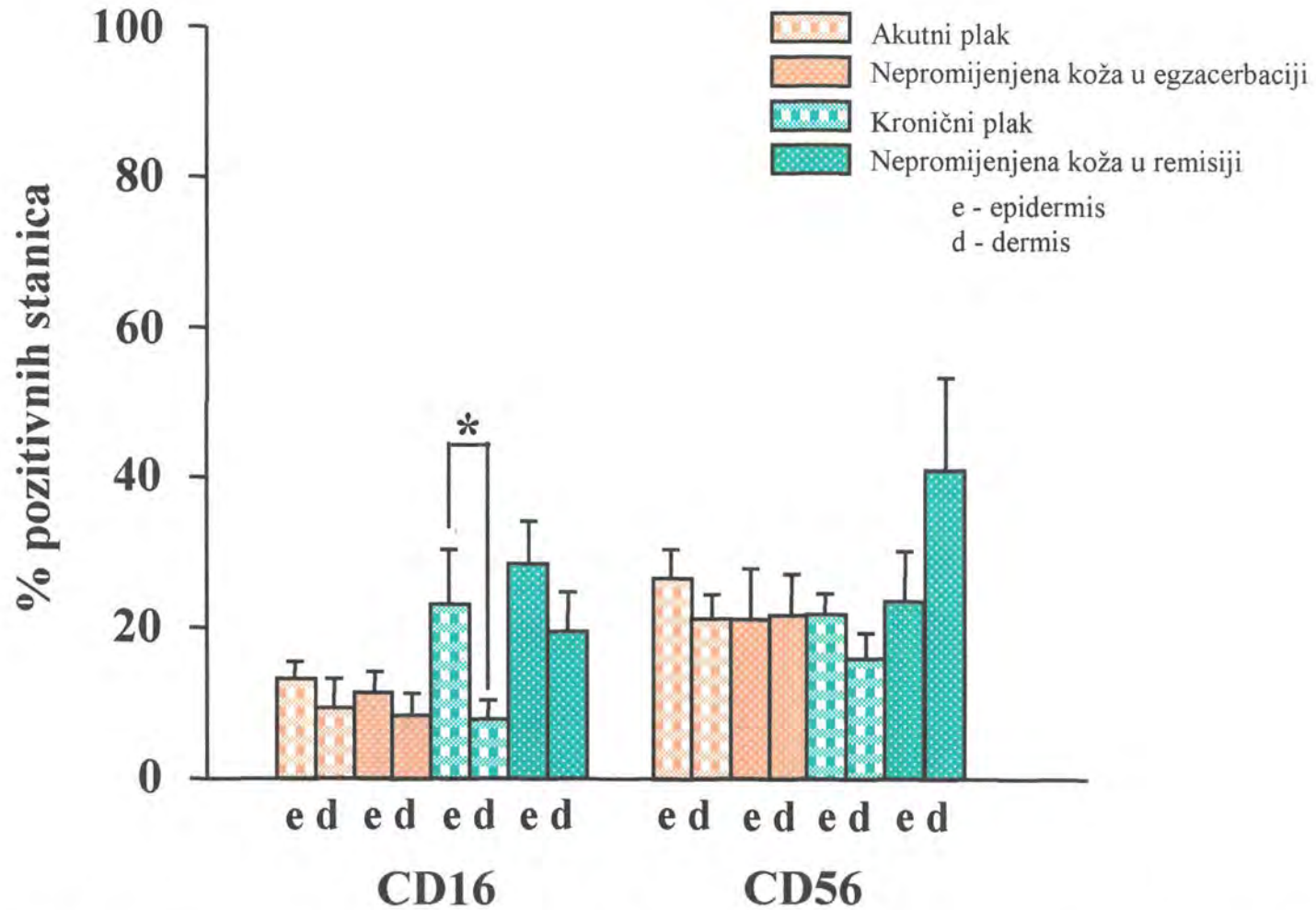


Slika 13. Ispoljavanje biljega NK stanica u epidermisu kožnih lezija i nepromijenjene kože oboljelih od psorijaze (stat. značajnost: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ )



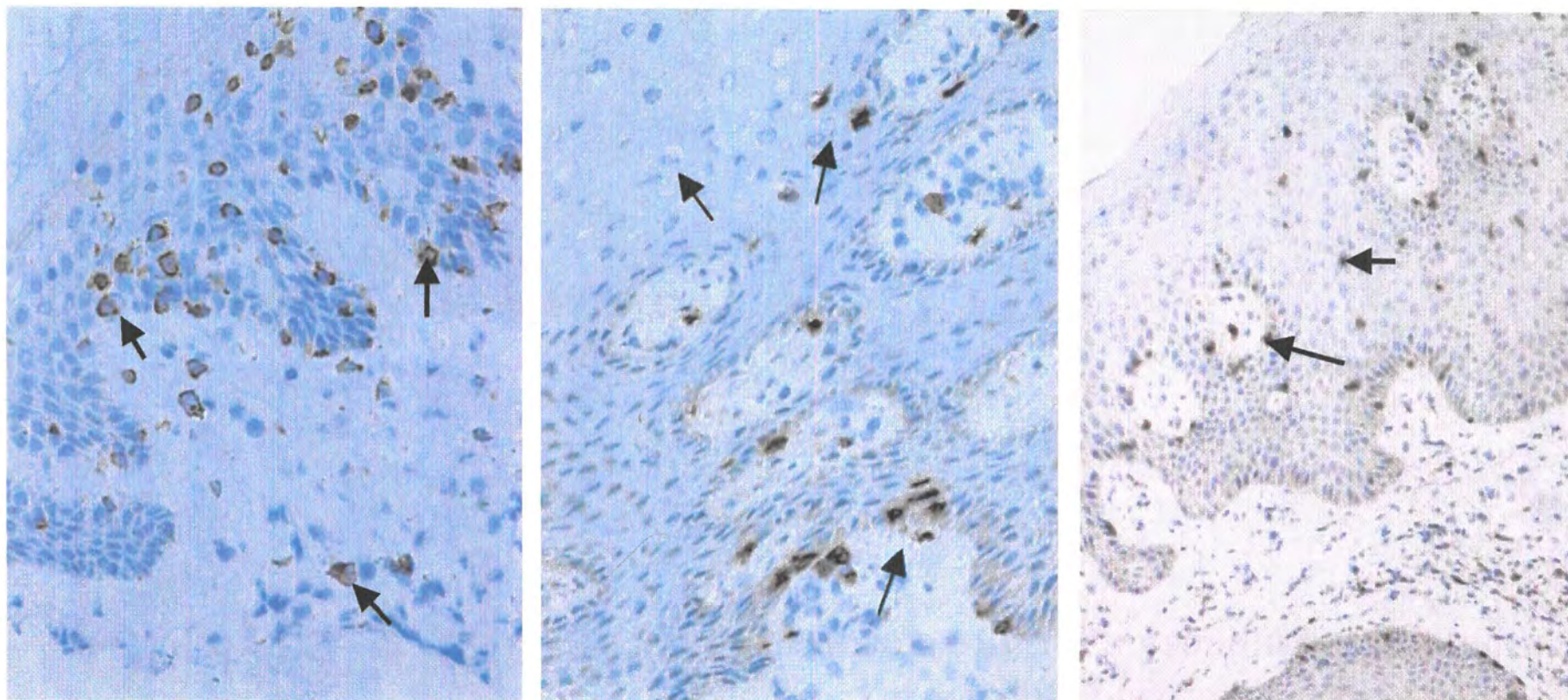
Slika 14. Ispoljavanje biljega NK stanica u dermisu kožnih lezija i nepromijenjene kože oboljelih od psorijaze (stat. značajnost: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ )





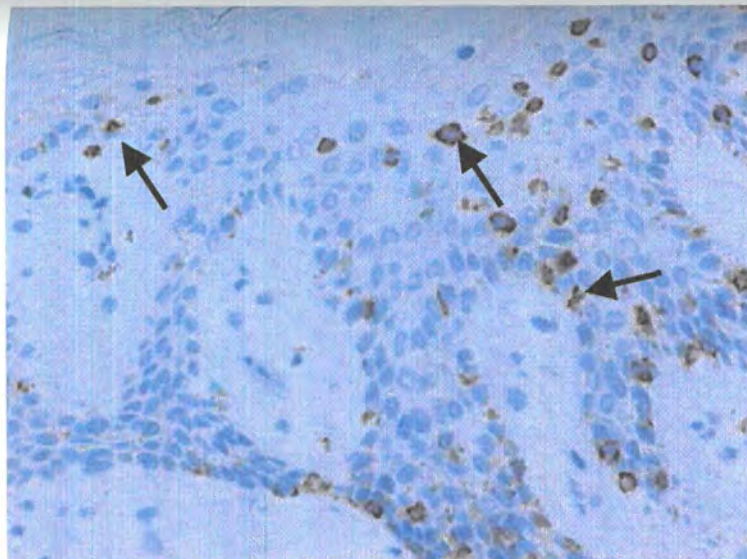
Slika 15. Usporedba ispoljavanja biljega NK stanica u epidermisu i dermisu kožnih lezija i nepromijenjene kože oboljelih od psorijaze (stat. značajnost: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ )



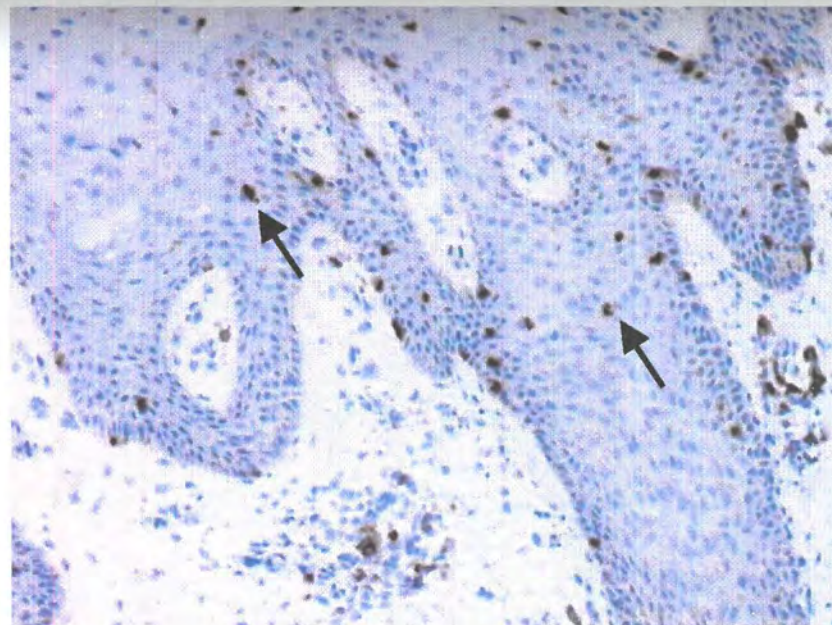


Slika 16. P+ stanice u akutnom psorijatičnom plaku – povećanje x200  
(pozitivne stanice su označene strelicama)

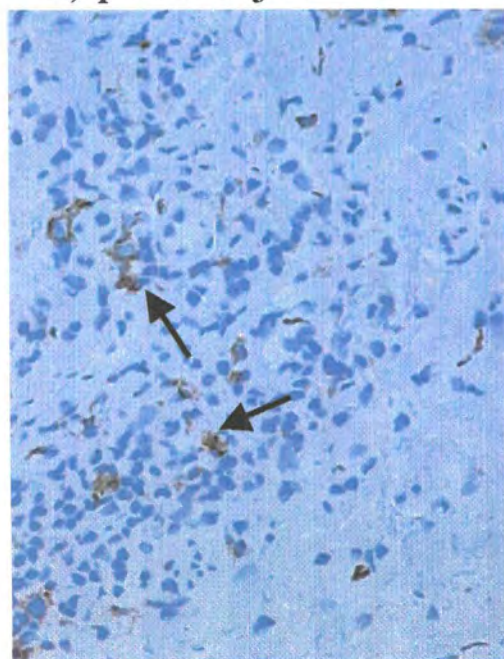




a) povećanje x200



b) povećanje x200



c) povećanje x400

**Slika 17. P+ stanice u akutnom psorijatičnom plaku.**  
Mnogo pojedinačnih pozitivnih stanica u epidermisu (a i b), te pozitivne stanice u infiltratima dermisa (c)

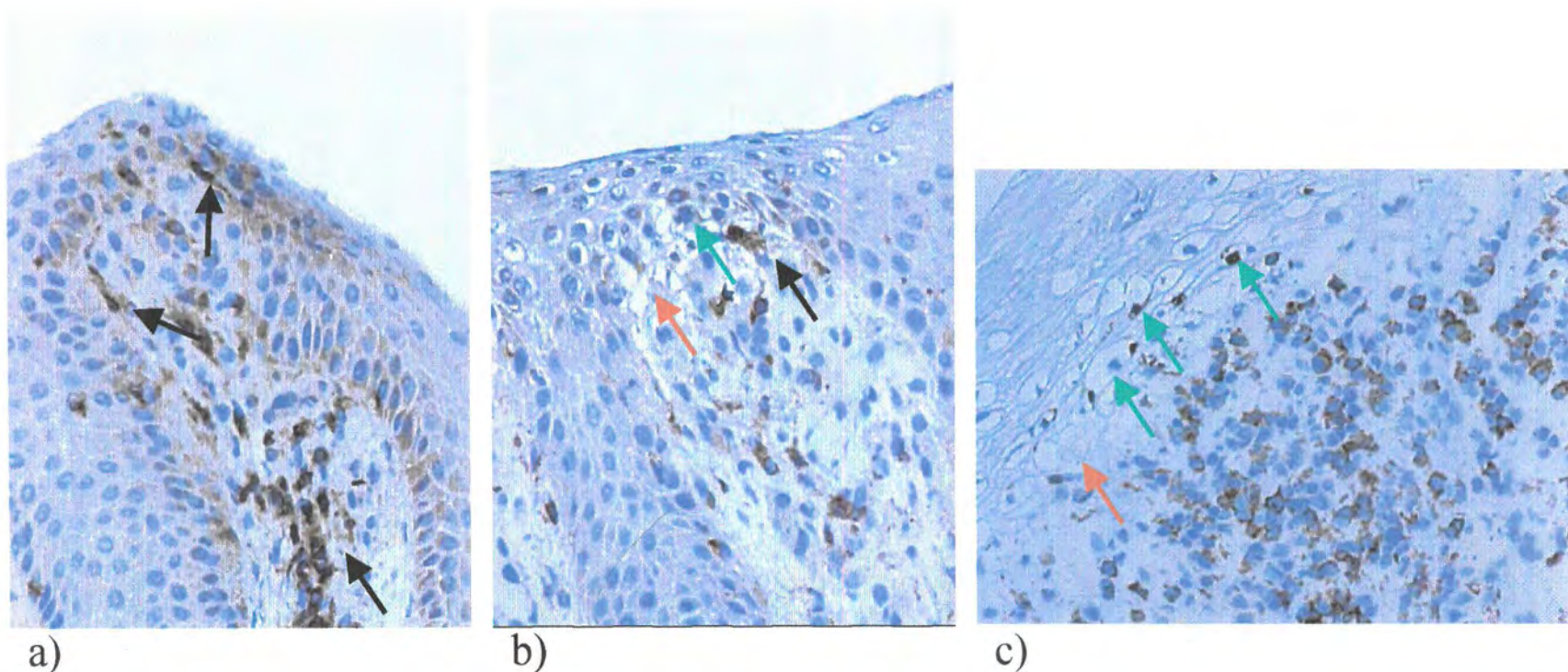
iz dermisa prodiru u epidermis izazivajući likvefakcijsku degeneraciju bazalnog sloja epidermisa (slika 18). Preostali keratinociti su hidropski promijenjeni sa vakuolarnom citoplazmom i sitnim, postranično smještenim jezgrama (slika 18). Sličan primjer infiltracije epidermisa uz likvefakcijsku degeneraciju i hidropsku promjenu bazalnih keratinocita zamijetili smo i bojanjem akutnog plaka na CD8 biljeg. Hidropska promjena znači srednje teški, reverzibilni oblik oštećenja stanice.

Imunohistokemijom kroničnog psorijatičnog plaka uočava se, kao i u akutnom plaku, vrlo velika nazočnost perforina u odnosu na nepromijenjenu i zdravu kožu (slike 19, 20). U kroničnom plaku perforin pozitivne stanice su većinom smještene u bazalnom sloju epidermisa. U dermisu ih ima znatno manje i to većinom u manjim infiltratima. Mjestimično se zamjećuje prodor ovih stanica u epidermis, ali bez likvefakcijske degeneracije i hidropske promjene epidermisa (slika 19). Brojanjem pozitivnih stanica i izražavanjem u obliku postotka od ukupnog broja mononuklearnih stanica dobili smo slijedeće rezultate, koji podupiru nalaze uočene na imunohistološkim slikama.

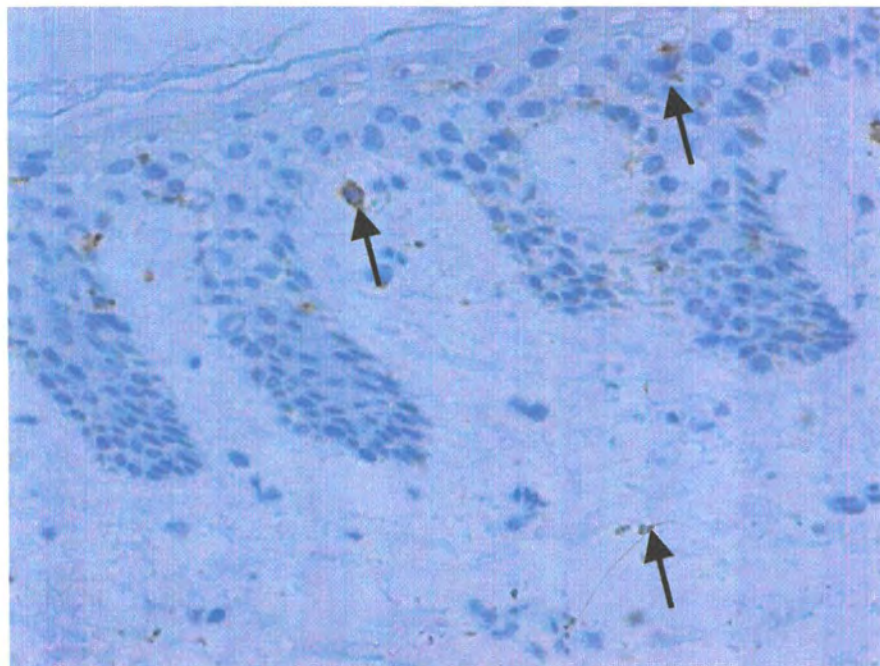
Rezultati ispoljavanja perforinske molekule u psorijatičnom plaku i nepromijenjenoj koži oboljelih od psorijaze govore o znatno većoj nazočnosti ove molekule u oba plaka u usporedbi s nepromijenjenom i zdravom kožom (slike 21 i 22), što je naročito uočljivo u epidermisu (35% u plakovima prema 10-15% u nepromijenjenoj i zdravoj koži;  $p < 0,05$  i  $p < 0,01$ ) (slika 22). U dermisu je stanje nešto drugačije (slika 23). Nazočnost P+ stanica je podjednaka u promijenjenoj i nepromijenjenoj koži kako za akutni stadij tako i za remisiju (slika 23). Međutim, uspoređujući međusobno dermis akutnog i kroničnog plaka postoji značajna razlika u ispoljavanju citolitičke molekule perforina u dermisu akutnog psorijatičnog plaka (7%) u usporedbi s dermisom kroničnog psorijatičnog plaka (13%). Naime, perforin pozitivne stanice su nešto snažnije zastupljene u dermisu kroničnog plaka ( $p < 0,05$ ) (slika 23).

Usporedbom nazočnosti perforinske molekule u epidermisu u odnosu na dermis, zanimljiv je nalaz nekoliko puta veće nazočnosti ove citolitične molekule u epidermisu kako akutnog plaka (35%) tako i kroničnog plaka (36%) u odnosu na dermis (7% akutni plak;  $p < 0,001$  i 13% kronični plak;  $p < 0,001$ ) (slika 24). Ovaj podatak kao i podatak o dvostruko većoj nazočnosti CD8 molekule u epidermisu psorijatičnog plaka daje naslutiti epidermalno nakupljanje citotoksičnih CD8+ stanica bogatih perforinom i njihovu moguću ulogu u patogenezi psorijaze.

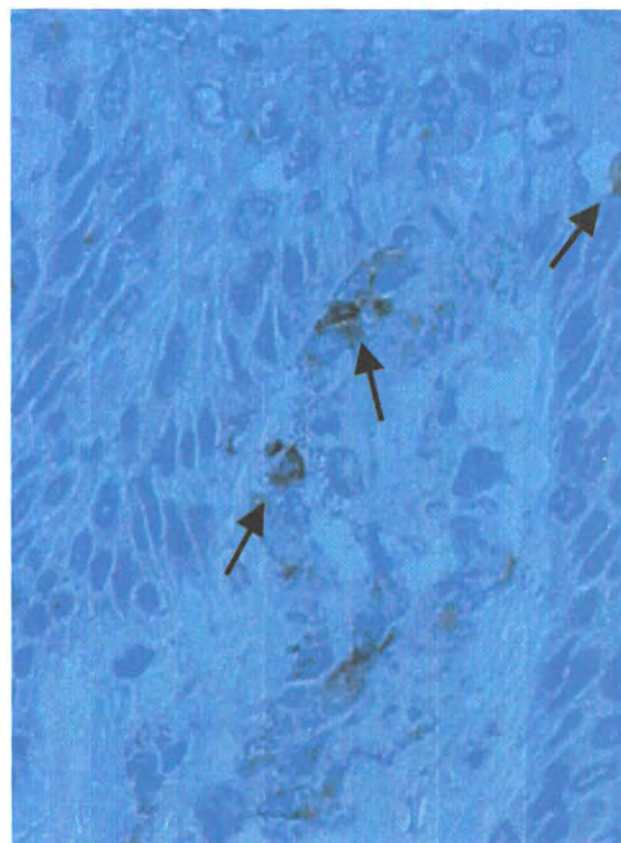




**Slika 18. Prodor P+ stanica iz dermisa u epidermis (crne strelice) (a) uz likvefakcijsku degeneraciju bazalnog sloja (crvene strelice) i hidropsku promjenu keratinocita (zelene strelice) (b i c) (povećanje x200)**



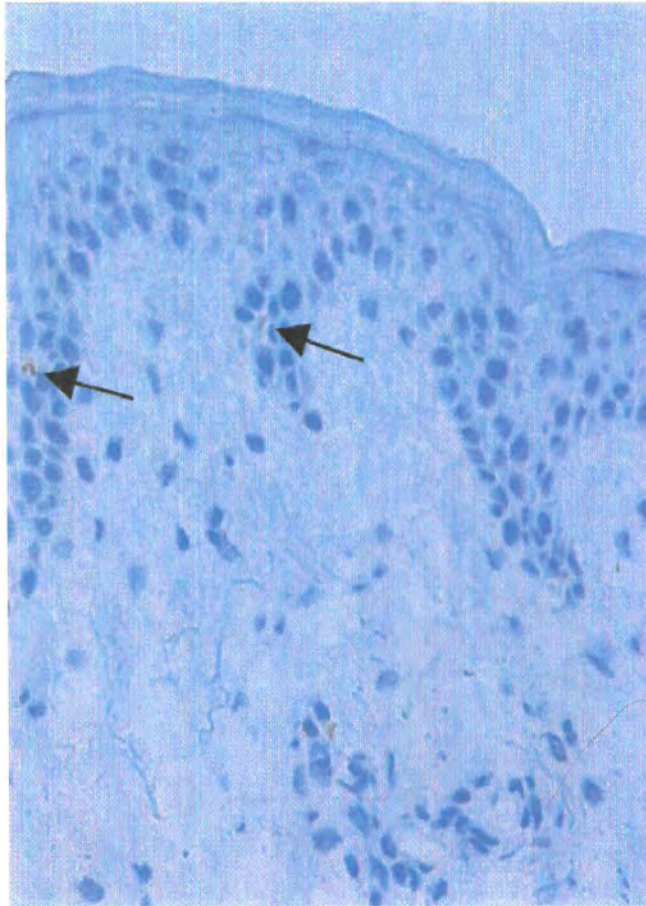
a) povećanje x200



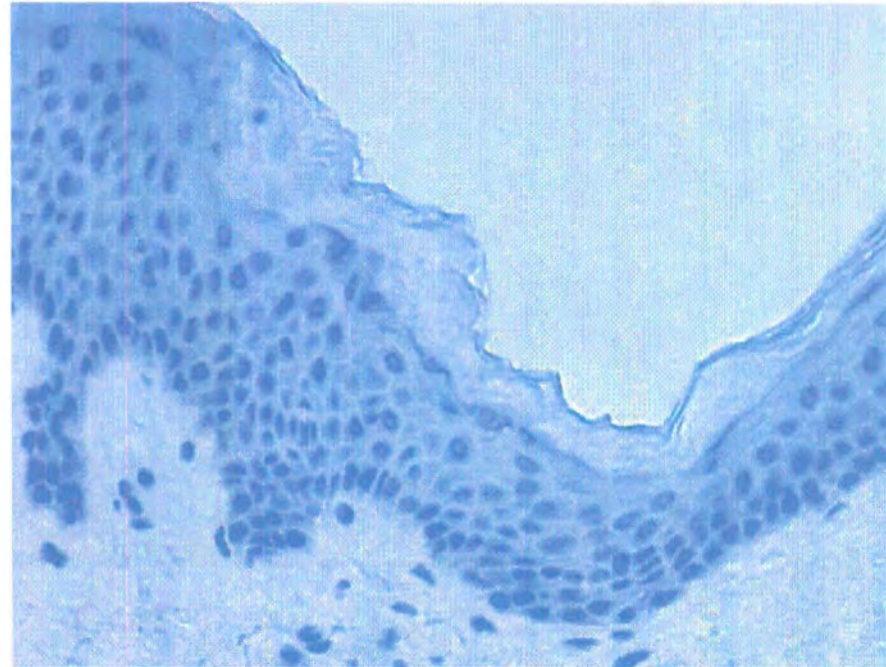
b) povećanje x400

Slika 19. **P+ stanice u kroničnom psorijatičnom plaku.** Mnogo pojedinačnih pozitivnih stanica u epidermisu i nešto pozitivnih stanica u dermisu (a), te pozitivne stanice u papilama dermisa s prodorom u epidermis (b)



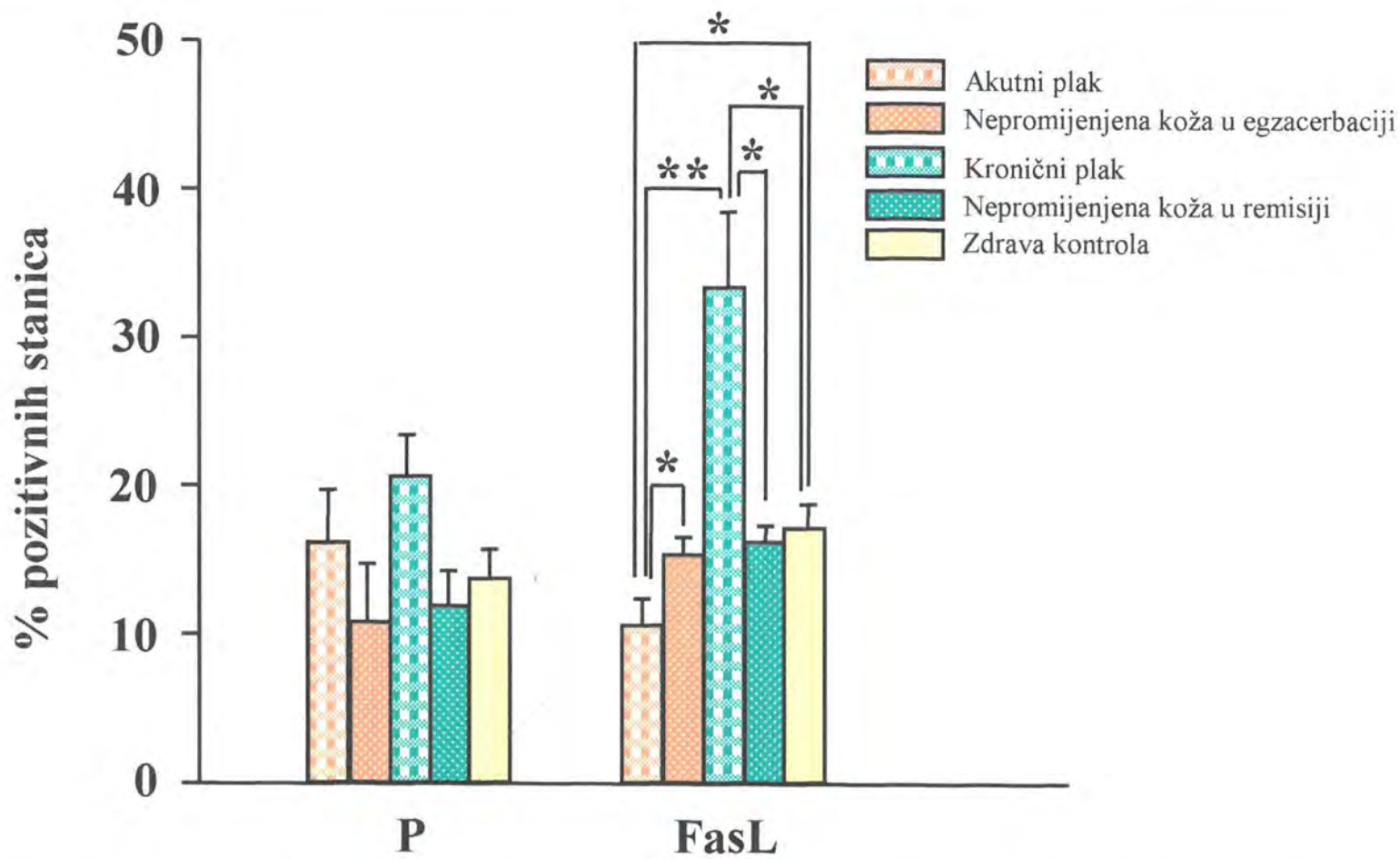


a) povećanje x200

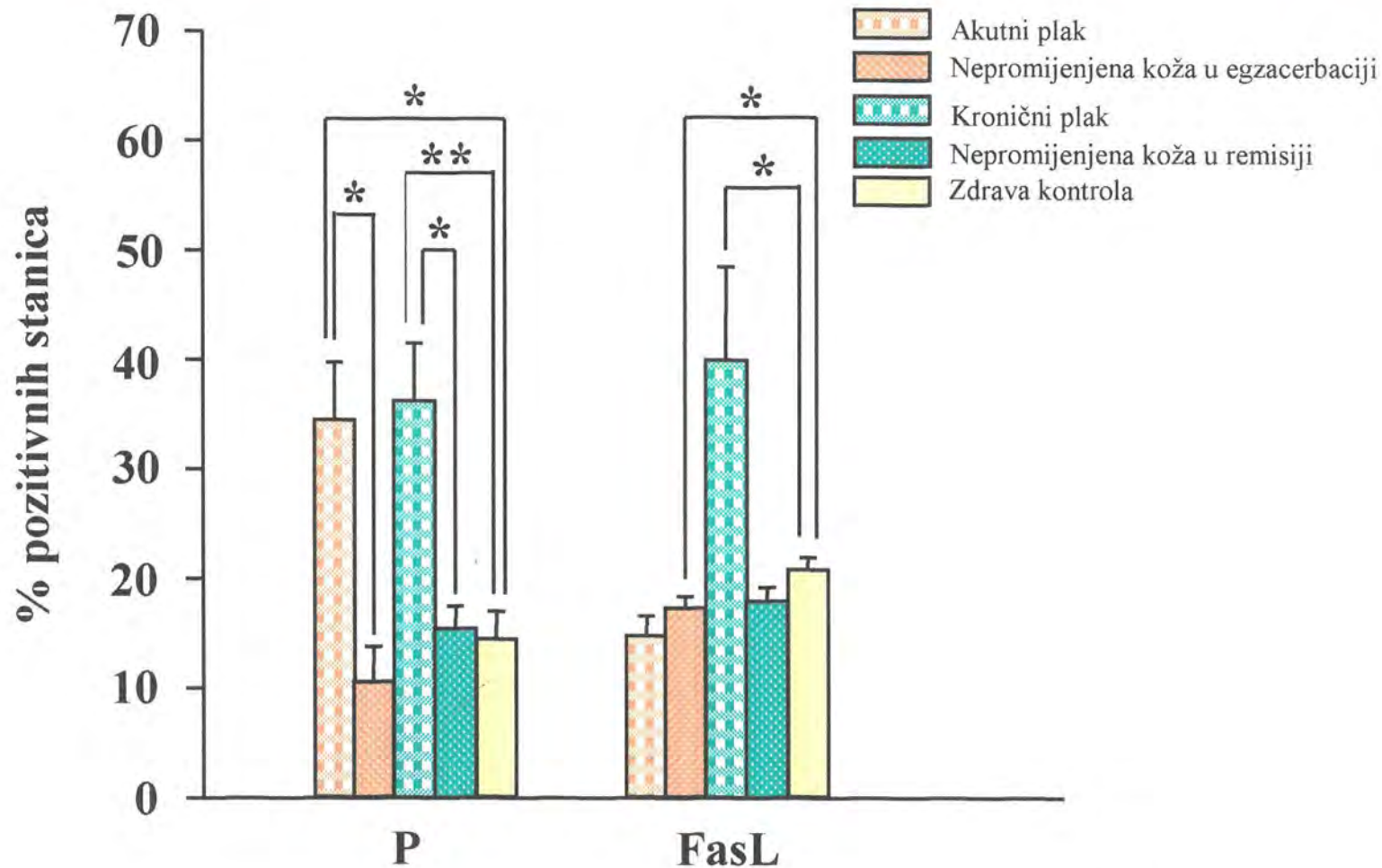


b) povećanje x200

Slika 20. **P+** stanice u nepromijenjenoj koži psorijatičara (a) i zdravoj koži (b).  
Rijetke perforin pozitivne stanice označene su strelicama.

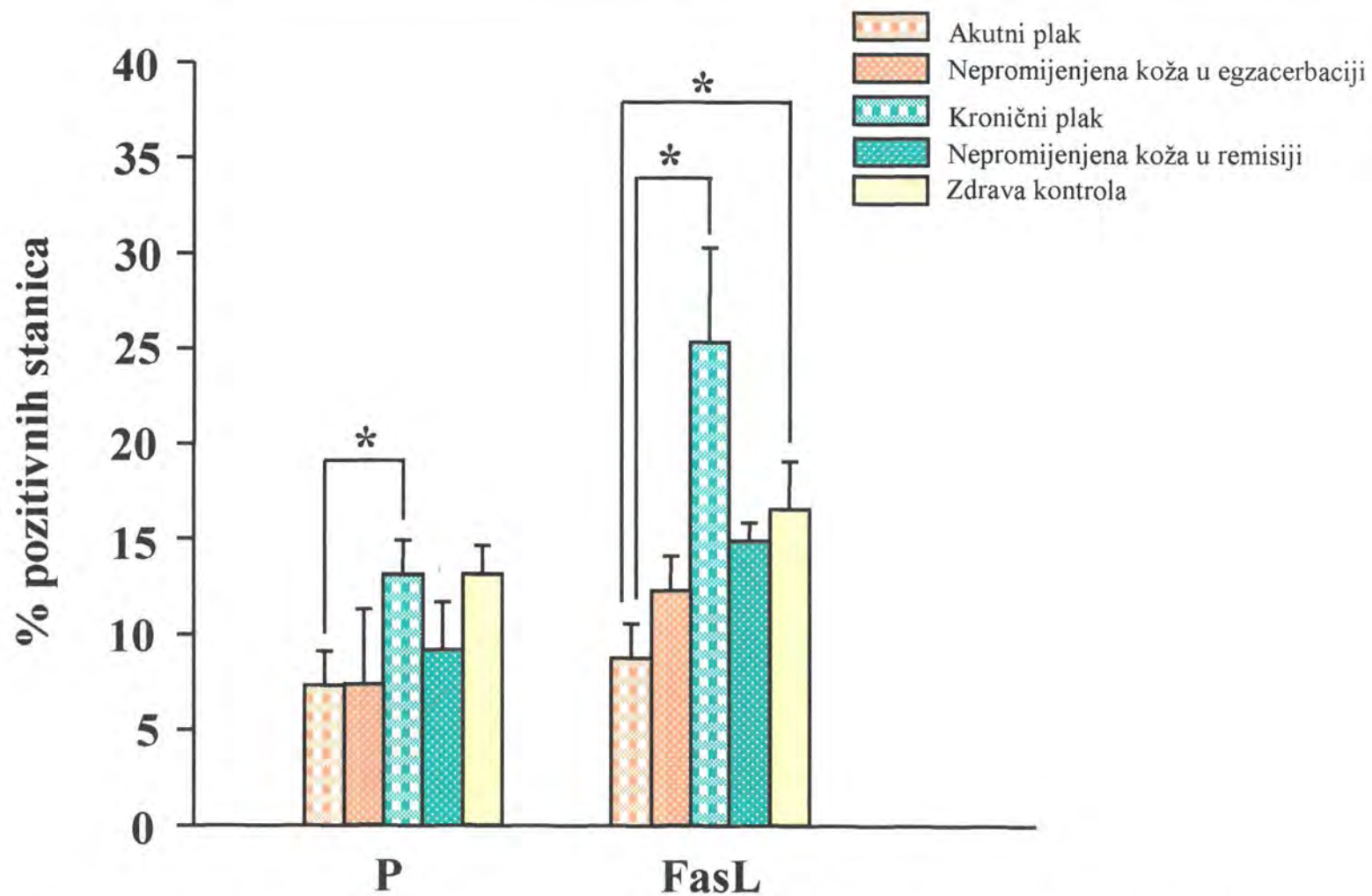


Slika 21. Ispoljavanje citotoksičnih biljega ukupno u epidermisu i dermisu kožnih lezija i nepromijenjene kože oboljelih od psorijaze (stat. značajnost: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ )

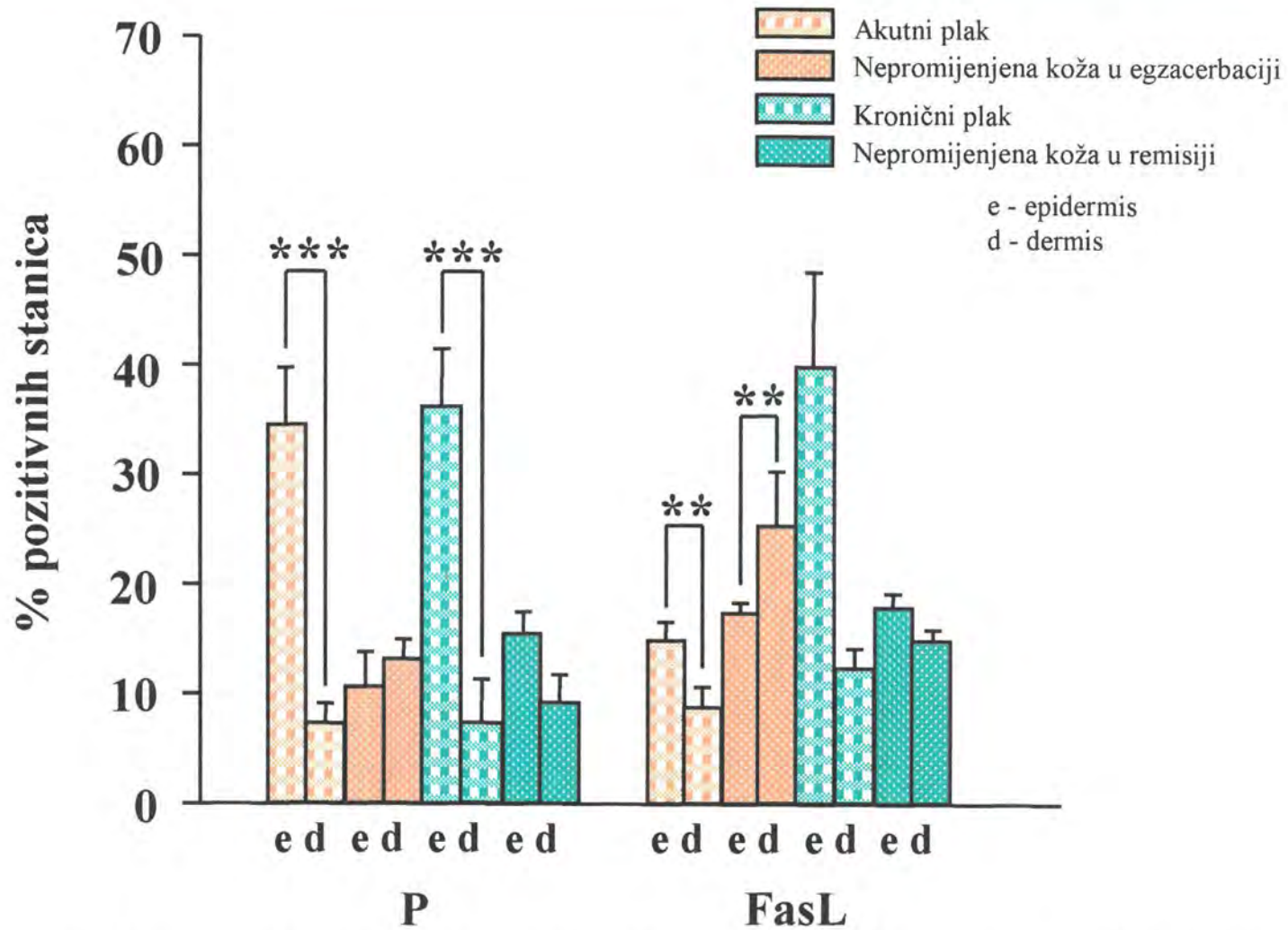


Slika 22. Ispoljavanje citotoksičnih biljega u epidermisu kožnih lezija i nepromijenjene kože oboljelih od psorijaze (stat. značajnost: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ )





Slika 23. Ispoljavanje citotoksičnih biljega u dermisu kožnih lezija i nepromijenjene kože oboljelih od psorijaze (stat. značajnost: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ )



Slika 24. Usporedba ispoljavanja citotoksičnih biljega u epidermisu i dermisu kožnih lezija i nepromijenjene kože oboljelih od psorijaze (stat. značajnost: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ )



#### 4.2.4. Ispoljavanje FasL molekule u akutnom plaku, kroničnom plaku, te nepromijenjenoj koži psorijatičara u akutizaciji i remisiji bolesti: FasL+ stanice se nakupljaju u epidermisu akutnog i kroničnog plaka

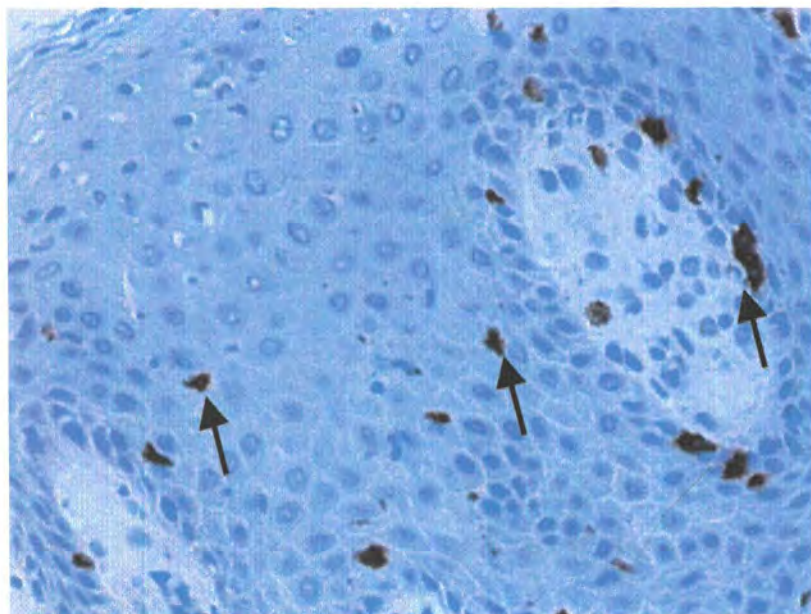
Na imunohistološkim slikama oba psorijatična plaka uočavamo citolitičku FasL molekulu većinom u bazalnom i zrnatom sloju epidermisa, a manje u infiltratima u dermisu (slike 25 i 26). Za razliku od perforinske molekule, na pojedinim mjestima u akutnom plaku gdje upalne stanice iz dermisa prodiru u epidermis, uz znakove likvefakcijske nekroze epidermisa i hidropske promjene keratinocita nismo našli FasL pozitivnih stanica.

Međutim, imunohistokemijska analiza psorijatičnog plaka ukazuje na veliku razliku u ispoljavanju FasL molekule između akutnog i kroničnog psorijatičnog plaka (slike 21,22,23). Ova molekula je tri puta više nazočna u kroničnom psorijatičnom plaku (33%) u odnosu na akutni (11%) ( $p < 0,01$ ), što se uočava na imunohistološkim slikama (slike 25 i 26), te vidi kvantitativno u postotku od ukupnog broja mononuklearnih stanica (slika 21, 22 i 23). Ispoljavanje FasL molekule je snažno izraženo u oba sloja kože, tj. u epidermisu i dermisu (slike 22 i 23).

Usporedbom ispoljavanja FasL biljega između epidermisa i dermisa uočava se znatnije nakupljanje ove molekule u epidermisu kako u akutizaciji bolesti ( $p < 0,01$ ), tako i u remisiji bolesti, ali ovo potonje zbog rasapa rezultata nije statistički značajno (slika 24).

#### 4.2.5. Ispoljavanje biljega dendritičnih stanica CD1a, CD80 i CD83 u psorijatičnom plaku

Dendritičke stanice spadaju u porodicu profesionalnih antigen predočnih stanica. Međutim, samo su zrele dendritičke stanice sposobne započeti i održavati antigen specifični T-limfocitni imuni odgovor. U dodiru sa stranim antigenom nezrele dendritičke stanice migriraju iz kože u periferne limfne čvorove, gdje sazrijevaju nizom funkcionalnih i fenotipskih promjena, izražavaju kostimulacijske molekule i počinju lučiti Th-1 citokine.



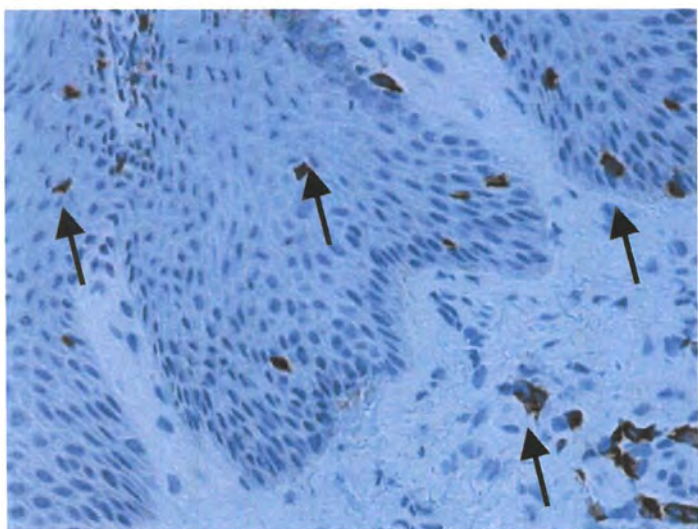
a) povećanje x400



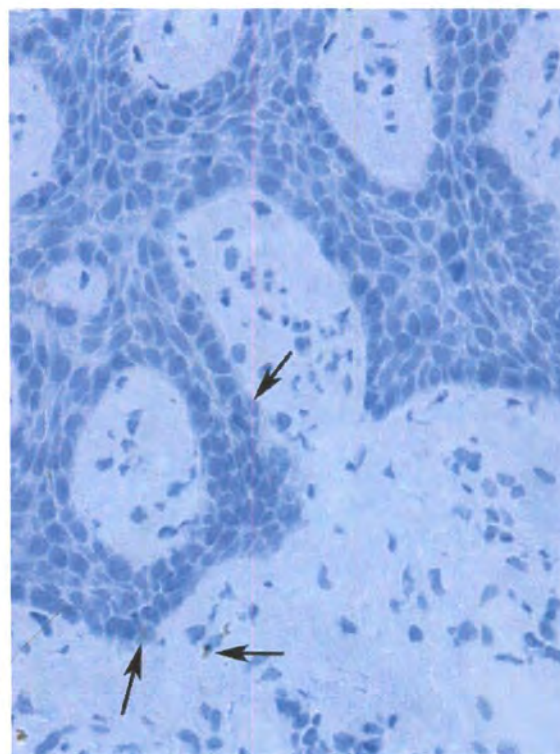
b) povećanje x200

Slika 25. **FasL+ stanice u akutnom psorijatičnom plaku.** Guste nakupine pozitivnih stanica u epidermisu (a i b), te pozitivne stanice u dermisu (b)

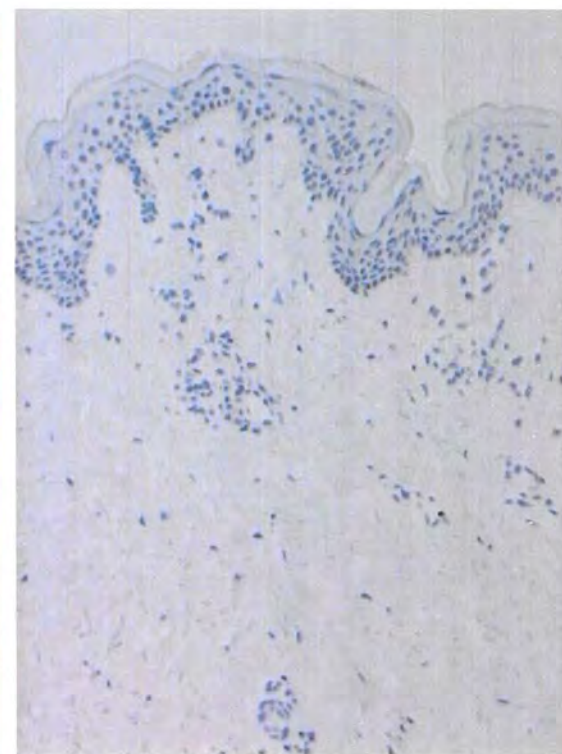




a) povećanje x200



b) povećanje x200



c) povećanje x100

Slika 26. **FasL+ stanice u kroničnom psorijatičnom plaku (a), nepromijenjenoj (b) i zdravoj koži (c).** Guste nakupine pozitivnih stanica u epidermisu i dermisu kroničnog plaka (a).

Stoga smo nastojali imunohistološki utvrditi nazočnost i smještaj kako nezrelih antigen predočnih stanica (obilježenih CD1a biljegom), te zrelih antigen predočnih stanica (obilježenih CD80 i CD83 biljezima).

Na slici 27 vidimo da su CD1a pozitivne stanice u velikom broju prisutne u epidermisu akutnog psorijatičnog plaka, za razliku od CD83 pozitivnih stanica, koje su u epidermisu prisutne u vrlo malom broju i to najviše uz epidermodermalnu granicu. U infiltratima dermisa nalazimo u velikom broju kako CD1a i tako i CD83 pozitivne stanice. CD80 pozitivnih stanica u preparatima psorijatičnog plaka gotovo da i nismo našli, niti u epidermisu, niti u dermisu.

#### **4.3. Kretanje limfocitnih subpopulacija i ispoljavanje perforinske molekule u perifernoj krvi oboljelih od lihen planusa**

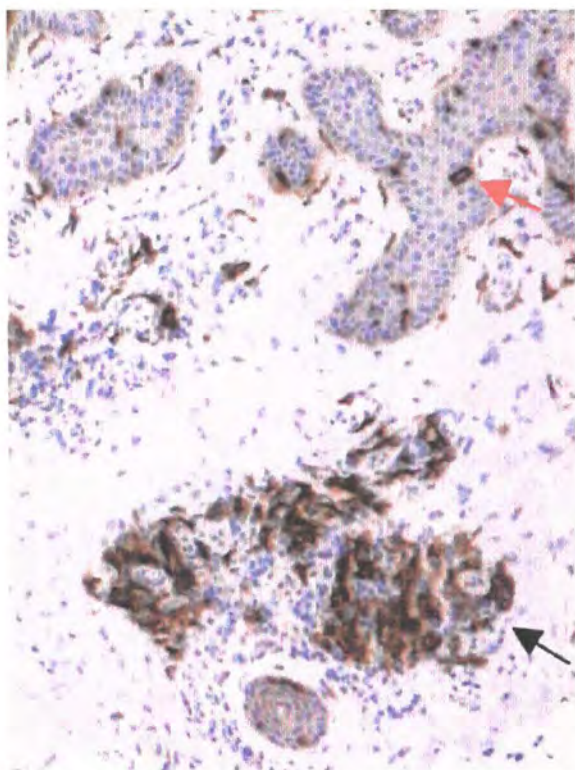
Kretanje limfocitnih subpopulacija i ispoljavanje perforinske molekule promatrali smo i u perifernoj krvi oboljelih od još jedne kožne autoimune bolesti, tj. lihen planusa.

##### *4.3.1. Promjene fenotipskih karakteristika limfocita periferne krvi (LPK), te ispoljavanje perforinske molekule u bolesnika s lihen planusom tijekom akutne faze i remisije: Veći postotak limfocita T u akutnom stadiju bolesti*

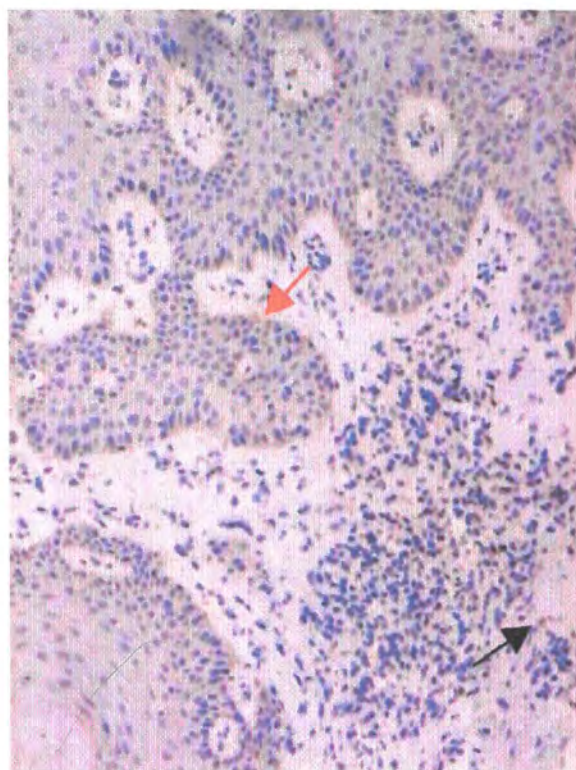
Analizirajući fenotipske karakteristike LPK tijekom akutnog stadija lihen planusa i njegove remisije, te uspoređujući s nalazima zdrave populacije podudarne s ispitivanom u dobi i spolu, uočili smo slijedeće razlike.

U akutnom stadiju lihen planusa postoji snažna zastupljenost CD3 biljega na LPK (oko 71%), dok je u remisiji taj postotak nešto manji. Još je niži postotak zastupljenosti tog biljega na LPK zdravih osoba, što je statistički značajno manje od akutne faze ( $p < 0,05$ ) (slika 28). Nema razlike u ispoljavanju limfocitnih subpopulacija CD4+ i CD8+ limfocita T u LPK akutnog stadija lihen planusa u usporedbi s remisijom, te kod zdrave populacije. Također nismo zamijetili značajniju razliku u ispoljavanju biljega NK stanica (CD16+ i CD56+ stanica), te ukupnog postotka perforin pozitivnih stanica u LPK akutnog stadija, remisije i kod zdrave populacije (slika 28).

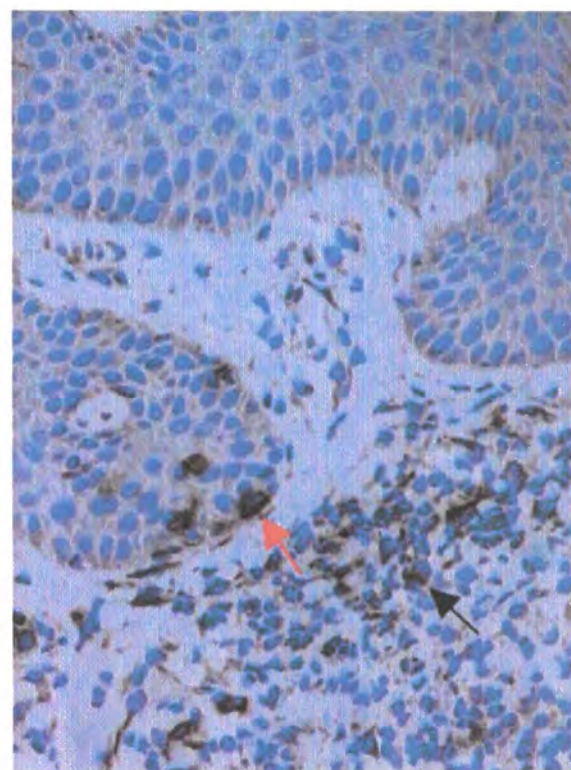




**CD1a+ stanice**



**CD80+ stanice**

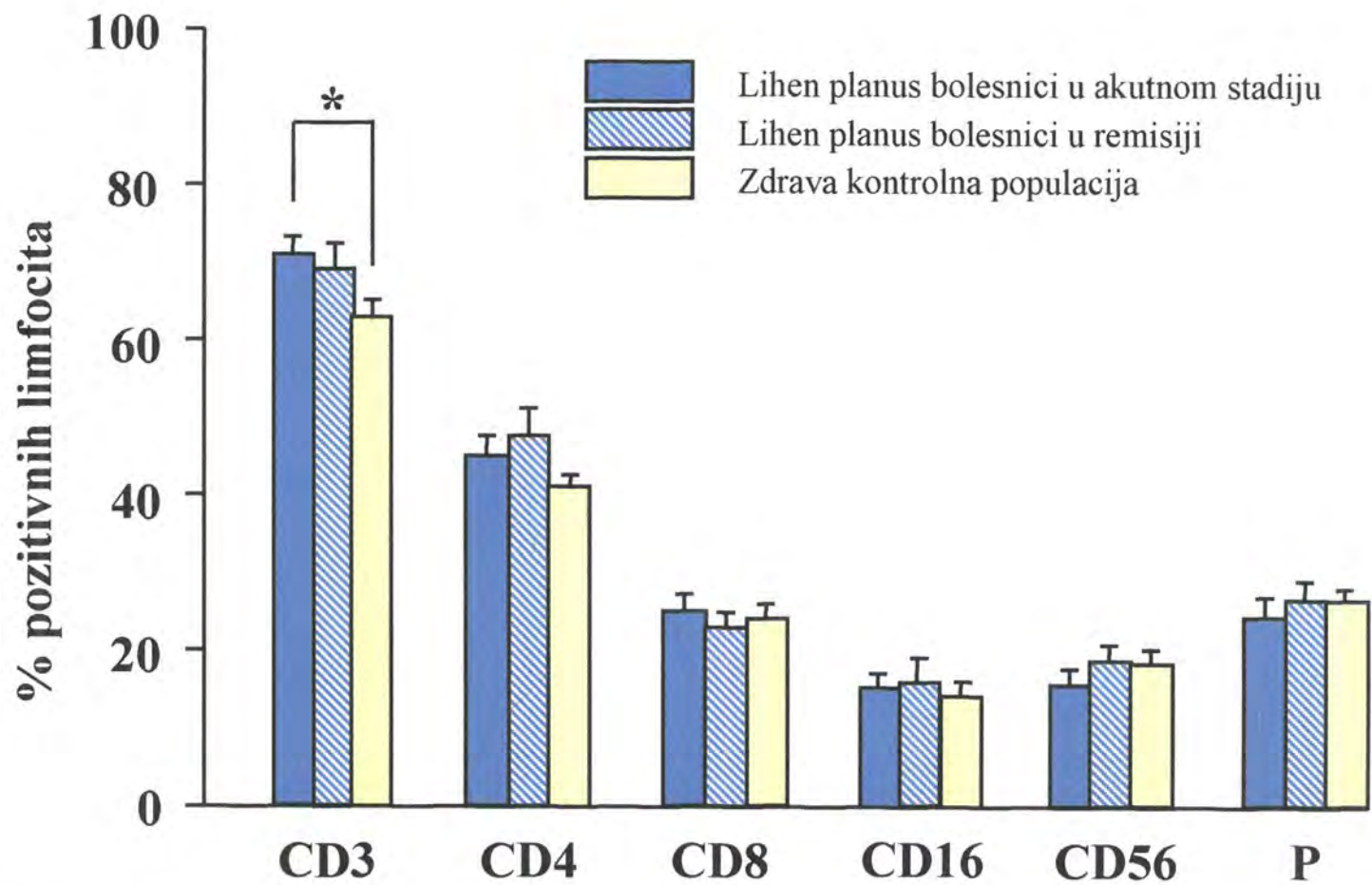


**CD83+ stanice**

**Slika 27. Biljezi antigen predočnih stanica u akutnom psorijatičnom plaku.**

Mnoštvo CD1a+ i CD83+ stanica u epidermisu (crvene strelice) i dermisu (crne strelice) psorijatičnog plaka, te znatno manje CD80+ stanica.

(povećanje x200)



Slika 28. Fenotipske karakteristike limfocita periferne krvi (LPK) u oboljelih od lihen planusa (stupanj statističke značajnosti: \* $p < 0,05$ )



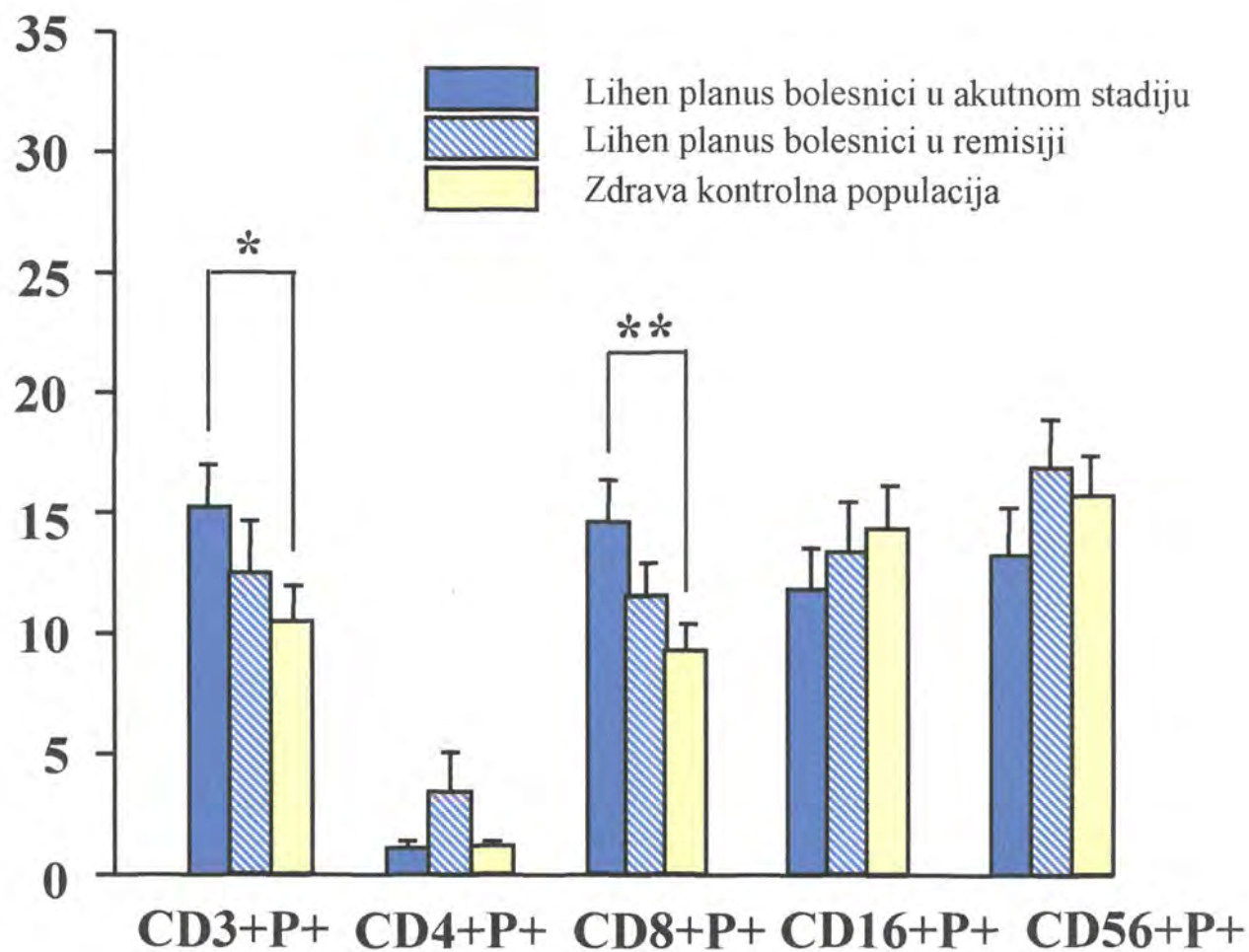
*4.3.2. Usporedno ispoljavanje (koekspresija) perforinske molekule i površinskih biljega na citotoksičnim limfocitima T i NK stanicama periferne krvi: Porast broja citotoksičnih CD8+P+ limfocita T u akutnom stadiju psorijaze*

Metodom dvostrukog obilježavanja odredili smo usporedno ispoljavanje perforina i površinskih biljega u citotoksičnim limfocitima T i NK stanicama, te tako dobili uvid u rasprostranjenost perforinske ekspresije (slike 29, 29a i 29b).

Postotak CD3+P+ stanica u akutnom stadiju lihen planusa iznosi 15%, što je nešto više nego u remisiji (13%), ali zato značajno više nego kod zdrave populacije (11%;  $p < 0,05$ ). Kao i kod psorijaze tu razliku stvara prvenstveno CD8+P+ populacija stanica, koja je značajno više prisutna u LPK akutnog stadija bolesti (15%) nego u remisiji (12%), te kod zdravih osoba (9%;  $p < 0,01$ ). S druge strane, CD4+P+ populacija limfocita T je zastupljena u malom postotku u LPK oboljelih od lihen planusa i to u remisiji nešto više nego u akutnom stadiju i kod zdrave populacije. Dvostrukopozitivne NK stanice su najmanje zastupljene u akutnoj fazi bolesti u odnosu na remisiju i zdrave osobe, ali razlika nije statistički značajna (slika 29).

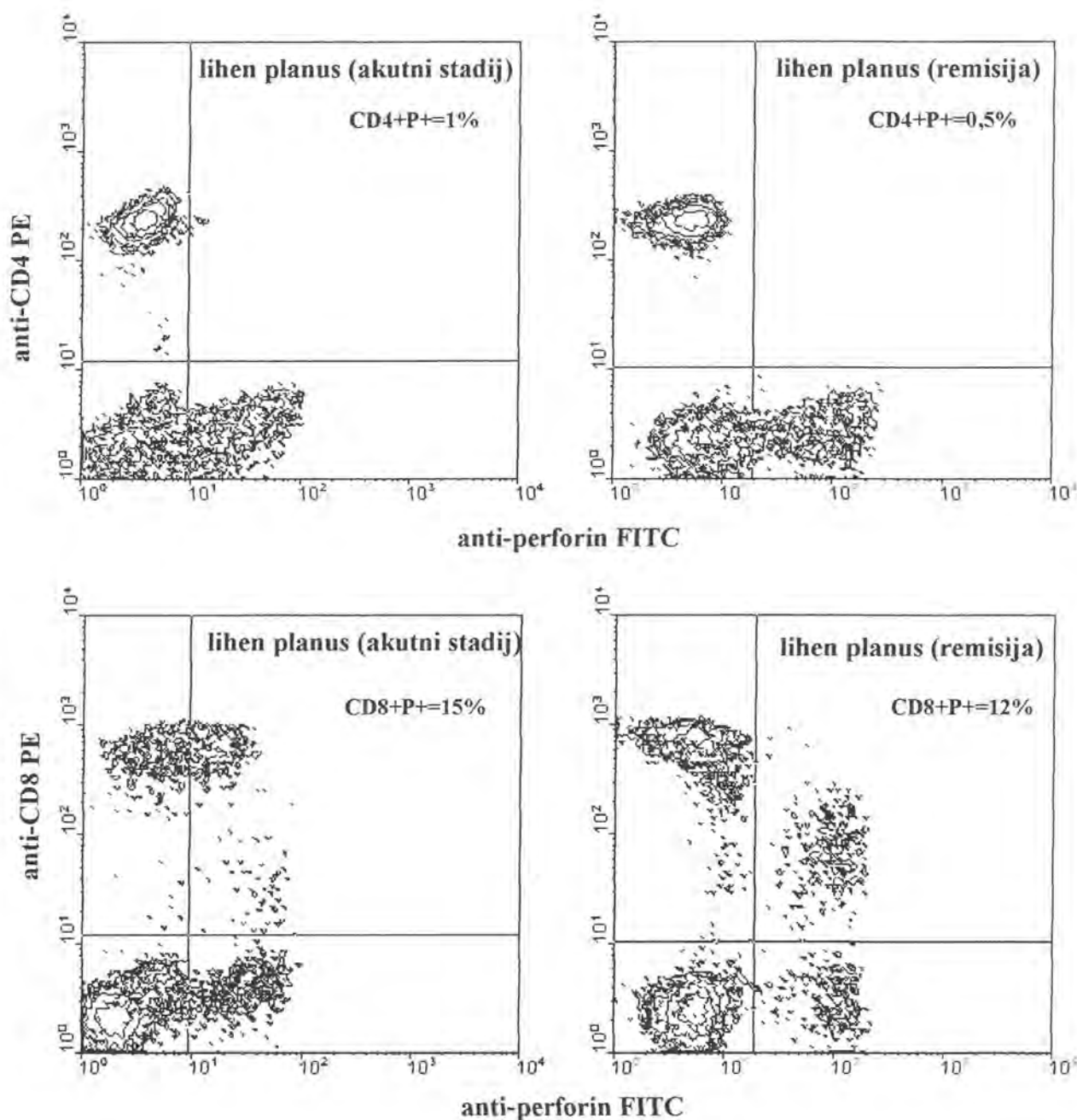
*4.3.3. Ekspresija perforina među pojedinim limfocitnim podvrstama periferne krvi u oboljelih od lihen planusa tijekom akutnog stadija i stadija remisiji*

Uspoređujući ispoljavanje perforina među različitim limfocitnim fenotipima, uočili smo da je perforinska molekula najviše zastupljena u populaciji CD8+ limfocita T (oko 45%), te u populaciji NK stanica (oko 80%) (slika 30). Nadalje, perforinska molekula je podjednako nazočna u oboljelih u pojedinim stadijima bolesti (npr. akutni stadij i remisija) kao i kod zdravih osoba za sve limfocitne populacije izuzevši CD16+ stanice, gdje je ova molekula ispoljena znatno više u oboljelih nego kod zdrave populacije (80% prema 60%;  $p < 0,05$ ) (slika 30).

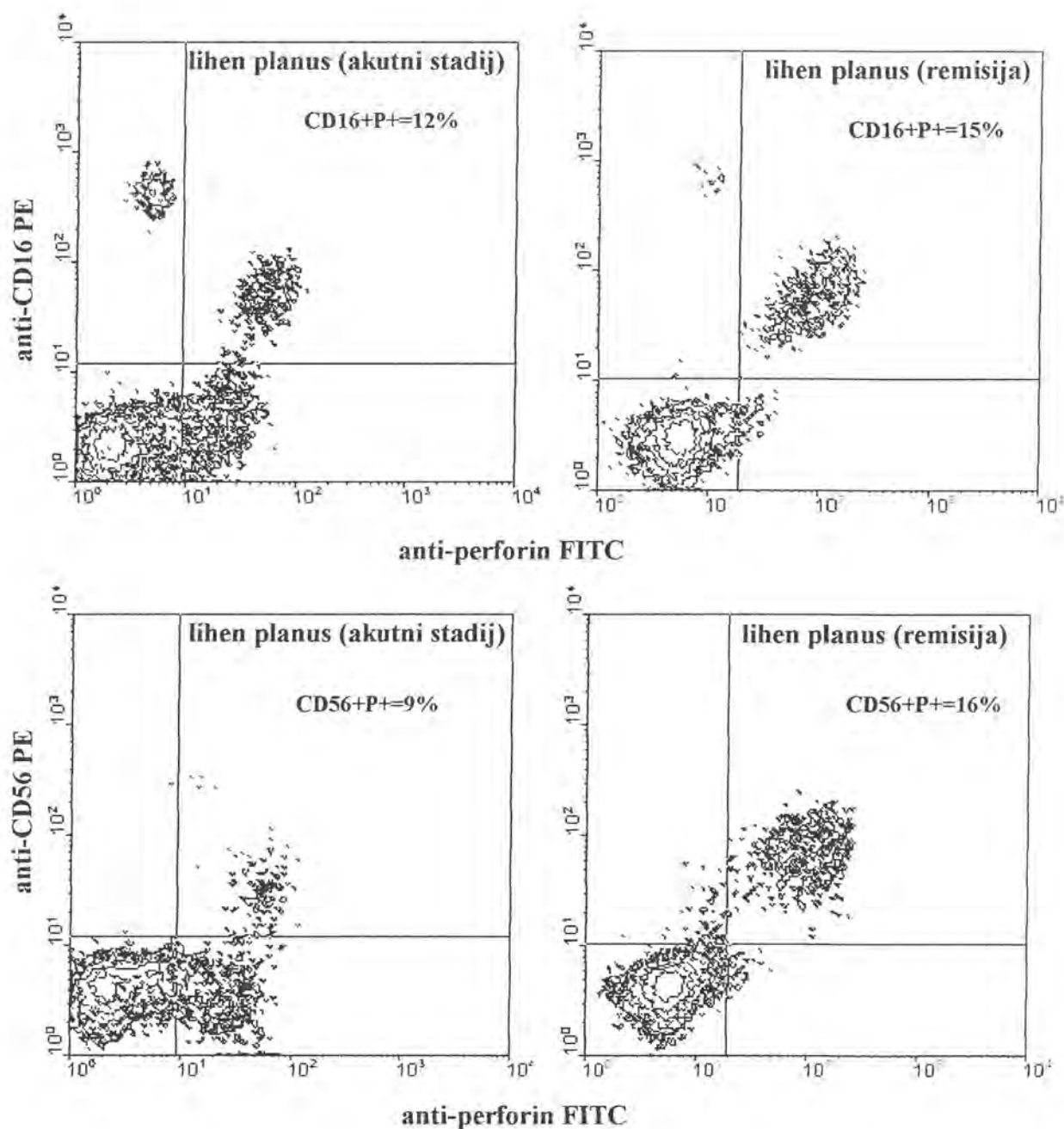


Slika 29. Postotak dvostrukopozitivnih (P i površinski biljeg) limfocita periferne krvi u oboljelih od lihen planusa (stupanj stat. značajnosti: \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ )

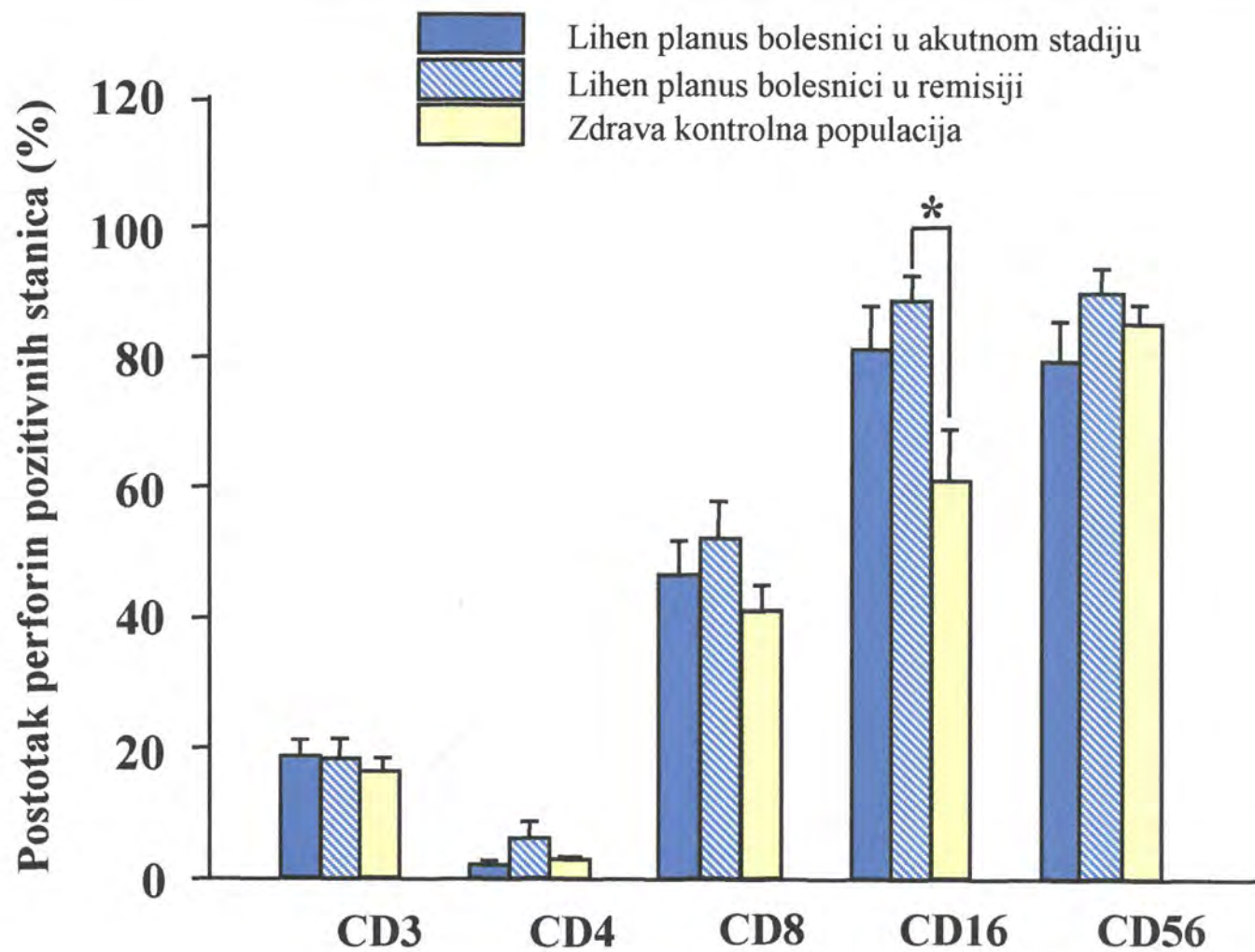




**Slika 29a. Prikaz analize protočnim citometrom dvostruko pozitivnih (perforin+ marker+) LPK oboljelih od lihen planusa (postotak na 10 000 stanica)**



**Slika 29b. Prikaz analize protočnim citometrom dvostruko pozitivnih (perforin+ marker+) LPK oboljelih od lihen planusa (postotak na 10 000 stanica)**



Slika 30. Ispoljavanje perforina u pojedinom fenotipu limfocita periferne krvi u oboljelih od lihen planusa (\* $p < 0,05$ )

#### 4.3.4. Fenotipska obilježja perforin pozitivnih LPK u bolesnika s lihen planusom: Pad citotoksičnih CD8+P+ stanica u populaciji P+ stanica u remisiji bolesti u odnosu na akutni stadij

Analizirajući protočnim citometrom samo perforin pozitivne LPK dobivene su značajne razlike u njihovim fenotipskim obilježjima tijekom psorijaze (slika 31).

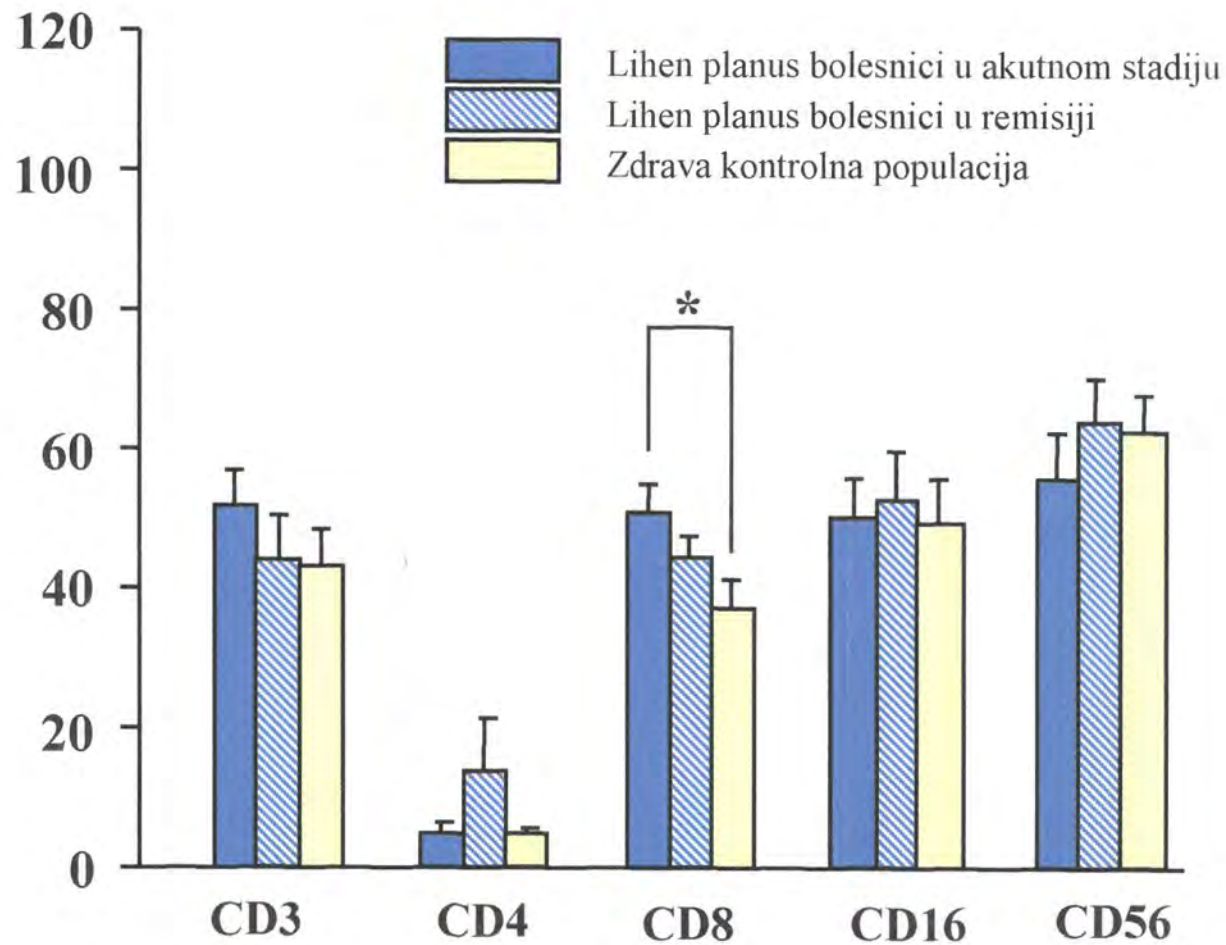
Dominantnu populaciju P+ stanica u LPK čine limfociti T (oko 50%), te NK stanice (oko 60%). Gotovo svi P+ limfociti T pripadaju CD8+ subpopulaciji, dok je CD4+ subpopulacija prisutna u vrlo malom postotku. U akutnom stadiju psorijaze postotak CD8+ limfocita T u skupini perforin+ stanica je relativno visok (51%) u odnosu na remisiju (45%), te kod zdravih osoba ( $p < 0,05$ ) (slika 31). S druge strane, udio CD4+ limfocita T u populaciji P+ stanica je veći u remisiji bolesti (14%) nego u akutnom stadiju i kod zdravih osoba (5%). Udio NK stanica (CD56+ i CD16+) u P+ stanicama je također vrlo velik (oko 55%), ali podjednak u akutnoj fazi bolesti, remisiji i kod zdravih osoba (slika 31).

#### 4.3.5. Određivanje količine perforina po stanici u obliku srednje vrijednosti intenziteta fluorescencije (AFI)

Analizirali smo i intenzitet fluorescencije za perforin u perifernoj krvi oboljelih od lihen planusa, što direktno ukazuje na gustoću zastupljenosti tog antigena u stanici. Rezultate smo prikazali pomoću srednje vrijednosti intenziteta fluorescencije (AFI) za perforin (AFI/P) u LPK (tablica 6).

Za razliku od psorijaze, zamijetili smo da je razina ispoljavanja P (AFI) u citotoksičnim limfocitima T oboljelih od lihen planusa najmanja u akutnom stadiju bolesti, te nešto veća u remisiji bolesti, ali statistički značajno manja nego u zdravoj populaciji ( $p < 0,05$ ) (tablica 6). Isti se odnos može zamijetiti u obje subpopulacije citotoksičnih limfocita T, a naročito u CD4+P+ subpopulaciji, gdje su vrijednosti akutnog stadija također statistički značajno manje nego u zdrave populacije ( $p < 0,05$ ). Vrlo veliku gustoću perforina po stanici imaju i NK stanice oboljelih od lihen planusa. CD16+P+ subpopulacija sadrži podjednake vrijednosti perforina u akutnom stadiju i remisiji, što je mnogo manje od iste populacije stanica zdravih ljudi. CD56+P+





Slika 31. Fenotipske karakteristike perforin pozitivnih limfocita periferne krvi u oboljelih od lihen planusa (stupanj stat. značajnosti: \* $p < 0,05$ )

**Tablica 6. Količina perforina po stanici izražena u obliku srednje vrijednosti intenziteta fluorescencije (AFI vrijednosti) (srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška) kod oboljelih od lihen planusa**

	<b>CD3+P+</b>	<b>CD4+P+</b>	<b>CD8+P+</b>	<b>CD16+P+</b>	<b>CD56+P+</b>
<b>akutni stadij lihen planusa</b>	21,7 $\pm$ 1,86	19,76 $\pm$ 2,73	29,87 $\pm$ 4,50	56,48 $\pm$ 9,99	45,64 $\pm$ 7,57
<b>remisija lihen planusa</b>	26,36 $\pm$ 5,05	23,93 $\pm$ 3,94	33,61 $\pm$ 5,39	54,93 $\pm$ 10,66	55,45 $\pm$ 8,66
<b>zdrava populacija</b>	32,51 $\pm$ 3,49	38,02 $\pm$ 7,96	47,75 $\pm$ 7,21	85,81 $\pm$ 17,64	56,88 $\pm$ 5,72

Statistička značajnost  $p < 0,05$  za: CD3+P+ i CD4+P+ akutni stadij prema zdravoj populaciji

populacija citotoksičnih stanica sadrži više perforina kod bolesnika u remisiji nego u akutnom stadiju, a gotovo jednako kao kod zdravih kontrola (tablica 6).

#### **4.4. Imunohistološki prikaz nazočnosti pojedinih limfocitnih biljega, te ispoljavanja perforinske molekule i FasL molekule u kožnoj leziji lihen planusa i nepromijenjenoj koži istih bolesnika**

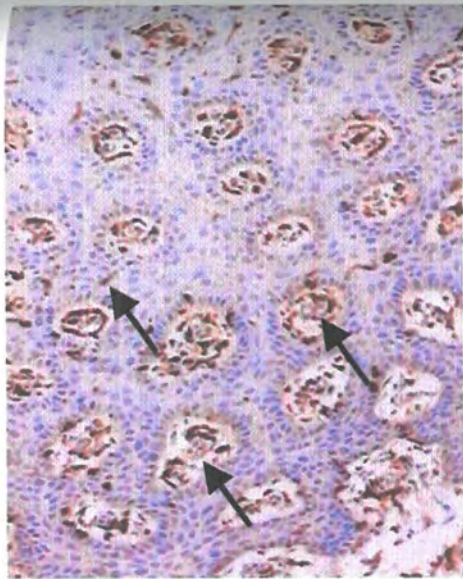
Ispoljavanje površinskih antigena i unutarstanične molekule perforina u promijenjenoj i nepromijenjenoj koži oboljelih od lihen planusa dokazali smo jednostrukim imunohistokemijskim bojanjem serijskih kožnih rezova (slike 32, 38 i 42). Na imunohistokemijskim rezovima bioptata kože oboljelih od lihen planusa, promatrali smo kao i kod psorijaze, smještaj i raspored pojedinih limfocitnih biljega, biljega antigen predočnih stanica, te citolitičkih molekula perforina i FasL-a, nastojeći rasvijetliti njihove međusobne odnose, te ulogu koju imaju u promijenjenoj i nepromijenjenoj koži oboljelih. Također smo izbrojali pozitivne stanice u deset vidnih polja pod povećanjem  $\times 400$  i rezultate izrazili u obliku srednje vrijednosti postotka pozitivnih stanica u ukupnom broju mononuklearnih stanica.

##### *4.4.1. Fenotipska obilježja stanica, te njihov udio u kožnoj leziji lihen planusa, te nepromijenjenoj koži istih bolesnika: Veći udio CD8<sup>+</sup> stanica u epidermisu promijenjene kože*

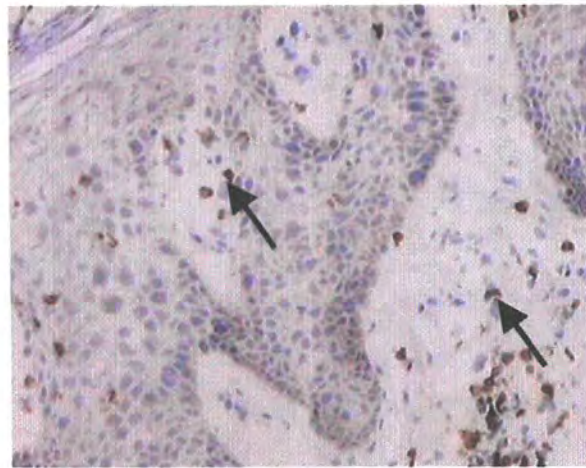
Na imunohistološkim slikama lihen planusa uočavaju se osnovna obilježja ove kožne bolesti. U epidermisu su prisutne ortohiperkeratoza i akantozna uz hipergranulozu, te hidropsku degeneraciju bazalnog sloja. Subepidermalno vidimo vrpčasti infiltrat limfocita i histiocita uz makrofage. Koloidna tjelešca u epidermisu, te u predjelu epidermodermalnog spoja predstavljaju mjesta apoptoze.

Imunohistokemija na limfocitne biljege ukazuje na nazočnost CD3 (biljeg nije prikazan na slici) i CD4 biljega u papilarnom dermisu, većinom u obliku infiltrata, te nešto rjeđe u epidermisu lihenske papule (slika 32). S druge strane CD8 biljeg dominira većinom u epidermisu, a nešto ga se rjeđe može naći i u dermisu (slika 32). Biljezi NK stanica, CD16 i CD56 biljeg su nazočni kao pojedinačne, negrupirane stanice u epidermisu i uz epidermodermalnu granicu (slika 32).

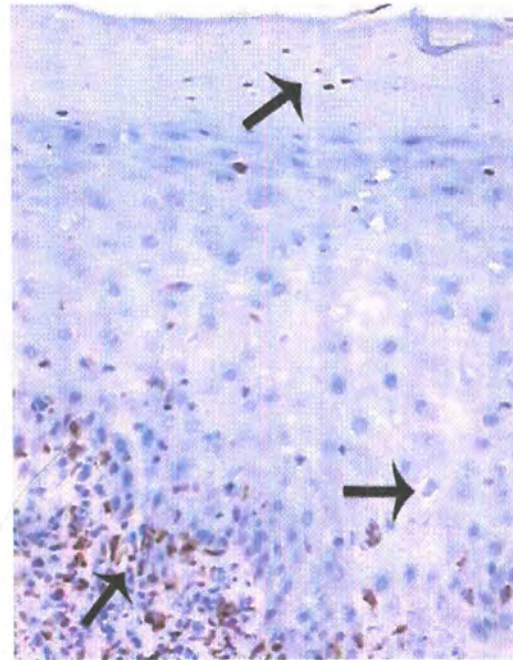




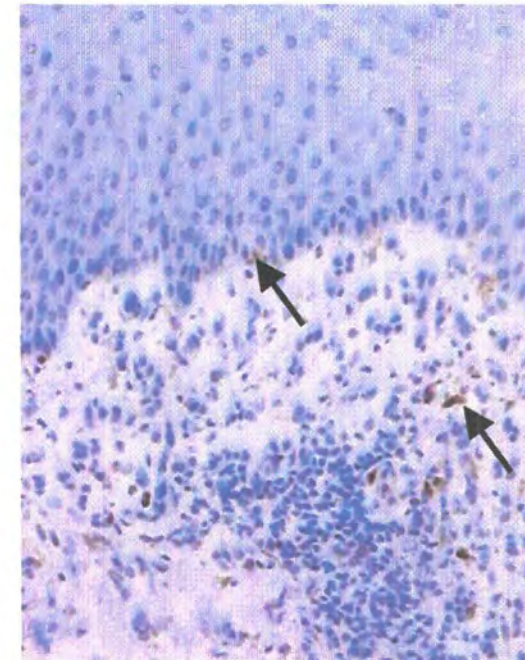
**CD4+ stanice**



**CD16+ stanice**



**CD8+ stanice**



**CD56+ stanice**

**Slika 32. Imunohistokemija promijenjene kože oboljelih od lihen planusa na limfocitne biljege – povećanje x200 (pozitivne stanice su označene strelicama)**



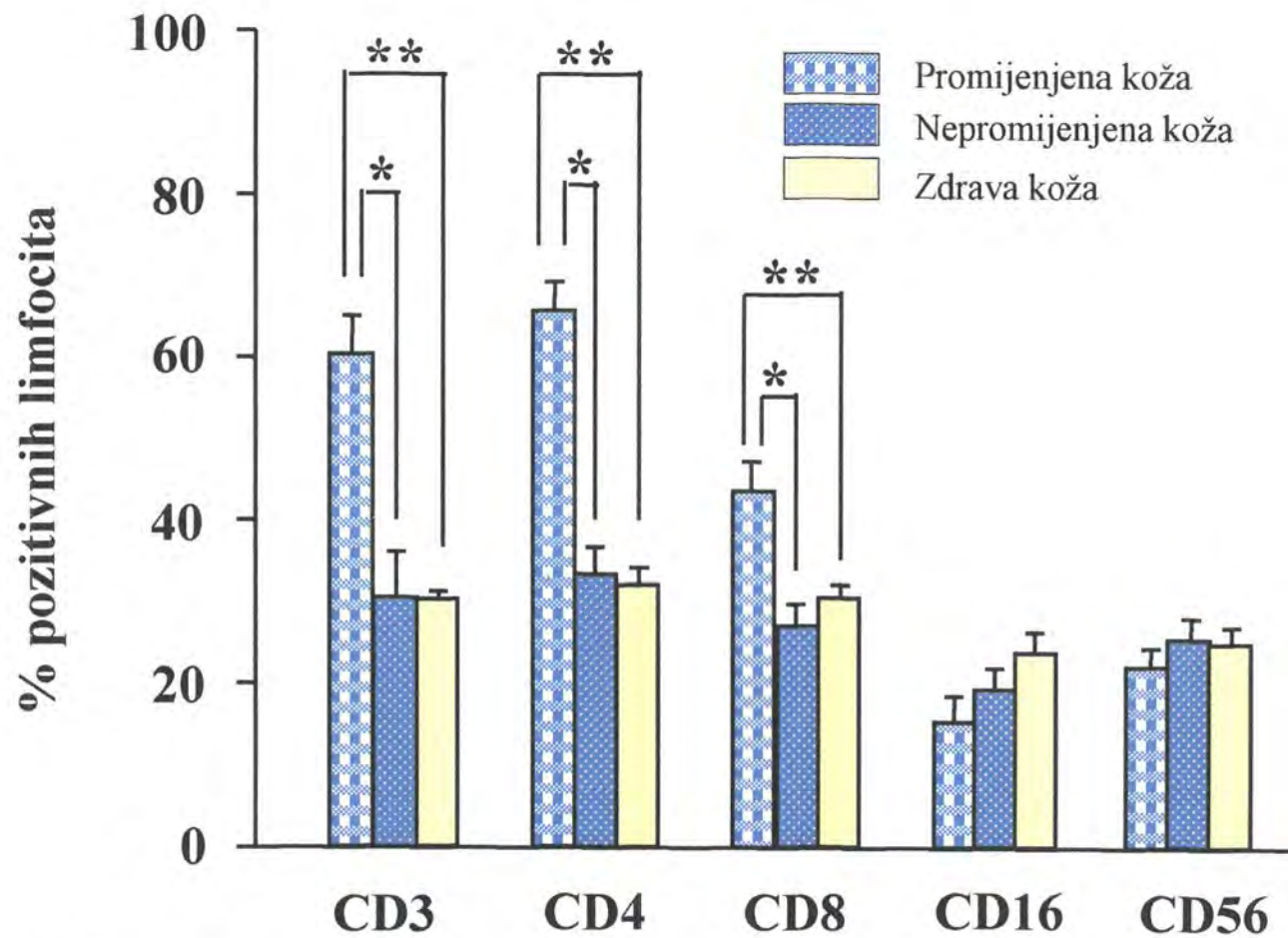
Brojanjem pozitivnih stanica na limfocitne antigene i prikazivanjem rezultata u obliku postotka pozitivnih stanica u ukupnom broju mononuklearnih stanica uočili smo slijedeće razlike. Limfocitni biljezi (CD3, CD4 i CD8) su zastupljeni u znatno većem postotku u promijenjenoj koži oboljelih (60-65% za CD3 i CD4 biljeg, te 42% za CD8 biljeg) u odnosu na nepromijenjenu i zdravu kožu ( $p < 0,05$  i  $p < 0,01$ ), kako ukupno u koži (slika 33) tako i u pojedinim njezinim slojevima epidermisu i dermisu (slike 34 i 35). Statistički značajnih razlika u ispoljavanju biljega NK stanica između promijenjene i nepromijenjene kože nismo uočili (slike 33-35).

Usporedbom ispoljavanja limfocitnih biljega, te biljega NK stanica između epidermisa i dermisa, uočili smo podjednaku nazočnost CD4 biljega u oba kožna sloja, dok su CD8 i CD56 molekule snažnije ispoljene u epidermisu promijenjene kože ( $p < 0,01$  za CD8) (slike 36 i 37).

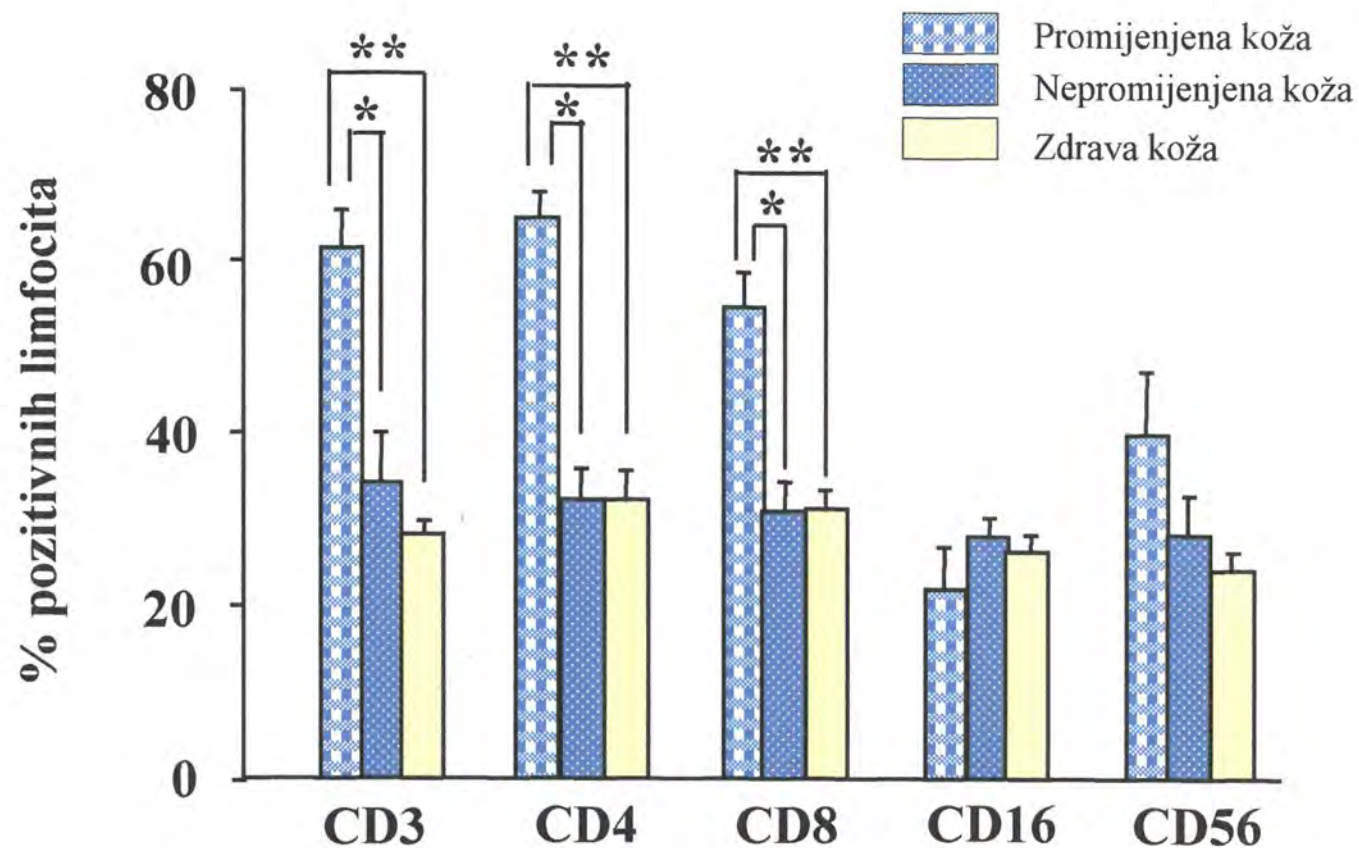
#### *4.4.2. Ispoljavanje perforina i FasL molekule u kožnoj leziji lihen planusa, te nepromijenjenoj koži istih bolesnika*

Promatrajući imunohistološke slike promijenjene kože oboljelih od lihen planusa obilježene protuperforinskim protutijelom uočavamo infiltraciju epidermisa pojedinačno smještenim perforin pozitivnim stanicama, te nazočnost istih stanica u dermisu, ali u daleko manjem broju i to većinom u nakupinama dermalnih upalnih stanica (slika 38). Kvantitativni prikaz rezultata potvrđuje dvostruko veću nazočnost perforin pozitivnih stanica u epidermisu lihenske papule (gotovo 40%) u usporedbi s dermisom (20%) ( $p < 0,05$ ) (slika 39). Vrlo malo perforin pozitivnih stanica (oko 10%) se može naći u nepromijenjenoj koži oboljelih od lihen planusa, kao i u zdravoj koži (slike 38 i 40), kako u epidermisu tako i u dermisu ( $p < 0,05$ ) u odnosu na promijenjenu kožu) (slike 41 i 42).

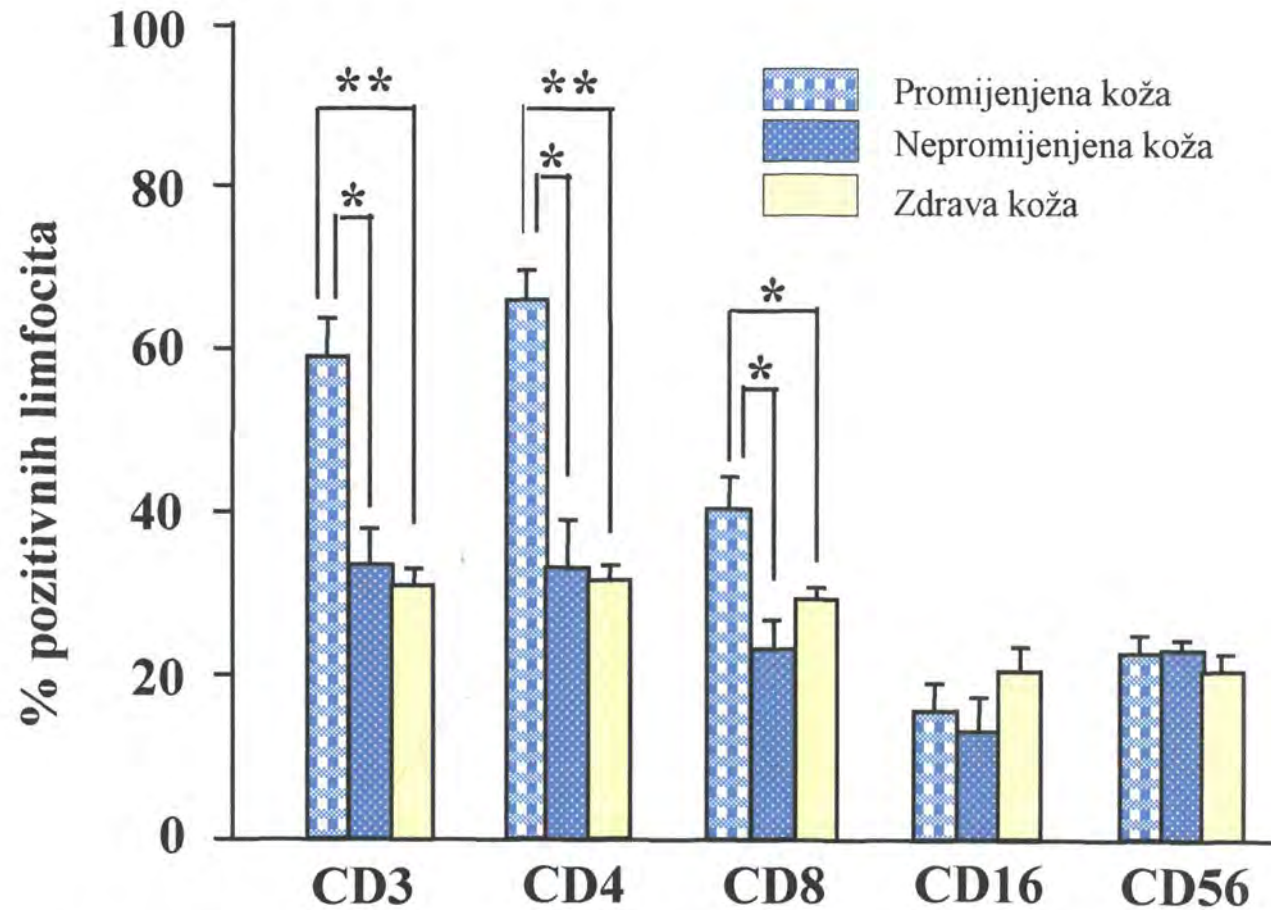
Imunohistološke slike promijenjene kože na FasL biljeg ukazuju na njegovu nazočnost kako pojedinačno u epidermisu tako i unutar upalnog infiltrata u dermisu lihenske papule, ali u znatno manjoj količini i opsegu nego perforinske molekule (slika 43). Nešto veće ispoljavanje FasL molekule u promijenjenoj koži oboljelih u usporedbi s nepromijenjenom i zdravom kožom uočeno je u dermisu ( $p < 0,05$ ) (slika 42), dok takvu razliku u epidermisu nismo uočili (slika 41).



Slika 33. Ispoljavanje limfocitnih biljega ukupno u epidermisu i dermisu promijenjene i nepromijenjene kože oboljelih od lihen planusa (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ )



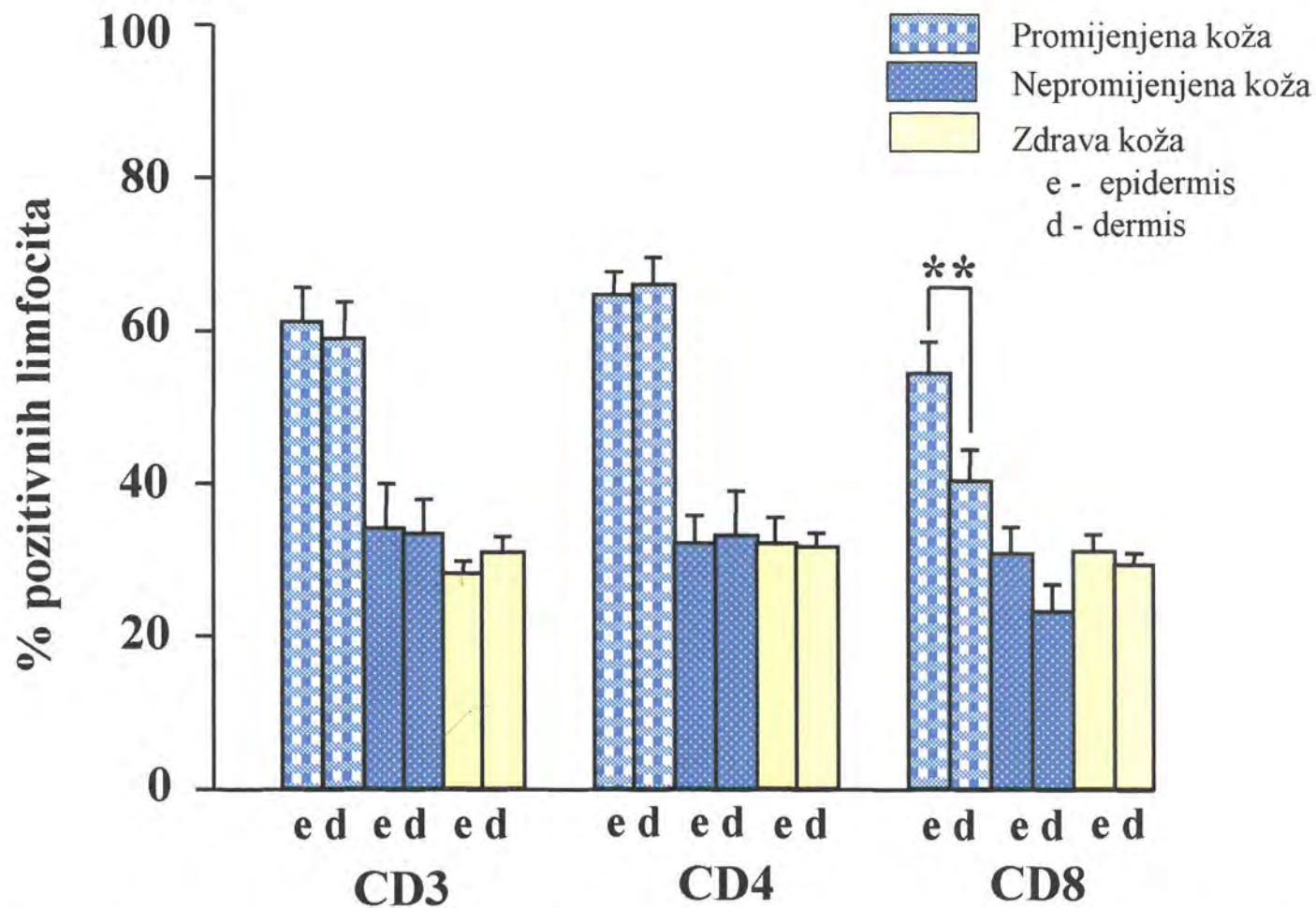
Slika 34. Ispoljavanje limfocitnih biljega u epidermisu promijenjene i nepromijenjene kože oboljelih od lihen planusa (st. znač. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ )



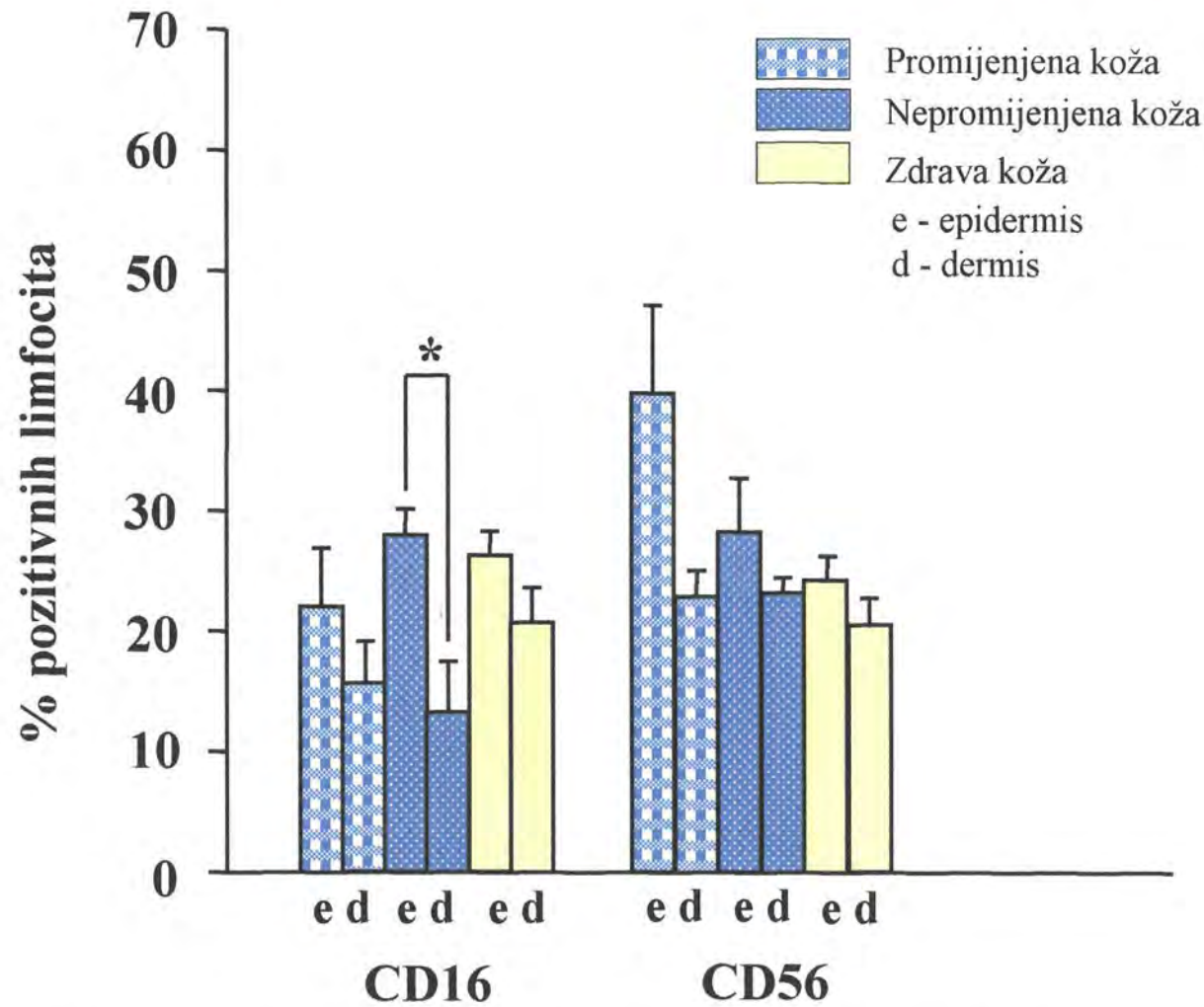
Slika 35. Ispoljavanje limfocitnih biljega u dermisu promijenjene i nepromijenjene kože oboljelih od lihen planusa

(\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ )



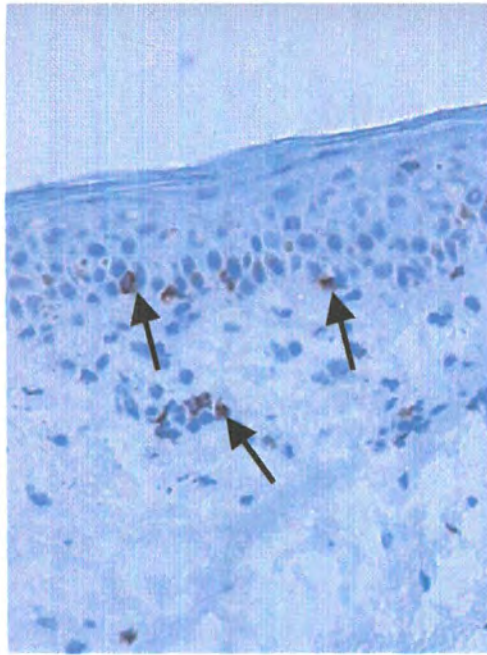


Slika 36. Usporedba ispoljavanja limfocitnih biljega u epidermisu i dermisu promijenjene i nepromijenjene kože oboljelih od lihen planusa (st. znač.  $**p < 0,01$ )

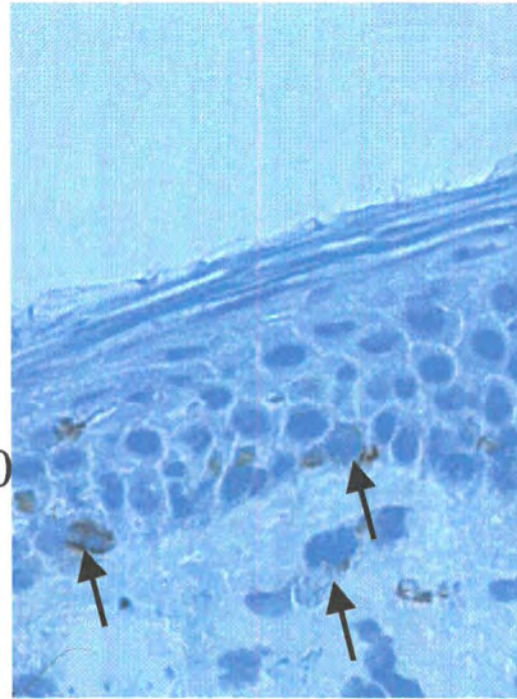


Slika 37. Usporedba ispoljavanja biljega NK stanica u epidermisu i dermisu promijenjene i nepromijenjene kože oboljelih od lihen planusa (st. znač. \* $p < 0,05$ )

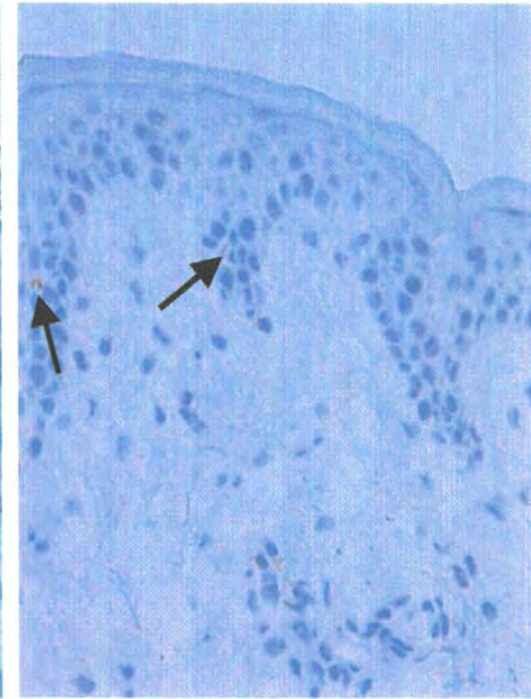




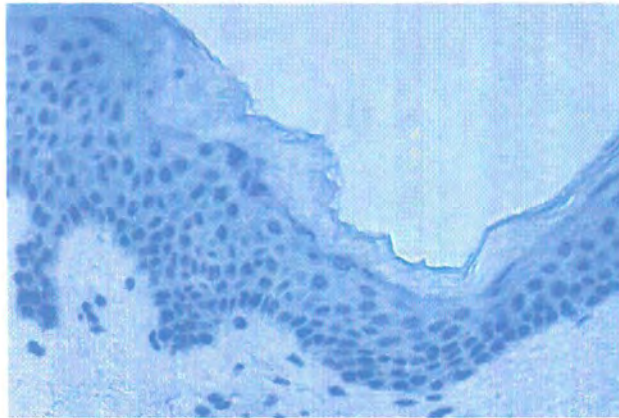
a) x200



b) povećanje x400

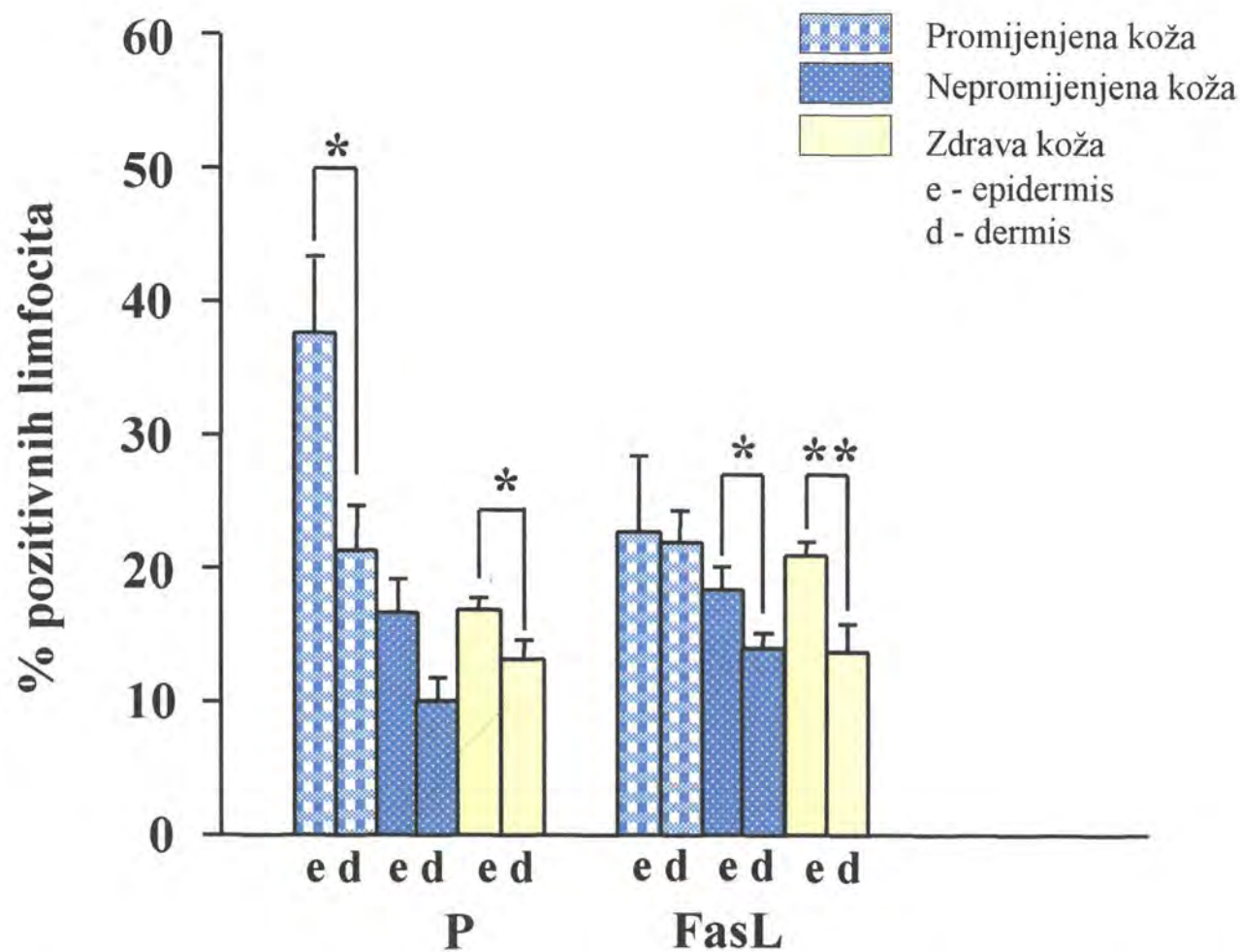


c) povećanje x200



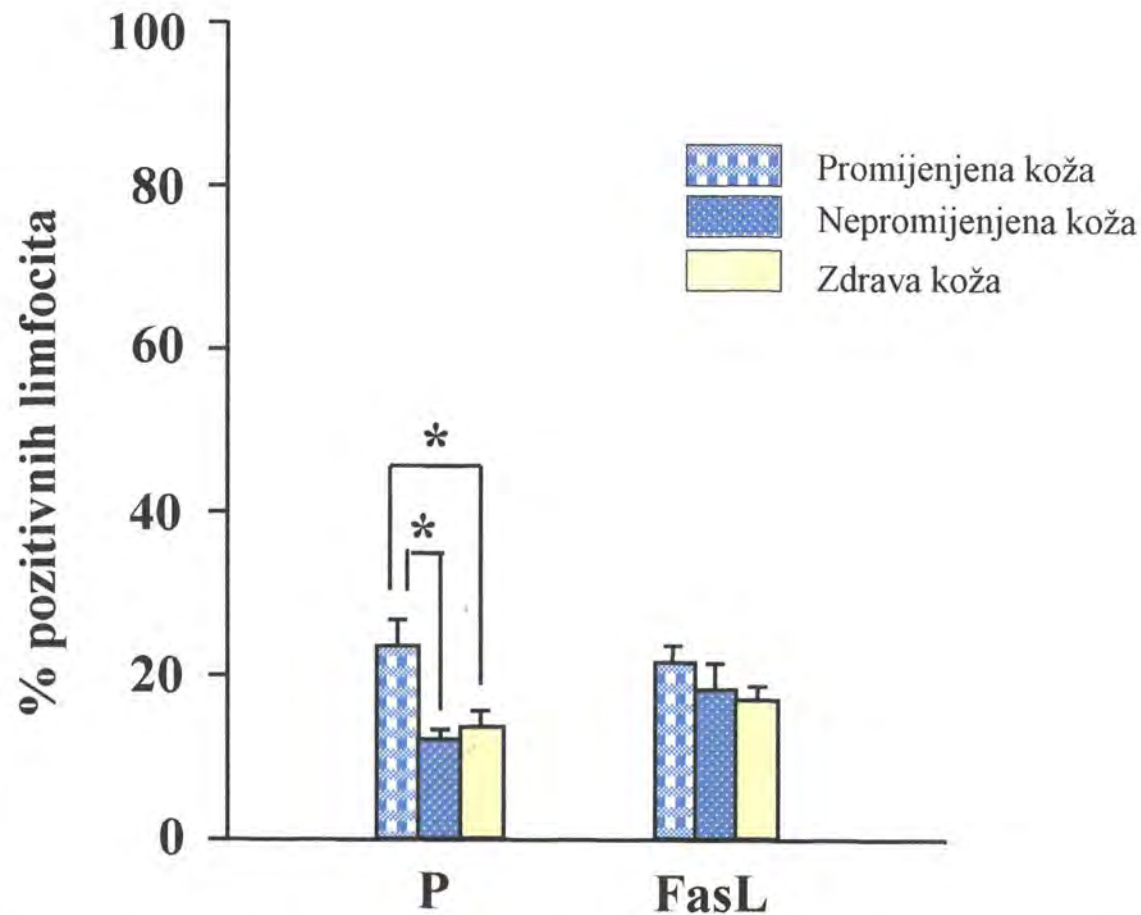
d) povećanje x200

Slika 38. P+ stanice u promijenjenoj (a,b) i nepromijenjenoj koži (c) oboljelih od lihen planusa, te u zdravoj koži (d). Mnogo pozitivnih stanica u epidermisu promijenjene kože (a i b).

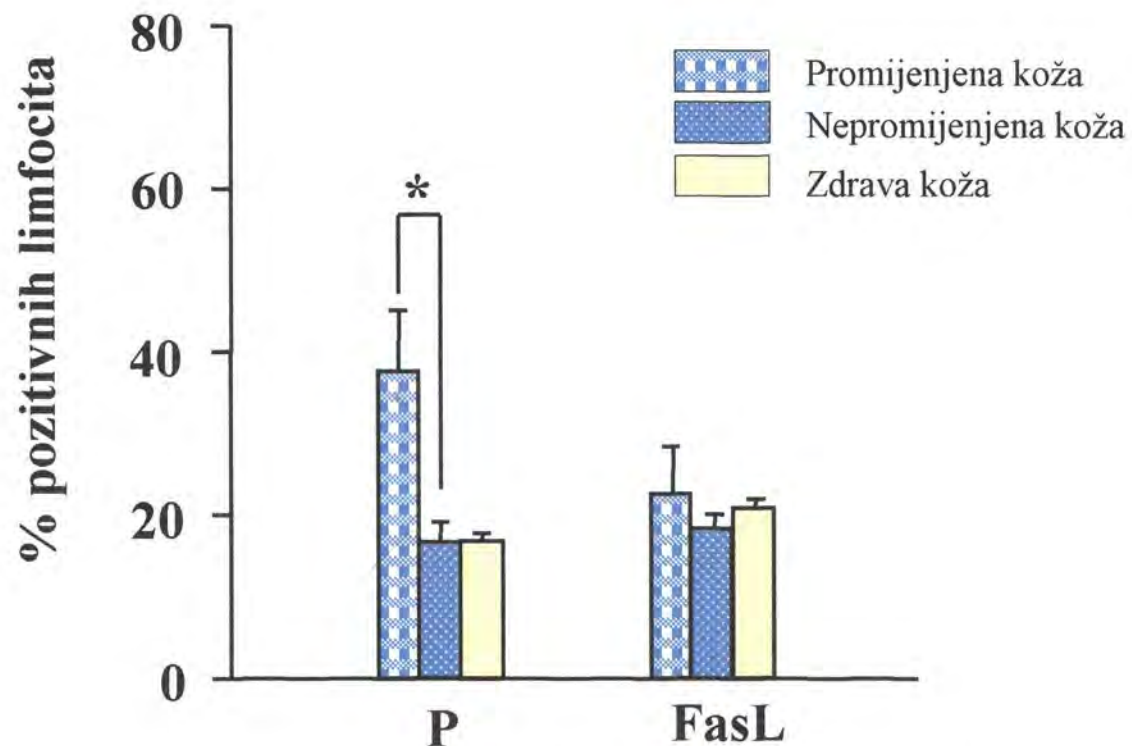


Slika 39. Usporedba ispoljavanja citotoksičnih stanica u epidermisu i dermisu promijenjene i nepromijenjene kože oboljelih od lihen planusa (st. znač. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ )

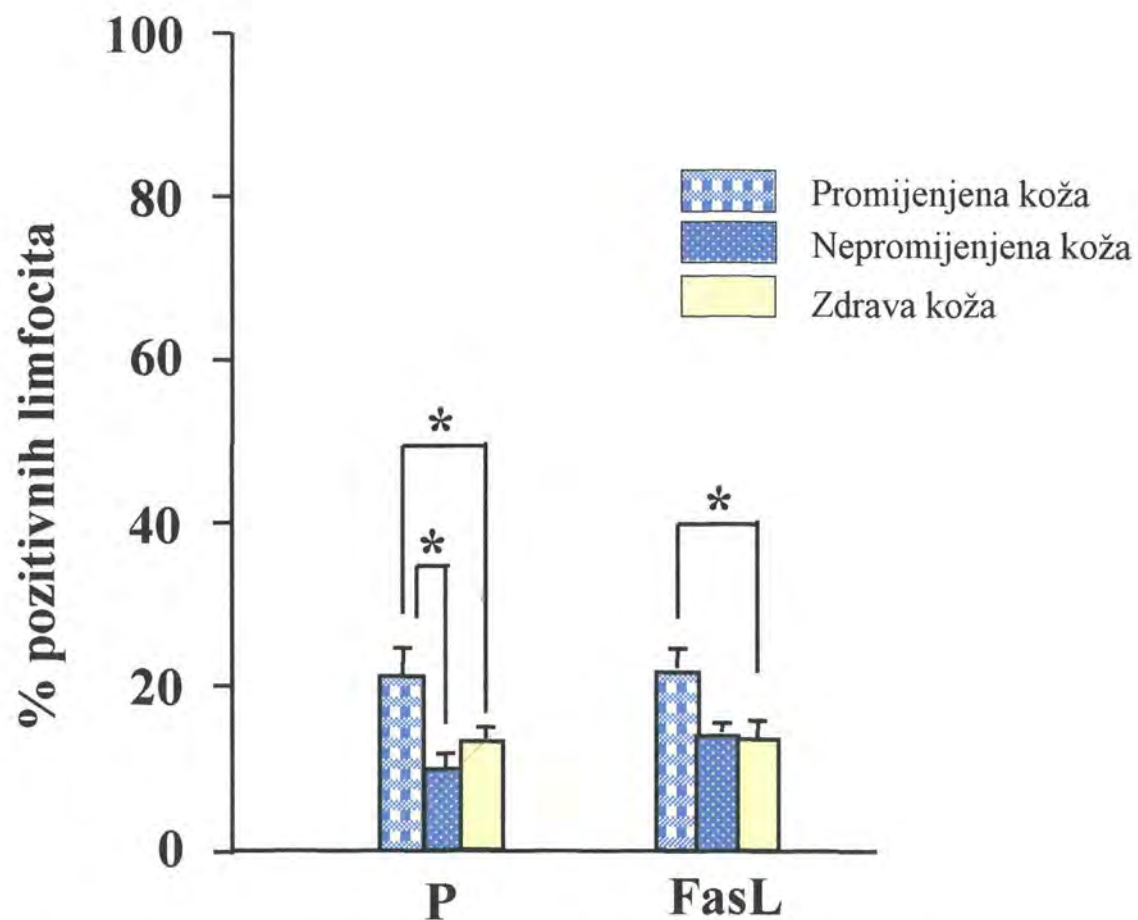




Slika 40. Ispoljavanje citotoličnih molekula ukupno u epidermisu i dermisu promijenjene i nepromijenjene kože oboljelih od lihen planusa (\* $p < 0,05$ )

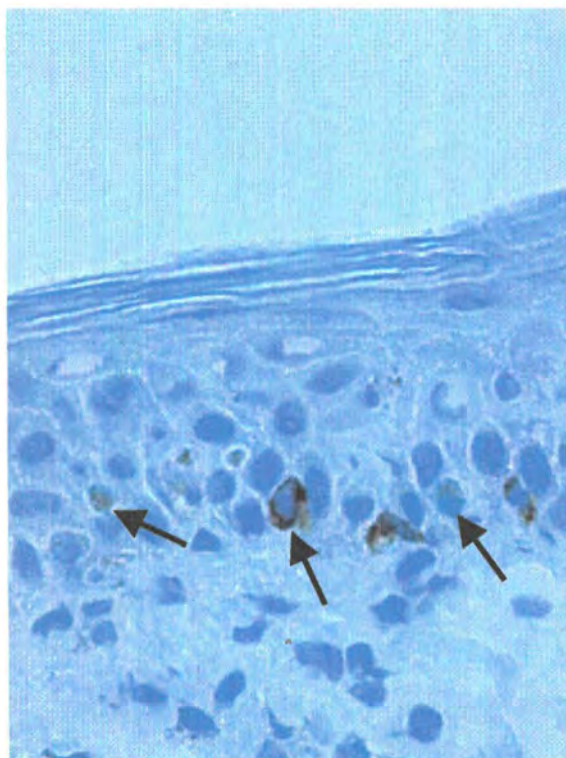


Slika 41. Ispoljavanje citotoličkih molekula u epidermisu promijenjene i nepromijenjene kože oboljelih od lihen planusa (stat. značajnost \* $p < 0,05$ )

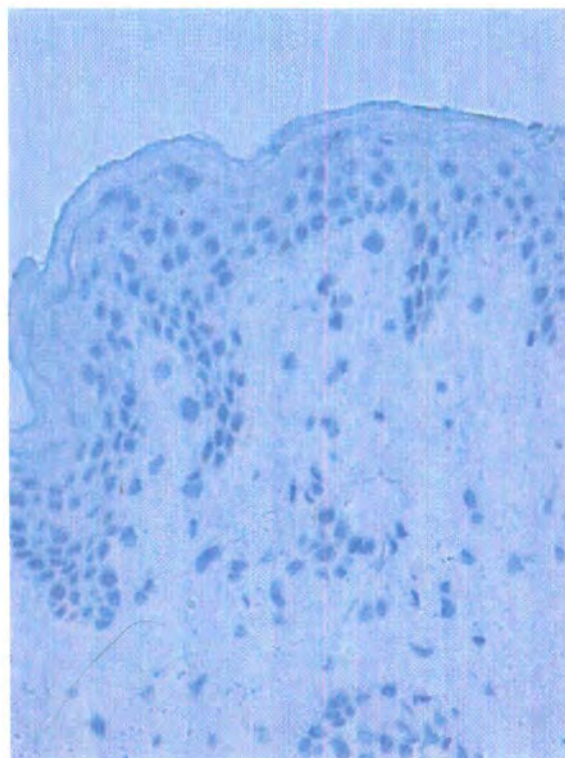


Slika 42. Ispoljavanje citolitičkih molekula u dermisu promijenjene i nepromijenjene kože oboljelih od lihen planusa (st. znač. \* $p < 0,05$ )

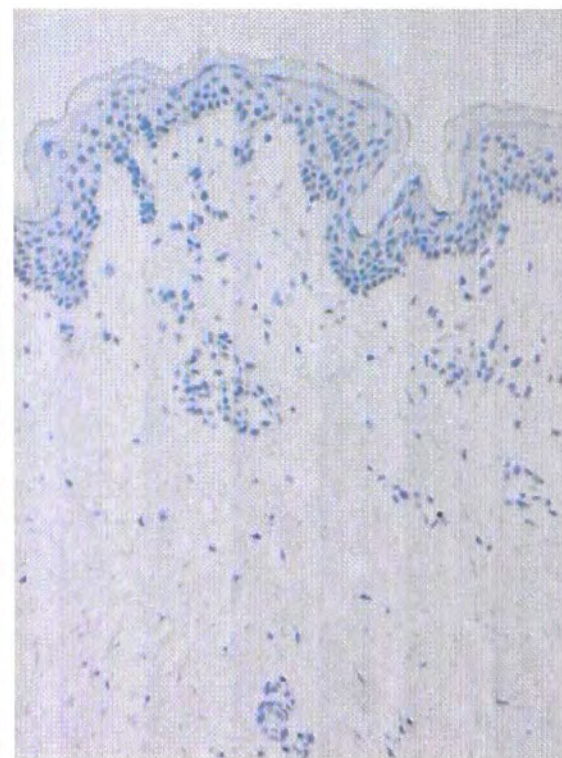




a) povećanje x400



b) povećanje x200

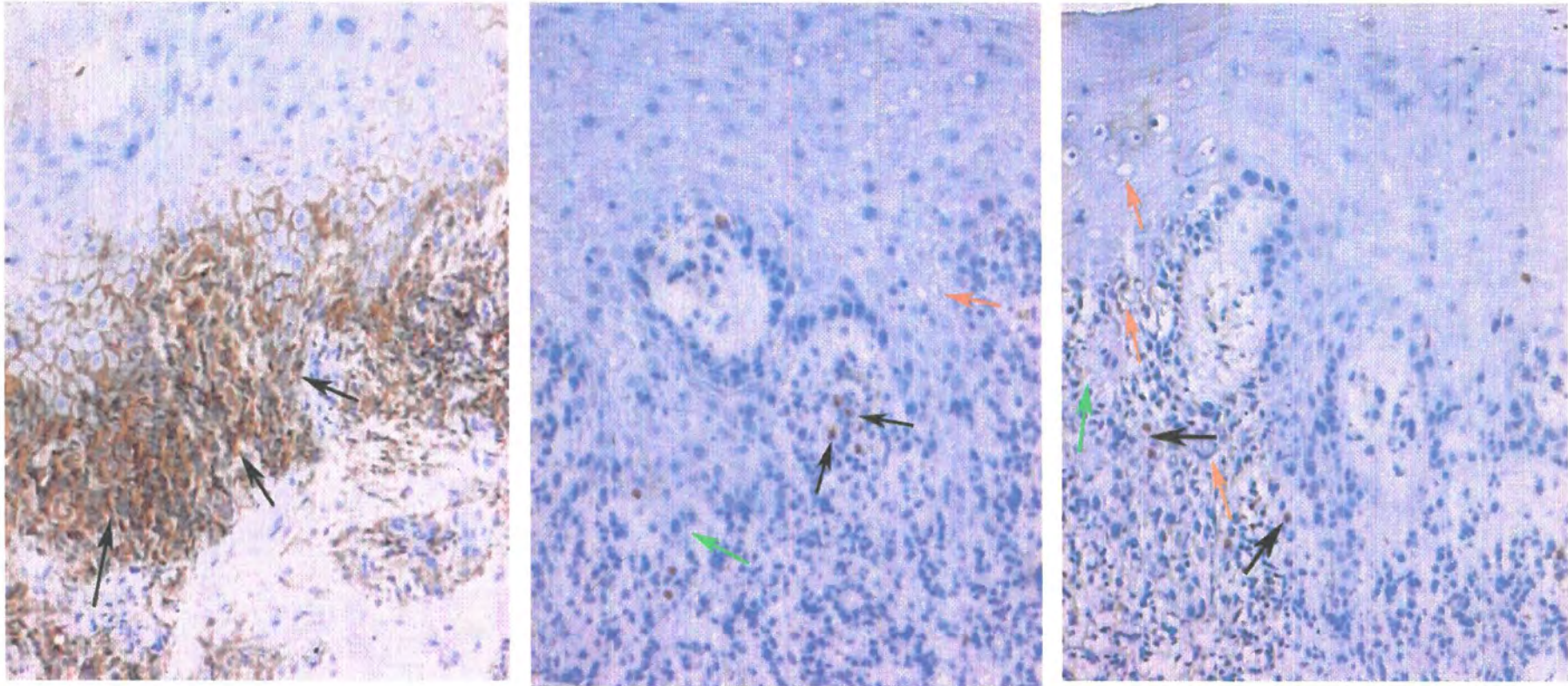


c) povećanje x100

Slika 43. **FasL+ stanice u promijenjenoj (a) i nepromijenjenoj koži (b) oboljelih od lihen planusa, te u zdravoj koži (c). Mnogo pozitivnih stanica u epidermisu promijenjene kože (a).**



Slično kao i u psorijaze, u imunohistološkim rezovima promijenjene kože oboljelih od lihen planusa postoje mjesta snažnog prodora limfocita, od kojih su većina perforin+ i FasL+ iz dermisa u epidermis. Na tim mjestima dolazi do hidropske promjene bazalnih keratinocita u čijoj se citoplazmi nalaze svijetli vakuolarni prostori sa jezgrom potisnutom u stranu, te likvefakcijske degeneracije bazalnog sloja (slika 44). Imunohistološki nalazi kao i nalazi periferne krvi su vrlo slični u psorijazi i lihen planusu, što potvrđuje već ranije postavljene teze o sličnoj patogenezi ovih dviju autoimunih bolesti.



Slika 44. **Prodor P+ stanica iz dermisa u epidermis (crne strelice) (a) uz likvefakcijsku degeneraciju bazalnog sloja (zelene strelice) i hidropsku promjenu keratinocita (crvene strelice) (b i c) (povećanje x200)**

## 5. RASPRAVA

Na temelju dosadašnjih istraživanja imunopatogeneze psorijaze postalo je jasno da psorijaza nastaje kao posljedica keratinocitne hiperproliferacije potaknute nakupljanjem limfocita T i njihovom aktivacijom u psorijatičnom žarištu (5,18). Aktivaciji limfocita T prethodi prepoznavanje stranog ili vlastitog antigena ili superantigena (npr.  $\beta$ -hemolitičkog streptokoka, stafilokoka ili vlastitog izmijenjenog keratina) predočenog u sprezi s HLA molekulom razreda I ili II na antigen predočnoj stanici ili keratinocitu (5,18). Aktivirani limfociti T, te neke druge stanice psorijatičnog mikrokoliša luče citokine Th1 i Tc1 tipa, kao što su IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$ , koji potiču proliferaciju keratinocita, ispoljavanje adhezivnih molekula na endotelnim stanicama i daljnje nakupljanje leukocita iz cirkulacije u psorijatično žarište (5,18,123). Zahvaljujući ovim spoznajama psorijaza je uvrštena u skupinu upalnih bolesti posredovanih T-limfocitnim imunološkim odgovorom (123). Promjene staničnog fenotipa uočene su kako lokalno u psorijatičnom žarištu tako i sistemski u perifernoj krvi (123).

Najranija izučavanja limfocitnih subpopulacija u perifernoj krvi psorijatičara nisu pokazala veće razlike u odnosu na zdravu populaciju (124-127). Moguće objašnjenje je činjenica da ta izučavanja nisu pridavala važnost kliničkom stadiju bolesti, tj. akutizaciji odnosno remisiji. Kasniji radovi Bakera i suradnika (128), te Rubinsa i suradnika (129) su dokazali pad broja CD4<sup>+</sup> limfocita T uz porast broja CD8<sup>+</sup> limfocita T u perifernoj krvi akutnog stadija vulgarne psorijaze i teških psorijatičnih oblika kao što su artropatska i eritrodermijska psorijaza (128,129). S druge strane, odnosi ovih limfocitnih subpopulacija u oboljelih od kronične stacionarne psorijaze nisu se značajnije razlikovali od kontrolne skupine (129).

Osvrtom na naše rezultate također zamjećujemo značajno veći postotak limfocita T u perifernoj krvi, osobito CD8 fenotipa u egzacerbaciji bolesti u usporedbi s kroničnim stacionarnim stadijem, te zdravim osobama ( $p < 0,001$ ) (slika 1). S druge strane nema većih razlika u postotku CD4<sup>+</sup> limfocita T u navedenim grupama (slika 1).

Promjene na sistemskoj razini ne moraju uvijek pratiti promjene koje se zbivaju lokalno. Stoga je cilj našega istraživanja bio analizirati i dinamiku promjena u samom žarištu, te nepromijenjenoj koži bolesnika u akutnom stadiju i remisiji. Dovođenje u vezu sistemskih i lokalnih imunoloških zbivanja omogućilo bi bolje razumijevanje kretanja ovih stanica i njihove uloge u etiopatogenezi bolesti.



U literaturi postoje oprečna mišljenja oko populacije stanica koja infiltrira psorijatično žarište. Jedni su autori utvrdili da CD8<sup>+</sup> stanice čine većinu limfocita epidermisa, a CD4<sup>+</sup> stanice prevladavaju u dermisu (14,15,16). Drugi su autori dokazali da nastanak novih kožnih lezija prati epidermalni utok i aktivacija CD4<sup>+</sup> limfocita T, dok su žarišta u remisiji obilježena epidermalnim ulaskom i aktivacijom CD8<sup>+</sup> limfocita T (17).

Promatranjem nastanka Koebnerovog fenomena utvrđen je porast CD4<sup>+</sup> limfocita T u nepromijenjenoj koži psorijatičara dva dana nakon traume, dok je broj CD8<sup>+</sup> limfocita T i CD11c<sup>+</sup> makrofaga porastao u epidermisu početnih lezija sedam dana nakon traume (130). To bi govorilo u prilog činjenici da se nastanak vidljivih psorijatičnih lezija iz nepromijenjene kože podudara s utokom CD8<sup>+</sup> limfocita T u epidermis (130). Porast broja CD8<sup>+</sup> limfocita T u epidermisu i CD4<sup>+</sup> limfocita T u dermisu akutnih psorijatičnih žarišta utvrdili su i drugi autori (130,131,132).

Rezultati naših istraživanja također ukazuju na značajno veću zastupljenost CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> stanica u psorijatičnom žarištu u odnosu na nepromijenjenu kožu bolesnika ( $p < 0,05$ ), te kožu zdravih osoba ( $p < 0,01$ ) (slika 6). Međutim, nema značajnije razlike u ispoljavanju CD4 molekule između akutnog i kroničnog psorijatičnog plaka kako ukupno u koži (slika 6), tako i u njezinim slojevima (slike 7 i 8). Dakle, za razliku od ranije navedenih autora (131,132) nismo utvrdili jaku infiltraciju CD4<sup>+</sup> limfocita T u dermisu akutnog psorijatičnog plaka. Štoviše, u našim istraživanjima je postotak CD4<sup>+</sup> stanica u epidermisu kako akutnog tako i kroničnog psorijatičnog plaka nešto viši u odnosu na dermis (slika 9). Nasuprot tome, postotak CD8<sup>+</sup> limfocita T je kao u ostaloj literaturi (17,130) znatno veći u epidermisu psorijatičnih žarišta u odnosu na dermis, naročito u epidermisu kroničnog plaka, gdje je taj postotak gotovo dvostruko veći nego u dermisu (53% prema 35%;  $p < 0,05$ ) (slika 9). Sve govori u prilog nakupljanja i nedvojbene uloge CD8<sup>+</sup> limfocita T u lezijama u remisiji.

Nazočnost povećanog broja limfocita T oba fenotipa u perifernoj krvi i kožnim promjenama psorijatičara otvara pitanje njihove moguće uloge u patogenezi ove kožne bolesti. Dugo se vremena psorijaza smatrala autoimunom bolesti posredovanom isključivo CD4<sup>+</sup> limfocitima T. Terapijski učinak imunosupresivnih lijekova kao npr. ciklosporina, FK 605 i anti-CD4 protutijela na povlačenje psorijatičnog plaka dodatno je potvrdilo ulogu CD4<sup>+</sup> limfocita T u patogenezi psorijaze (133,134). Međutim, jaka povezanost psorijaze s HLA genima razreda I naročito Cw6 genom, kao i klonalna



ekspanzija koja je zamijećena samo u CD8<sup>+</sup> staničnom fenotipu, ukazuju na nepobitnu ulogu CD8<sup>+</sup> limfocita T u patogenezi psorijaze (123).

Ubrizgavanje autolognih CD4<sup>+</sup> limfocita T, ali ne i CD8<sup>+</sup> limfocita T, u presađenu nepromijenjenu kožu psorijatičara potaklo je nastanak psorijatičnog plaka (18). Ipak, imunohistokemijskim izučavanjem presađene kože nakon davanja CD4<sup>+</sup> limfocita T postalo je jasno da je stanje mnogo složenije, te da epidermalni limfociti T ispoljavaju CD8 biljeg, te aktivacijske biljege CD25 (IL-2R) i CD69 (18). Dakle, ubrizgavanje CD4<sup>+</sup> limfocita T stvara određeni mikrookoliš u kojem epidermalni CD8<sup>+</sup> limfociti T, koji su već prisutni u nepromijenjenoj koži psorijatičara postaju aktivirani zahvaljujući pomagačkom signalu kojeg stvaraju CD4<sup>+</sup> limfociti T (18).

Budući da je dokazan epidermalni utok CD4<sup>+</sup> limfocita T u rane lezije i njihova združenost s HLA-DR<sup>+</sup> dendritičkim stanicama, kao i epidermalni utok CD8<sup>+</sup> limfocita T u lezije u remisiji spekulira se i o ulozi dendritičnih stanica u antigenskom prepoznavanju i aktivaciji limfocita T (123).

Dendritičke stanice se smatraju najjačim antigen predočnim stanicama. One sazrijevaju aktivacijom epidermalnih Langerhansovih stanica u dodiru s antigenom, koje onda ispoljavaju CD83 biljeg, tj. biljeg aktiviranih i zrelih dendritičkih stanica (135). U našem istraživanju uočili smo nakupine nezrelih CD1a<sup>+</sup> Langerhansovih stanica u epidermisu i dermisu psorijatičnih kožnih lezija, dok su CD83<sup>+</sup> zrele dendritičke stanice prisutne samo mjestimično u epidermisu, a njihov je broj u gornjem dermisu znatno veći (Slika 26). CD83<sup>+</sup> dendritičke stanice nalaze se u grupama s mononuklearnim limfoidnim stanicama i to u uskom dodiru s limfocitima, te se smatra da su one odgovorne za izravnu aktivaciju limfocita T u lezijama (135). Iako mi nismo uočili veće nakupljanje CD80<sup>+</sup> stanica u psorijatičnom plaku, Mitra i suradnici su dokazali da dermalne dendritične stanice psorijatičnog plaka ispoljavaju CD80, te naročito CD86 molekulu (136). CD80 i CD86 molekula, ranije poznate kao B7-1 i B7-2 molekule, ispoljene na antigen predočnim stanicama su nosioci drugog odnosno kostimulacijskog signala tijekom aktivacije limfocita T (136). Nickoloff i suradnici su, međutim, dokazali ekspresiju CD80 molekule i na limfocitima psorijatičnog plaka, te CD86 molekule na epidermalnim keratinocitima što može ukazivati na sposobnost samoaktivacije i kontinuirane proliferacije limfocita T kod ove kožne bolesti (137).

Stanice prirodni ubojice ili NK stanice (od engl. natural killer cells) se opisuju kao stanice sposobne ubiti ciljnu stanicu bez prethodne imunizacije ili aktivacije (138). Dakle, NK stanice mogu djelovati bez prethodne antigene stimulacije, a njihovo

djelovanje ovisi o aktivirajućim i inhibirajućim receptorima na njihovoj površini (138). NK stanice djeluju kao prva obrana protiv virusom inficiranih ili malignih stanica uništavajući ih procesom programirane stanične smrti, tj. apoptozom (138). Za razliku od limfocita T, utvrđene su vrlo male oscilacije NK stanica u perifernoj krvi psorijatičara, te mala zastupljenost tih stanica u psorijatičnim lezijama (138).

Udio stanica koje ispoljavaju CD16 i CD56 molekulu, tj. NK stanica među LPK oboljelih od psorijaze je značajno manji nego kod zdravih osoba (138,139). Istraživanjima NK-aktivacijskog receptora, tj. CD16 molekule, u psorijatičnom žarištu, utvrđena je njena nazočnost većinom u epidermisu i papilarnom dermisu i to u značajno većem broju u usporedbi s nepromijenjenom i zdravom kožom (140). S druge strane, adhezijska CD56 molekula je snažnije zastupljena u epidermisu i to bez razlike između promijenjene, nepromijenjene i zdrave kože (140). Više je autora također utvrdilo da su bazalna aktivnost NK stanica u perifernoj krvi psorijatičara, kao i aktivnost tih stanica potaknuta IFN- $\alpha$  i IFN- $\gamma$ , a mjerene citotoksičnim testom protiv K-562 i L-1210 jednake ili značajno niže nego u kontrola (141,142,143).

Naši rezultati također ne ukazuju na razlike u zastupljenosti NK stanica u perifernoj krvi oboljelih od psorijaze (oko 20%) u odnosu na zdravu populaciju. Zanimljivo je uočiti da je postotak CD56+ stanica u LPK akutnog stadija bolesti jednak kao u zdrave populacije, ali zato značajno veći nego u remisiji bolesti ( $p < 0,01$ ) (slika 1), što bi govorilo u prilog mogućeg prelaska ove populacije stanica iz cirkulacije u kožna žarišta s daljnjim razvojem bolesti.

Kao i u perifernoj krvi, tako i u psorijatičnim žarištima udio NK stanica je oko 20%. Postoji značajno manja ekspresija CD16 i CD56 biljega u psorijatičnim plakovima u odnosu na nepromijenjenu kožu bolesnika u remisiji i zdravu kožu ( $p < 0,05$  i  $p < 0,01$ ) (slike 10,11 i 12). Međutim, unatoč tome što je CD16 molekula slabo zastupljena u psorijatičnim plakovima, postoji razlika u nazočnosti ove molekule između epidermisa i dermisa (slika 13). Znatno veća zastupljenost CD16+ stanica je prisutna u epidermisu kroničnog psorijatičnog plaka, te nešto veća u epidermisu akutnog plaka u usporedbi s postotkom tih stanica u dermisu (slika 13).

Također smo uočili da u perifernoj krvi akutnog stadija psorijaze, kao i u psorijatičnim lezijama, veliki broj CD56+ stanica ispoljava ujedno i CD16 molekulu. Dakle, radi se o populaciji NK stanica uključenih u ADCC citotoksičnost (od engl. antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity). One su sposobne ubiti ciljne stanice na

koje su se prethodno vezala protutijela (144). Povećanu ADCC citotoksičnost u perifernoj krvi akutnog stadija psorijaze dokazali su i drugi autori (144,145,146).

Danas se vrlo velika važnost pridaje novootkrivenoj populaciji limfocita T, koja osim CD3 biljega posjeduje i biljege NK stanica, prvenstveno CD56 i CD57 molekule, te se stoga ove stanice nazivaju NK-T stanicama (147). Ova populacija stanica posjeduje i CD161 biljeg (NKR-P1A) i druge C-tip lektinske molekule kao što je CD94 molekula (147). Cameron i suradnici (138), te Korech i suradnici (148) su uočili da se broj cirkulirajućih NK-T stanica (CD3+CD56+CD57+) u psorijatičara ne razlikuje od toga broja kod zdravih osoba, tj. da je taj broj čak nešto manji (138,148). Njihov postotak raste nakon antipsorijatične terapije, ali je i dalje značajno niži nego u kontrola (148).

Nickoloff i suradnici su CD94+/CD161+ NK-T-staničnu liniju izoliranu iz periferne krvi psorijatičara inkubirali sa CD1d+ keratinocitima što je dovelo do lučenja velikih količina IFN- $\gamma$  i IL-13 (147). Nadalje, ubrizgavanjem ove stanične linije u nepromijenjenu kožu psorijatičara presađenu na SCID (od engl. severe combined immunodeficiency) miša autori su izazvali nastanak psorijatičnog plaka (147,149,150). Najnovija istraživanja Gilhara i suradnika (151) su također pokazala da injiciranje NK stanica izoliranih iz krvi psorijatičara u autolognu nepromijenjenu kožu dovodi do pojave prepoznatljive psorijatične histološke slike sa zadebljanjem epidermisa, te ispoljavanjem ICAM-1, CD1a i K-16 molekule (151).

Budući da je dokazano sazrijevanje oba limfocitna fenotipa u smjeru tipa 1, tj. tipa 1 pomagačkih limfocita T (Th1) i tipa 1 citotoksičnih limfocita T (Tc1), njihova uloga u patogenezi psorijaze nastojala se razjasniti lučenjem citokina kao što su IFN- $\gamma$ , te TNF- $\alpha$ , dok su citotoksični mehanizmi do sada ostali uglavnom neproučeni.

Uloga mehanizama stanične citotoksičnosti posredovanih perforinom dokazana je u odbacivanju stranog tkiva, autoimunosti, kontroli tumorskog rasta i kontroli virusnih infekcija, te infekcija intracelularnim patogenima. Povećana ekspresija perforinske molekule utvrđena je u LPK oboljelih od nekih autoimunih bolesti kao što je multipla skleroza, u sinovijalnoj tekućini oboljelih od reumatoidnog artritisa kao i u limfocitima, koji infiltriraju štitnu žlijezdu u autoimunom tiroiditisu (152-155). Novija istraživanja govore u prilog uključenosti ovih mehanizama i u imunopatogenezu psorijaze. Danas se sa sigurnošću zna da citotoksični limfociti T koriste najmanje dva puta za uništavanje ciljnih stanica: egzocitozu granula posredovanu perforinom i grenzimima, te Fas/FasL put. Iako su ispitivanja na miševima dokazala da mišji CD8+

limfociti T mahom koriste citotoksični put posredovan perforinom, a mišji CD4+ limfociti T većinom Fas/FasL put, istraživanja mehanizama stanične citotoksičnosti u ljudi ukazuju da egzocitoza granula predstavlja glavni put citotoksičnosti kako CD4+ tako i CD8+ limfocita T (156).

Rezultati naših istraživanja ukazuju na porast ukupnog broja perforin+ stanica među LPK u akutnom stadiju psorijaze u usporedbi s remisijom ( $p < 0,01$ ), što bi ukazivalo na postepeni pad broja ovih citotoksičnih stanica usporedno s evolucijom bolesti (Slika 1) (157). Nadalje smo izučavali ispoljavanje perforina u citotoksičnim limfocitima T, CD4+P+ i CD8+P+ stanice, s ciljem da pokušamo otkriti koja je populacija stanica bogata perforinom i aktivna u procesu bolesti *in vivo*. Rezultati su pokazali povećanu nazočnost CD3+P+ stanica u egzacerbaciji bolesti u usporedbi s remisijom ( $p < 0,01$ ) (slika 2). Taj porast se naročito odnosi na CD8+P+ subpopulaciju ( $p < 0,05$ ; akutni stadij prema remisiji) (slika 2). Također postoji i značajno veća nazočnost dvostruko pozitivnih NK stanica u akutnom stadiju bolesti u usporedbi s remisijom (slika 2).

CD8+P+ stanice su populacija CD8+ limfocita T sa citotoksičnim potencijalom sposobne da perforinskim putem brzo unište ciljnu stanicu koja nosi HLA molekulu razreda I i odgovarajući antigen. Dakle, ove stanice bi mogle sudjelovati u smanjivanju upalnog procesa prepoznavanjem psorijatičnih epitopa vezanih za HLA molekulu razreda I (157).

Nadalje, poput Behrenda i suradnika (158), dokazali smo da je udio CD8+ limfocita T među perforin+ limfocitima periferne krvi najveći u akutnom stadiju bolesti, dok se u remisiji smanjuje ( $p < 0,05$  i  $p < 0,01$  u odnosu na zdrave kontrole) (slika 4). Takvo smanjenje ove populacije stanica uz ostale nalaze ispoljavanja perforina govori u prilog mogućeg prijelaza perforin pozitivne populacije stanica iz cirkulacije u psorijatične lezije s popravljanjem kliničke slike, tj. prijelazom iz akutnog stadija u remisiju (157,158).

Ove nalaze o aktivnosti citotoksičnih limfocita T u perifernoj krvi nastojali smo potvrditi i nazočnošću P+ stanica u psorijatičnim lezijama imunohistokemijskim metodama. Yawalkar i suradnici su uočili ispoljavanje perforina u 5%, a grenzima B u 10% svih mononuklearnih stanica psorijatičnog žarišta, što je znatno više nego u nepromijenjenoj koži psorijatičara, te koži zdrave osobe (156,159). Ovi proteini su većinom nazočni u CD4+ i CD8+ stanicama, dok imunoreaktivnost za CD56 stanice nije nađena. Histološki, perforin je većinom bio nazočan u citoplazmi stanica smještenih



u dermisu, te na epidermodermalnoj granici (156,159). Iako je epidermis psorijatičnih kožnih žarišta visoko infiltriran CD8<sup>+</sup> stanicama, Yawalkar i suradnici gotovo da i nisu našli perforin pozitivne stanice u epidermisu psorijatičnih žarišta (156,159). Pozitivno obojene stanice su većinom nađene na mjestu jake spongioze i često u uskoj vezi s keratinocitima, od kojih su neki pokazivali znakove staničnog oštećenja (156,159).

S druge strane, naši rezultati govore u prilog tri puta većoj nazočnosti perforinske molekule u epidermisu, kako akutnog tako i kroničnog psorijatičnog plaka, u usporedbi s dermisom ( $p < 0,001$ ) (slika 23). Snažna ekspresija perforinske molekule uočava se u epidermisu oba psorijatična plaka u odnosu na nepromijenjenu i zdravu kožu ( $p < 0,05$  i  $p < 0,01$ ) (slika 21), iako većih razlika između plakova u različitim stadijima bolesti nismo zamijetili (slike 21 i 22).

Na pojedinim mjestima u imunohistološkim rezovima uočili smo i prodor upalnih stanica, većinom P<sup>+</sup>, iz dermisa u epidermis uz likvefakcijsku ili spongiformnu degeneraciju bazalnog sloja, te hidropske promjene keratinocita uočene također od strane Yawalkara i suradnika (slika 16) (156,159). Iste promjene uočili smo i bojanjem rezova na CD8 biljeg, te možemo pretpostaviti da se radi o skupini CD8<sup>+</sup>P<sup>+</sup> stanica.

Ispitivanjem drugog citolitičkog puta posredovanog Fas/FasL molekulama u psorijatičnom plaku uočili smo dvostruko veću nazočnost FasL molekule na stanicama kroničnog psorijatičnog plaka u usporedbi s akutnim plakom kako u epidermisu (slika 21) tako i u dermisu ( $p < 0,05$ ) (slika 22). Također se uočava i dvostruko veća nazočnost FasL molekule u epidermisu u odnosu na dermis u oba klinička stadija bolesti ( $p < 0,01$ ) (slika 23). S druge strane postotak ispoljavanja FasL molekule u nepromijenjenoj koži je gotovo jednak kao u akutnom plakom i zdravoj koži, te stoga mnogo manji u usporedbi sa kroničnim plakom kako u epidermisu tako i u dermisu (slike 21 i 22).

Trenutačno se malo toga zna o važnosti i regulaciji programirane stanične smrti u epidermisu zdrave i bolesne kože (18). Učinjena su brojna istraživanja da bi se utvrdilo da li zadebljanje plaka nastaje kao posljedica otpora apoptozi (18). Mjerenjem ispoljavanja antiapoptotičkih proteina, kao što su Bcl-x i Bcl-2, utvrđeno je da keratinociti psorijatičnog plaka pojačano ispoljavaju Bcl-x, ali ne i Bcl-2 proteine, što im omogućava povećanu otpornost na apoptozu u usporedbi s keratinocitima zdrave kože (18). Povećani opstanak keratinocita možda je povezan s IFN- $\gamma$ , budući da ovaj citokin može povećati razinu Bcl-x proteina u keratinocitima (18).

Sposobnost keratinocita u psorijatičnom plakom da se odupru apoptozi i rezultiraju patološkom proliferacijom otvara nekoliko pitanja od patofiziološke i

terapijske važnosti (18). Zbunjujuća činjenica imunobiologije psorijaze je sposobnost psorijatičnih keratinocita da se odupru apoptozi iako ispoljavaju Fas antigen (CD95 molekula), odnosno nakon izlaganja UV svjetlu ispoljavaju obje molekule, Fas i FasL (CD95L), a i u dodiru su s aktiviranim CD8<sup>+</sup> limfocitima T prisutnim u velikom broju u epidermisu (18). Objašnjenje je slijedeće. Bcl-x i drugi antiapoptotični proteini, koje stvaraju psorijatični keratinociti štite ove stanice od Fas posredovane apoptoze, dok su keratinociti zdrave kože osjetljivi na staničnu smrt (18). Stoga, terapijska primjena visokih doza UV-B zračenja na bolesnu kožu tjera intraepidermalne limfocite T u apoptozu, a psorijatični keratinociti ostaju zaštićeni zbog svog fenotipa otpornog na apoptozu (18).

U skupini eritematoskvamoznih bolesti, psorijazi po svojim kliničkim obilježjima kao i etiopatogenezi jako nalikuje lihen planus. Lihen planus je kronična autoimuna kožna bolest histološki obilježena vakuolarnom degeneracijom, te lizom i likvefakcijom bazalnih stanica (160). Smatra se da je histološka slika odraz imunološkog oštećenja bazalnih keratinocita u kožnim lezijama, te lezijama na sluznici usne šupljine (161). Međutim, imunološki procesi se odvijaju kako lokalno u lezijama tako i sistemski u perifernoj krvi (161).

Slično kao kod psorijaze, postoje oprečna mišljenja o prevlasti pojedinih limfocitnih subpopulacija u perifernoj krvi oboljelih od lihen planusa. Najraniji radovi ili ne spominju veće razlike u odnosu na zdravu populaciju (162) ili govore o smanjenju subpopulacije CD8<sup>+</sup> limfocita T (163) u odnosu na zdravu kontrolu. Kasniji radovi, međutim, spominju prevlast CD8<sup>+</sup> T-stanične populacije u perifernoj krvi oboljelih od lihen planusa (164) uz pad broja CD4<sup>+</sup> limfocita T (165) u odnosu na zdrave pojedince.

Sugerman i suradnici su utvrdili značajno smanjenje subpopulacije CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> limfocita T u perifernoj krvi oboljelih od oralnog lihen planusa u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu, dok je populacija CD4<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup> limfocita T značajno veća (166). Iz ovoga se vidi da je proporcija naivnih limfocita T smanjena, a povećana proporcija limfocita T s pamćenjem (CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>) (167).

U našim rezultatima ne nalazimo značajnije razlike u nazočnosti pojedinih limfocitnih subpopulacija periferne krvi između dva klinička stadija lihen planusa, kao ni NK stanica i ukupne količine perforin<sup>+</sup> stanica (slika 27). Međutim, metoda dvostrukog obilježavanja perforina i površinskih biljega omogućila nam je uvid u populaciju CD3<sup>+</sup>P<sup>+</sup> stanica i citotoksičnih CD8<sup>+</sup>P<sup>+</sup> stanica koje su daleko više

zastupljene u LPK akutnog stadija bolesti, nešto slabije u remisiji i najslabije u populaciji zdravih ljudi ( $p < 0,05$  i  $p < 0,01$ ) (slika 28). Ovi nalazi govore u prilog aktivne uključenosti citotoksičnih limfocita T u patogenezu lihen planusa. S druge pak strane, većih razlika u nazočnosti dvostruko pozitivnih NK stanica, kao druge važne skupine stanica, koje posreduju u reakcijama stanične citotoksičnosti, nismo zamijetili. Također, udio CD8+ stanica među P+ je najveći u akutnom stadiju bolesti, postepeno pada u stadiju remisije i kod zdravih osoba (slika 30). Ispoljavanje perforina u LPK oboljelih od lihen planusa do sada nije ispitivano od strane drugih autora.

Ispitivanja kožnih lezija oboljelih od lihen planusa ukazuju na prevlast CD4+ limfocita T nad CD8+ (168,169,170). Oko 40% CD4+ limfocita T se nalazi na epidermodermalnoj granici, te 80% u dermisu (170). Mozzanica i suradnici su uočili jaki stanični infiltrat sastavljen većinom od CD3+ limfocita T na epidermodermalnoj granici, te u papilarnom i retikularnom dermisu (171). Postoji prevlast CD4+ limfocita T nad CD8+ limfocitima T u lezijama uz rijetke CD56+ stanice u dermisu (171). CD8+ T limfociti su pretežno smješteni u papilarnom dermisu i u epidermisu, udruženi s hidropskom degeneracijom bazalnih stanica (169,172), te orjentirani prema degeneriranim keratinocitima u epidermisu (173).

Mi smo također zapazili snažnu infiltraciju limfocita T oba fenotipa u lezijama lihen planusa u usporedbi s nepromijenjenom kožom oboljelih ( $p < 0,05$ ), te kožom zdravih osoba ( $p < 0,01$ ) (slika 33). Dok je postotak CD4+ limfocita T gotovo jednak u epidermisu i dermisu promijenjene kože, postotak CD8+ limfocita T je znatno veći u epidermisu u usporedbi s dermisom ( $p < 0,01$ ) (slika 35). NK stanice su zastupljene u malom postotku u lihenskim papulama (oko 25%) bez veće razlike u nazočnosti ovih stanica između epidermisa i dermisa. U nepromijenjenoj koži nazočnost limfocita T oba fenotipa, te NK stanica je vrlo mala i odgovara nazočnosti ovih stanica u zdravoj koži.

Slično je i sa citolitičkim molekulama perforinom i FasL-om. Dvostruko više perforin+ stanica nalazimo u promijenjenoj koži u oba sloja u usporedbi s nepromijenjenom i zdravom kožom ( $p < 0,05$ ) (slike 40 i 41). Slično kao u psorijaze, na imunohistokemijskim rezovima promijenjene kože primijetili smo prodor perforin+ stanica iz dermisa u epidermis na mjestu likvefakcijske degeneracije bazalnog sloja, te hidropske promjene keratinocita. Budući da smo kao i još neki autori na mjestu likvefakcijske degeneracije uočili i nakupljanje CD8+ limfocita T, može se i ovdje nagađati da se radi o citotoksičnim CD8+P+ limfocitima T (169,172). S druge strane, FasL molekula je nešto jače zastupljena na stanicama dermisa kožnih lezija u usporedbi

s nazočnošću te molekule u dermisu nepromijenjene kože oboljelih i zdrave kože (slika 41).

Ispoljavanje citolitičkih molekula perforina i grenzima u kožnim promjenama oboljelih od lihen planusa ispitivali su još jedino Shimizu i suradnici (76). Oni su također dokazali povećan udio kako perforin+ tako i grenzim B+ stanica u lezijama lihen planusa u usporedbi s nepromijenjenom kožom oboljelih, te zdravom kožom (76). Oštećenje bazalnih keratinocita, te nakupljanje mononuklearnih stanica u papilarnom dermisu se histološki očituje stvaranjem koloidnih tjelešaca, tzv. Civatteova tjelešca (76). Oni su primjer apoptotičnog propadanja keratinocita u epidermisu (76). Shimizu i suradnici su dokazali da je limfocitni infiltrat smješten usko uz apoptotične stanice i tjelešca. Većina CD8+ limfocita T prisutnih u infiltratima ispoljava perforin, odnosno grenzim B (76).

Do sličnih rezultata došli su i Khan i suradnici (174), te Neppelberg i suradnici (175), koji su izučavali lihenske promjene na sluznici usne šupljine (174,175). Većina subepitelnih i intraepitelnih mononuklearnih stanica u oralnim lezijama oboljelih su CD8+ limfociti T, dok su CD4+ stanice dokazane u dubokoj lamini propriji (174). Intraepitelne CD8+ stanice su usko vezane za oštećene keratinocite (174). Postoji snažna ekspresija Fas/FasL u bazalnoj regiji, na mjestima upalnog staničnog infiltrata (175).

Na temelju navedenih spoznaja o imunopatogenezi psorijaze i lihen planusa vidimo da se radi o vrlo složenim i dinamičnim procesima u kojima citolitički mehanizmi nedvojbeno igraju značajnu ulogu. Porast broja citotoksičnih CD8+ limfocita T bogatih perforinom dokazali smo kako u perifernoj krvi tako i u lezijama obje kožne bolesti. Njihovo nakupljanje u kožnim promjenama, te način njihove aktivacije su većinom jasni, ali ostaje još otvoreno pitanje ciljnih stanica prema kojima je usmjerena njihova citolitička aktivnost. Napredak u poznavanju izvršnog dijela stanične citotoksičnosti u psorijatičnom plaku, tj. lihenskoj papuli omogućio bi ne samo bolji uvid u imunopatogenezu ove dvije autoimune kožne bolesti, nego i mogućnost terapijskog djelovanja na određene citolitičke molekule i njihove receptore, što uspostavlja potpuno novi pristup u kontroli upale i epidermalne hiperproliferacije.

Iako se imunološka događanja, koja prate psorijazu proučavaju već nekoliko desetljeća, te nešto kraće ista događanja vezana uz lihen planus, još su uvijek dijelovi ove složene priče, odnosi između pojedinih stanica i njihovih produkata ostali



prepušteni nadolazećim idejama i istraživanjima koja će omogućiti bolje poznavanje i liječenje ovih bolesti.

## 6. ZAKLJUČCI

Radi boljeg pregleda najvažnije zaključke smo podijelili u dvije grupe ovisno o proučavanoj bolesti

Zaključci vezani uz psorijazu:

1. U perifernoj krvi psorijatičara u akutnom stadiju bolesti postotak CD8+ limfocita T i NK stanica, te P+ stanica je značajno veći nego u remisiji.
2. Većinu P+ stanica periferne krvi čine citotoksični limfociti T (CD3+P+ stanice i njihova subpopulacija CD8+P+ stanice) kao i CD56+P+ stanice, koje su također značajno više zastupljene u akutnom stadiju bolesti u odnosu na remisiju.
3. Postotak citotoksičnih limfocita T, te perforin+ stanica u psorijatičnom plaku je značajno veći u odnosu na nepromijenjenu kožu istih bolesnika i zdravu kožu.
4. Postoji dvostruko veća nazočnost FasL molekule u kroničnom psorijatičnom plaku u odnosu na akutni.
5. Promatrajući po kožnim slojevima, CD8+ limfociti T, te citolitičke molekule perforin i FasL, više su zastupljene u epidermisu psorijatičnog plaka u odnosu na dermis.
6. Imunohistokemijskim bojanjem preparata dokazali smo prodor citotoksičnih CD8+ stanica, od kojih je većina P+, iz dermisa u epidermis uz destrukciju bazalnog sloja epidermisa, što se histološki očituje likvefakcijskom, tj. spongiformnom degeneracijom bazalnog sloja i hidropskom promjenom preostalih keratinocita.
7. Među antigen predočnim stanicama, CD1a+ nezrele dendritične stanice nazočne su većinom u epidermisu akutnog psorijatičnog plaka, dok CD83+ zrele dendritične stanice prevladavaju u infiltratima dermisa.

8. Većina CD56+ stanica u perifernoj krvi akutnog stadija psorijaze i psorijatičnom plaku su ujedno i CD16+ stanice, što bi govorilo u prilog moguće uloge antitijelima posredovane stanične citotoksičnosti (ADCC).

Zaključci vezani uz lihen planus:

1. U perifernoj krvi oboljelih od lihen planusa, u akutnom stadiju bolesti, dokazali smo veći postotak limfocita T, naročito citotoksične podvrste CD8+P+ limfocita T, u odnosu na remisiju.
2. U kožnim lezijama oboljelih od lihen planusa postotak citotoksičnih limfocita T, te perforin+ i FasL+ stanica je znatno veći u odnosu na nepromijenjenu kožu oboljelih, te zdravu kožu.
3. CD8+ limfociti T, kao i perforin+ stanice dominiraju u epidermisu lihenske papule u usporedbi s dermisom.
4. Na imunohistokemijskim slikama lihen planusa također smo zamijetili prodor P+ stanica iz dermisa u epidermis uz likvefakcijsku, tj. spongiformnu degeneraciju bazalnog sloja i hidropsku promjenu preostalih keratinocita.

## 7. LITERATURA

1. Braun-Falco O. Psoriasis vulgaris. U: Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH, Burgdorf WHC, ur. *Dermatology*. Berlin/Heidelberg/New York: Springer-Verlag. 2000; str. 585-608.
2. Pašić A. Eritemoskvamozne i papulozne dermatoze. U: Lipozenčić i sur. *Dermatovenerologija*. Zagreb: Naklada Zadro, 1999; str. 136-149.
3. Brenner W, Gschnait F, Mayr WR. HLA-B13, B17, B37 and Cw6 in psoriasis vulgaris. association with the age of onset. *Arch Dermatol Res* 1978; 262: 337-339.
4. Schmidt-Egenolf M, Eiermann TH, Boehncke WH, Stander M, Sterry W. Familial juvenile onset psoriasis is associated with the human leukocyte antigens (HLA) class I side of the extended haplotype Cw6-B57-DRB1\*0701-DQA1\*02021-DQB1\*0303: a population and family based study. *J Invest Dermatol* 1996; 106: 711-714.
5. Ortonne JP. Recent developments in the understanding of the pathogenesis of psoriasis. *Br J Dermatol* 1999; 140 (Suppl. 54): 1-7.
6. Christophers E, Mrowietz U. Psoriasis U: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K i sur. *Fitzpatrick's dermatology in general medicine*, 5. izdanje. New York: McGraw-Hill, 1999; str. 495-521.
7. Habif TP. Psoriasis. U: Habif TP. *Clinical dermatology*, 3. izdanje. Saint Louis Mosby, 1996; str. 190-220.
8. Bos JD, De Rie MA. The pathogenesis of psoriasis: immunological facts and speculations. *Immunol Today* 1999; 20; 40-46.
9. Bata-Csoro Z, Hammerberg C, Voorhees JJ, Cooper KD. Flow cytometric identification of proliferative subpopulations within normal human epidermis and the localisation of the primary hyperproliferative population in psoriasis. *J Exp Med* 1993; 178: 1271-1281.
10. Bata-Csorgo Z, Hammeerberg C, Voorhees JJ, Cooper KD. Intralesional T lymphocyte activation as a mediator of psoriatic epidermal hyperplasia. *J Invest Dermatol* 1995; 105: 89S-94S.
11. Lavker RM, Sun TT. Epidermal stem cells. *J Invest Dermat* 1983; 81: 121s-127s.



12. Latkowski JM, Freedberg IM. Epidermal cell kinetics, epidermal differentiation, and keratinization. U: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K i sur. Fitzpatrick's dermatology in general medicine, 5<sup>th</sup> edition. New York: McGraw-Hill, 1999; str. 133-144.
13. Bos JD, Hagenaars C, Das PK, Krieg SR, Voorn WJ, Kapsenberg ML. Predominance of "memory" T cells (CD4+, CDw29+) over "naive" T cells (CD4+, CD45R+) in both normal and diseased human skin. *Arch Dermatol Res* 1989; 281: 24-30.
14. De Rie MA, Cairo I, Van Lier RAW, Bos JD. Expression of the T-cell activation antigens CD27 and CD28 in normal and psoriatic skin. *Clin Exp Dermatol* 1996; 21: 104-111.
15. De Boer OJ, Van der Loos CM, Hamerlinck F, Bos JD, Das PK. Reappraisal of in situ immunophenotypic analysis of psoriasis skin: interaction of activated HLA-DR<sup>+</sup> immunocompetent cells and endothelial cells is a major feature of psoriatic lesions. *Arch Dermatol Res* 1994; 286: 87-96.
16. Christophers E. The immunopathology of psoriasis. *Int Arch Allergy Immunol* 1996; 110: 199-206.
17. Baker BS, Swain AF, Fry L, Valdimarsson H. Epidermal T lymphocytes and HLA-DR expression in psoriasis. *Br J Dermatol* 1984; 110: 555-564.
18. Nickoloff BJ. The immunologic and genetic basis of psoriasis. *Arch Dermatol* 1999; 135: 1104-1110.
19. Uyemura K, Yamamura M, Fivenson DF, Modlin RL, Nickoloff BJ. The cytokine network in lesional and lesion-free psoriatic skin is characterized by a T-helper type 1 cell-mediated response. *J Invest Dermatol* 1993; 101: 701-705.
20. Schlaak JF, Buslau M, Jochum W i sur. T cells involved in psoriasis vulgaris belong to the Th1 subset. *J Invest Dermatol* 1994; 102: 145-149.
21. Barna M, Snijdwint FGM, van der Heijden FL, Bos JD, Kapsenberg ML. Characterization of lesional psoriatic skin T lymphocyte clones. *Acta Derm Venereol (Stockh)* 1994; 186: 9-11.
22. Vollmer S, Menssen A, Trommler P, Schendel D, Prinz JC. T lymphocytes derived from skin lesions of patients with psoriasis vulgaris express a novel cytokine pattern that is distinct from that of T helper type 1 and T helper type 2 cells. *Eur J Immunol* 1994; 24: 2337-2382.

23. Lewis HM, Baker BS, Bokth S i sur. Restricted T-cell receptor V $\beta$  gene usage in the skin of patients with guttate and chronic plaque psoriasis. *Br J Dermatol* 1993; 129: 514-520.
24. Vekony MA, Holder JE, Lee AJ, Horrocks C, Eperon IC, Camp RDR. Selective amplification of T-cell receptor variable region species is demonstrable but not essential in early lesions of psoriasis vulgaris: Analysis by anchored polymerase chain reaction and hypervariable region size spectratyping. *J Invest Dermatol* 1997; 109: 5-13.
25. Menssen A, Trommler P, Vollmer S i sur. Evidence for an antigen-specific cellural immune response in skin lesions of patients with psoriasis vulgaris. *J Immunol* 1995; 155: 4078-4083.
26. Chang JCC, Smith LR, Froning KJ i sur. CD8<sup>+</sup> T cells in psoriatic lesions preferentially use T-cell receptor V $\beta$ 3 and/or V $\beta$ 13.1 genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 9282-9286.
27. Boehncke WH, Kúenzlen C, Zollner TM i sur. Predominant usage of distinct T-cell receptor V $\beta$  regions by epidermotropic T cells in psoriasis. *Exp Dermatol* 1994; 3: 161-163.
28. Strange P, Cooper KD, Hansen ER i sur. T-lymphocyte clones initiated from lesional psoriatic skin release growth factors that induce keratinocyte proliferation. *J Invest Dermatol* 1993; 101:695-700.
29. Bata-Csorgo Z, Hammerberg C, Voorhees JJ, Cooper KD. Kinetics and regulation of human keratinocyte stem cell growth in short-term primary ex vivo culture. *J Clin Invest* 1995; 95: 317-327.
30. Wrone-Smith T, Nickoloff BJ. Dermal injection of immunocytes induces psoriasis. *J Clin Invest* 1996; 98: 1878-1887.
31. Strange P, Skov L, Baadsgaard O. Interferon gamma-treated keratinocytes activate T cells in the presence of superantigens: involvement of major histocompatibility complex class II molecules. *J Invest Dermatol* 1994; 102:150-154.
32. Skov L, Baadsgaard O. Bacterial superantigens and inflammatory skin diseases. *Clin and Exp Dermatol* 2000; 25: 57-61.
33. Valdimarsson H, Baker BS, Jonsdottir I, Powles A, Fry L. Psoriasis: a T-cell-mediated autoimmune disease induced by streptococcal superantigens? *Immunol Today* 1995; 16: 145-149.

34. Baker BS, Bokth S, Powles A i sur. Group A streptococcal antigen-specific T lymphocytes in guttate psoriatic lesions. *Br J Dermatol* 1993; 128: 493-499.
35. Leung DYM, Walsh P, Giorno R, Norris DA. A potential role for superantigens in the pathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol* 1993; 100: 225-228.
36. Leung DYM, Gately M, Trumble A, Ferguson-Darnell B, Schlievert PM, Picker LJ. Bacterial superantigens induce T cell expression of the skin- selective homing receptor, the cutaneous lymphocyte associated antigen via stimulation of interleukin 12 production. *J Exp Med* 1995; 181: 747-753.
37. Boehncke WH, Dressel D, Manfras B i sur. T-cell- receptor repertoire in chronic plaque- stage psoriasis is restricted and lacks enrichment of superantigen- associated V $\beta$  regions. *J Invest Dermatol* 1995; 104: 725-728.
38. Norris DA, Travers JB, Leung DYM. Lymphocyte activation in the pathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol* 1997; 109: 1-4.
39. Camp RDR, Vekony MA. Antigen receptor  $\beta$  chain variable region usage by CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in psoriasis. *J Invest Dermatol* 1998; 110: 987-988.
40. Chang JCC, Smith LR, Froning KJ i sur. Persistence of T-cell clones in psoriatic lesions. *Arch Dermatol* 1997; 133: 703-708.
41. McFadden J, Valdimarsson H, Fry L. Cross-reactivity between streptococcal M surface antigen and human skin. *Br J Dermatol* 1991; 125: 343-347.
42. Swerlick RA, Cunningham MW, Hall NK. Monoclonal antibodies cross-reactive with group A streptococci and normal and psoriatic human skin. *J Invest Dermatol* 1986; 87: 367-371.
43. Gilhar A, David M, Ullmann Y, Berkutski T, Kalish RS. T-lymphocyte dependence of psoriatic pathology in human psoriatic skin grafted to SCID mice. *J Invest Dermatol* 1997; 109: 283-288.
44. Nickoloff BJ, Wrone-Smith T. Superantigens, autoantigens, and pathogenic T cells in psoriasis. *J Invest Dermatol* 1998; 110: 459-460.
45. Nickoloff BJ, Wrone-Smith T. Animal models of psoriasis. *Nat Med* 1997; 3: 475-476.
46. Iversen OJ, Nissen-Meyjer J, Dalen AB. Characterization of virus-like particles from a psoriatic patient with respect to the possible presence of particle-associated RNA and RNA-directed DNA polymerase. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 1983; 91: 413-417.

47. Leung DYM, Walsh P, Storno R, Norris DA. *J Invest Dermatol* 1993; 100: 225-228
48. Krueger JG, Krane JF, Carter DM, Gottlieb AB. Role of growth factors, cytokines and their receptors in the pathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol* 1990; 94: 135s-140s.
49. Nanney LB, Stoscheck CM, Magid M, King LE. Altered [<sup>125</sup>I] epidermal growth factor binding and receptor distribution in psoriasis. *J Invest Dermatol* 1986; 86: 260-265.
50. Neuner P, Kapp A, Kirnbauer R, Schwartz T, Krutmann J, Luger TA. Monocytes derived from patients with psoriasis synthesize and release increased levels of interleukin 6. *J Invest Dermatol* 1989; 92: 490.
51. Krueger J, Krane J, Gottlieb AB i sur. Cytokine modulator of epithelial function: contrasting effects of interleukin-6/B2-interferon and gamma-interferon on human keratinocyte growth and differentiation. *J Invest Dermatol* 1989; 92: 464.
52. Kupper TS, Blanton B, Wong D, Sims J, Dower S. The keratinocyte interleukin 1 receptor: molecular, biochemical and functional analysis. *J Invest Dermatol* 1989; 92: 466.
53. Nickoloff BJ, Basham TY, Merigan TC, Morhenn VB. Antiproliferative effects of recombinant alpha and gamma-interferons on cultured human keratinocytes. *Lab Invest* 1984; 51: 697-701.
54. Nickoloff BJ, Mitra RS, Elder JT, Fisher GJ, Voorhees JJ. Decreased growth inhibition by recombinant gamma interferon is associated with increased transforming growth factor-alpha production in keratinocytes cultured from psoriatic lesions. *Br J Dermatol* 1989; 121: 161-174.
55. Fierlbeck G, Rassner G, Muller C. Psoriasis induced at the injection site of recombinant interferon gamma. *Arch Dermatol* 1990; 126: 351-355.
56. Griffiths CEM, Voorhees JJ, Nickoloff BJ. Characterization of intercellular adhesion molecule-1 and HLA-DR expression in normal and inflamed skin: modulation by recombinant gamma interferon and tumor necrosis factor. *J Am Acad Dermatol* 1989; 20: 617-629.
57. Buchsbaum ME, Lewis RE, Kupper TS, Murphy GF. Differential induction of intercellular adhesion molecule-1 in human skin by recombinant cytokines. *J Invest Dermatol* 1989; 92: 408.



58. Barker J, Allen MH, MacDonald DM. The effect of in vivo interferon-gamma on the distribution of LFA-1 and ICAM-1 in normal human skin. *J Invest Dermatol* 1989; 93: 439-442.
59. Issekutz TB, Stoltz JM, van der Meide P. The recruitment of lymphocytes into the skin by T cell lymphokines: the role of gamma-interferon. *Clin Exp Immunol* 1988; 73: 70-75.
60. Bjerke JR, Livden JK, Degre M, Matre R. Interferon in suction blister fluid from psoriatic lesions. *Br J Dermatol* 1983; 108: 295-299.
61. Nickoloff BJ. The cytokine network in psoriasis. *Arch Dermatol* 1991; 127: 871-884.
62. De Boer OJ, Wakelkamp IMMJ, Pals ST, Claessen N, Bos JD, Das PK. Increased expression of adhesion receptors in both lesional and non-lesional skin. *Arch Dermatol Res* 1994; 286: 304-311.
63. Rossiter H, Van Reijssen F, Mudde GC, Kalthoff F, Carla AFN. Skin disease-related T cell bind to endothelial selectins: expressions of cutaneous lymphocyte antigen (CLA) predicts E-selectin but not P-selectin binding. *Eur J Immunol* 1994; 24: 205-210.
64. Braun-Falco O. Lichen planus. U: Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH, Burgdorf WHC, ur. *Dermatology*. Berlin/Heidelberg/New York: Springer-Verlag, 2000; str. 585-608.
65. Daoud MS, Pittelkow MR. Lichen planus. U: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K i sur. *Fitzpatrick's dermatology in general medicine*, 5. izdanje. New York: McGraw-Hill, 1999; str. 561-577.
66. Habif TP. Lichen planus. U: Habif TP, ur. *Clinical dermatology*, 3. izdanje. Saint Louis: Mosby, 1996; str. 221-227.
67. Lipozenčić J. Lichen planus. U: Lipozenčić J i sur. *Dermatovenerologija*. Zagreb: Naklada Zadro, 1999; str. 148.
68. Porter SR, Kirby A, Olsen I, Barrett W. Immunologic aspects of dermal and oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Oral Endod* 1997; 83: 358-366.
69. Matthews JB, Scully CM, Potts AJ. Oral lichen planus: an immunoperoxidase study using monoclonal antibodies to lymphocyte subsets. *Br J Dermatol* 1984; 111: 587-595.

70. Bhan AK, Harrist TJ, Murphy GF, Mihm MC. T cell subsets and Langerhans cells in lichen planus: in situ characterization using monoclonal antibodies. *Br J Dermatol* 1981; 105: 617-622.
71. Buechner SA. T cell subsets and macrophages in lichen planus. *Dermatologica* 1984; 169: 325-329.
72. Takeuchi Y, Tohnai I, Kaneda T, Nagura H. Immunohistochemical analysis of cells in mucosal lesions of oral lichen planus. *J Oral Pathol* 1988; 17: 367-373.
73. Robertson WD, Wray D. Immunohistochemical study of oral keratoses including lichen planus. *J Oral Pathol Med* 1993; 22: 180-182.
74. Al-Fouzan AS, Habib MA, Sallam TH, El-Samahy MH, Rostom AI. Detection of T lymphocytes and T lymphocyte subsets in lichen planus: in situ and in peripheral blood. *Int J Dermatol* 1996; 35: 426-429.
75. Yamamoto T, Yoneda K, Ueta E, Osaki T. Cellular immunosuppression in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 1990; 19: 464-470.
76. Shimizu M, Higaki Y, Higaki M, Kawashima M. The role of granzyme B-expressing CD8-positive T cells in apoptosis of keratinocytes in lichen planus. *Arch Dermatol Res* 1997; 289: 527-532.
77. Gadenne AS, Strucke R, Dunn D, Wagner M, Bleicher P, Bigby M. T-cell lines derived from lesional skin of lichen planus patients contain a distinctive population of T-cell receptor gamma/delta-bearing cells. *J Invest Dermatol* 1994; 103: 347-351.
78. Sugeran PB, Savage NW, Seymour GJ. Phenotype and suppressor activity of T-lymphocyte clones extracted from lesions of oral lichen planus. *Br J Dermatol* 1994; 131: 319-324.
79. Michie SA, Abel EA, Hoppe RT, Warnke RA, Wood GS. Expression of T-cell receptor antigens in mycosis fungoides and inflammatory skin lesions. *J Invest Dermatol* 1989; 93: 116-120.
80. Dupruy P, Heslan M, Fraitag Shercend T, Duberter L, Bagot M. T-cell receptor-gamma/delta bearing lymphocytes in normal and inflammatory human skin. *J Invest Dermatol* 1990; 94: 764-768.
81. Alaibac M, Morris J, Yu R, Chu AC. T lymphocytes bearing the gamma/delta receptor: a study in normal human skin and pathological skin conditions. *Br J Dermatol* 1992; 127: 458-462.

82. Karagouni EE, Dotkika EN, Sklavounou A. Alteration in peripheral blood mononuclear cell function and serum cytokines in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 1994; 23: 28-35.
83. Yamamoto T, Osaki T, Yoneda K, Ueta E. Cytokine production by keratinocytes and mononuclear infiltrates in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 1994; 23: 309-315.
84. Yamamoto T, Yoneda K, Ueta E, Hirota J, Osaki T. Serum cytokine levels in patients with oral mucous membrane disorders. *J Oral Pathol Med* 1991; 20: 275-279.
85. Jontell M, Hansson HA, Nygren H. Mast cells in oral lichen planus. *J Oral Pathol* 1986; 15: 273-275.
86. Eversole LR. Immunopathogenesis of oral lichen planus and recurrent aphthous stomatitis. *Sem Cut Med Surg* 1997; 16: 284-294.
87. Tosca A, Varelzidis A, Michalopoulos M, Georgala S, Statigos J. In situ identification of mononuclear cells in lichen planus. *Dermatologica* 1983; 167: 113-120.
88. Regezi JA, Stewart JCB, Lloyd RV, Headington JT. Immunohistochemical staining of Langerhans cells and macrophages in oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1985; 60: 396-402.
89. Pigala-Arachchi A, Crane IJ, Scully C, Prime SS. Epithelial dendritic cells in pathological human oral tissues. *J Oral Pathol Med* 1989; 18: 11-16.
90. Rich AM, Reade PC. A quantitative assessment of Langerhans cells in oral mucosal lichen planus and leukoplakia. *Br J Dermatol* 1989; 120: 223-228.
91. Eversole LR, Dam J, Ficarra G, Hwang Cy. Leukocyte adhesion molecules in oral lichen planus: a T-cell mediated immunopathologic process. *Oral Microbiol Immunol* 1994; 9: 376-383.
92. Berke G. The CTL's kiss of death. *Cell* 1995; 81: 9-12.
93. Shresta S, Pham CTN, Thomas DA, Graubert TA, Ley TJ. How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Curr Opin in Immunol* 1998, 10: 581-587.
94. Harty JT, Tvinnereim AR, White DW. CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 275-308.
95. Pham CTN, Ley TJ. The role of granzyme B cluster proteases in cell-mediated cytotoxicity. *Sem Immunol* 1997; 9: 127-133.

96. Rukavina D, Balen Marunić S, Prpić L. The role of perforin mediated cytotoxicity in infections. *Med Razgl* 2000; 39: 95-100.
97. Podack ER, Young JD, Cohn ZA. Isolation and biochemical and functional characterisation of perforin 1 from cytolytic T-cell granules. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 8629-8633.
98. Young JD, Liu CC, Leong LG, Cohn ZA. The pore-forming protein (perforin) of cytolytic T lymphocytes is immunologically related to the components of membrane attack complex of complement through cysteine-rich domains. *J Exp Med* 1986; 164: 2077-2082.
99. Liu CC, Persechini PM, Young JDE. Perforin and lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Immun Rev* 1995; 146: 145-175.
100. Yanelli JR, Sullivan JA, Mandell GL, Engelhard VH. Reorientation and fusion of cytotoxic T lymphocyte granules after interaction with target cell as determined by high resolution cinemicrography. *J Immunol* 1986; 136: 377-382.
101. Young JD, Podack ER, Cohn ZA. Properties of purified pore-forming protein (perforin 1) isolated from H-2-restricted cytotoxic T cell granules. *J Exp Med* 1986; 164: 144-155.
102. Young JD, Nathan CF, Podack ER, Palladino MA, Cohn ZA. Functional channel formation associated with cytotoxic T- cell granules. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 150-154.
103. Young JD, Hengartner H, Podack ER, Cohn ZA. Purification and characterisation of a cytolytic pore-forming protein from granules of cloned lymphocytes with natural killer activity. *Cell* 1986; 44: 849-859.
104. Young JD, Cohn ZA, Podack ER. The ninth component of complement and the pore-forming protein (perforin 1) from cytotoxic T cells: structural, immunological, and functional similarities. *Science* 1986; 233: 184-190.
105. Kam CM, Hudig D, Powers JC. Granzymes (lymphocyte serine proteases): characterization with natural and synthetic substrates and inhibitors. *Bioch et Biophysica Acta* 2000; 1477: 307-323.
106. Talento A, Nguyen M, Law S i sur. Transfection of mouse cytotoxic T lymphocyte with an antisense granzyme A vector reduces lytic activity. *J Immun* 1992; 149: 4009-4015.



107. Heusel JW, Wesselschmidt RL, Shresta S, Russell JH, Ley TJ. Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogenic target cells. *Cell* 1994; 76: 977-987.
108. Shiver JW, Su L, Henkart PA. Cytotoxicity with target DNA breakdown by rat basophilic leukemia cells expressing both cytolysin and granzyme A. *Cell* 1992; 71: 315-322.
109. Trapani JA, Davis J, Sutton VR, Smyth MJ. Proapoptotic functions of cytotoxic lymphocyte granule constituents in vitro and in vivo. *Curr Opin Immunol* 2000; 12: 323-329.
110. Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am J Med* 1999; 107: 489-506.
111. Darmon AJ, Ley TJ, Nicholson DW, Bleackley RC. Cleavage of CPP32 granzyme B represents a critical role for granzyme B in the induction of target cell DNA fragmentation. *J Biological Chemistry* 1996; 271: 21709-21712.
112. Duan H, Orth K, Chinnaiyan AM, Poiriers GG, Froelich CJ, He WW, Dixit VM. ICE-LAP6, a novel member of the ICE/Ced-3 gene family, is activated by the cytotoxic T cell protease granzyme B. *J Biological Chemistry* 1996; 271: 16720-16724.
113. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997; 88: 355-365.
114. Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF- receptor-induced cell death. *Cell* 1996; 85: 803-815.
115. Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC I sur. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 1996; 85: 817-827.
116. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW i sur. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996; 87: 171.
117. Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 1996; 84: 299-308.
118. Hsu H, Xiong J, Dgoeddel DV. The TNF receptor 1- associated protein TRADD signals cell death and NF- $\kappa$ B activation. *Cell* 1995, 81: 495-504.

119. Kidd VJ, Lahti JM, Teitz T. Proteolytic regulation of apoptosis. *Cell Dev Biol* 2000; 11: 191-201.
120. Hsu H, Huang J, Shu HB, Baichwal V, Goeddel D. TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity* 1996; 4: 387-96.
121. Duan H, Dixit VM. RAIDD is a new death adaptor molecule. *Nature* 1997; 385: 86-9.
122. Fridriksson T, Pettersson U. Severe psoriasis-oral therapy with a new retinoid. *Dermatologica* 1978; 157: 238-244.
123. Krueger JG. The immunologic basis for the treatment of psoriasis with new biologic agents. *J Am Acad Dermatol* 2002; 46: 1-23.
124. Faure M, Thivolet J. Use of monoclonal antibodies specific for T cell subsets in cutaneous disorders: I. Quantitative analysis of peripheral blood lymphocytes. *J Clin Immunol* 1982; 2 (Suppl 3): 103S-110S.
125. Moscicki RA, Morison WL, Parrish JA, Bloch KJ, Colvin RB. Reduction of the fraction of circulating helper-inducer T cells identified by monoclonal antibodies in psoriatic patients treated with long-term psoralen/ultraviolet-A radiation (PUVA). *J Invest Dermatol* 1982; 79: 205-208.
126. Willemze R, Damsteeg WJ, Meijer CJ. Distribution of T-cell subpopulations in the peripheral blood of patients with erythrodermic psoriasis. *Arch Dermatol Res* 1985; 277: 19-23.
127. DePietro WP, Berger CL, Harber LC, Edelson RL. Normal numbers of phenotypic helper, suppressor, and total T cell populations in psoriasis vulgaris: quantitation by monoclonal antibodies. *J Am Acad Dermatol* 1981; 5: 304-307.
128. Barker BS, Swain AF, Valdimarsson H, Fry L. T-cell subpopulations in the blood and skin of patients with psoriasis. *Br J Dermatol* 1984; 110: 37-44.
129. Rubins AY, Merson AG. Subpopulation of T lymphocytes in psoriasis patients and their changes during immunotherapy. *J Am Acad Dermatol* 1987; 17: 972-977.
130. Paukkonen K, Naukkarinen A, Horsmanheimo M. The development of manifest psoriatic lesions is linked with the invasion of CD8+ T cells and CD11c+ macrophages into the epidermis. *Arch Dermatol Res* 1992; 284: 375-379.
131. Ramirez-Bosca A, Martinez-Ojeda L, Valcuende-Cavero F, Castelas-Rodellas A. A study of local immunity in psoriasis. *Br J Immunol* 1988; 119: 587-595.

132. Hammar H, Gu SQ, Johannesson A, Sundkvist KG, Biberfeld P. Subpopulations of mononuclear cells in microscopic lesions of psoriatic patients. Selective accumulation of suppressor/cytotoxic T cells in epidermis during the evolution of the lesions. *J Invest Dermatol* 1984; 83: 416-420.
133. Prinz JC. Which T cells cause psoriasis? *Clin and Exp Dermatol* 1999; 24: 291-295.
134. Karasek MA. Progress in our understanding of the biology of psoriasis. *Cutis* 1999; 64: 319-322.
135. Koga T, Duan H, Urabe K, Furue M. In situ localization of CD83-positive dendritic cells in psoriatic lesions. *Dermatology* 2002; 204: 100-103.
136. Mitra RS, Judge TA, Nestle FO, Turka LA, Nickoloff BJ. Psoriatic skin-derived dendritic cell function is inhibited by exogenous IL-10. Differential modulation of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression. *J Immunol* 1995; 154: 2668-2677.
137. Nickoloff BJ, Nestle FO, Zheng XG, Turka LA. T lymphocytes in skin lesions of psoriasis and mycosis fungoides express B7-1: a ligand for CD28. *Blood* 1994; 83: 2580-2586.
138. Cameron AL, Kirby B, Griffiths CE. Circulating natural killer cells in psoriasis. *Br J Dermatol* 2003; 149: 160-164.
139. Bos JD, Hulsebosch HJ, Krieg SR, Bakker PM, Cormane RH. Immunocompetent cells in psoriasis. In situ immunophenotyping by monoclonal antibodies. *Arch Dermatol Res* 1983; 275: 181-189.
140. Cameron AL, Kirby B, Fei W, Griffiths CEM. Natural killer and natural killer-T cells in psoriasis. *Arch Dermatol Res* 2002; 294: 363-369.
141. Jansen CT, Viander M. Basic and interferon-augmented natural killer (NK) activity in psoriasis. *Acta Derm Venereol* 1983; 63: 384-387.
142. Armstrong RD, Panayi GS. Natural killer cell activity in inflammatory joint disease. *Clin Rheumatol* 1983; 2: 243-249.
143. Majewski S, Wasik M, Jablonska S, Kaminski M, Fraczykowska M. Defective natural killer- and killer-cell activity associated with increased polymorphonuclear leukocyte adherence in psoriasis. *Arch Dermatol Res* 1986; 278: 264-269.

144. Herlin T, Kragballe K. Enhanced monocyte and neutrophil cytotoxicity and normal cyclic nucleotide levels in severe psoriasis. *Br J Dermatol* 1981; 105: 405-413.
145. Herlin T, Borregaard N, Kragballe K. On the mechanism of enhanced monocyte and neutrophil cytotoxicity in severe psoriasis. *J Invest Dermatol* 1982; 79: 104-108.
146. Ellis CN, Kang S, Grekin RC, LoBuglio AF, Voorhees JJ. Etrexinate therapy for psoriasis. Reduction of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity of polymorphonuclear leukocytes. *Arch Dermatol* 1985; 121: 877-880.
147. Nickoloff BJ, Bonish B, Huang BB, Porcelli SA. Characterization of a T cell line bearing natural killer receptors and capable of creating psoriasis in a SCID mouse model system. *J Dermatol Sci* 2000; 24: 212-225.
148. Koreck A, Suranyi A, Szonyi BJ i sur. CD3+CD56+ NK T cells are significantly decreased in the peripheral blood of patients with psoriasis. *Clin Exp Immunol* 2002; 127: 176-182.
149. Nickoloff BJ, Wrone-Smith T, Bonish B, Porcelli SA. Response of murine and normal human skin to injection of allogeneic blood-derived psoriatic immunocytes: detection of T cells expressing receptors typically present on natural killer cells, including CD94, CD158, and CD161. *Arch Dermatol* 1999; 135: 546-552.
150. Bonish B, Jullien D, Dutronc Y i sur. Overexpression of CD1d by keratinocytes in psoriasis and CD1d-dependent IFN-gamma production by NK-T cells. *J Immunol* 2000; 165: 4076-4085.
151. Gilhar A, Ullmann Y, Kerner H, Assy B, Shalaginov R, Serafimovich S, Kalish RS. Psoriasis is mediated by a cutaneous defect triggered by activated immunocytes: induction of psoriasis by cells with natural killer receptors. *J Invest Dermatol* 2002; 119: 384-391.
152. Rubeša G, Podack ER, Sepčić J, Rukavina D. Increased perforin expression in multiple sclerosis patients during exacerbation of disease in peripheral blood lymphocytes. *J Neuroimmunol* 1997; 74: 198-204.
153. Gulan G, Ravlić Gulan J, Štrbo N, Sotošek V, Nemeč B, Matovinović D, Rubinić D, Podack ER, Rukavina D. Systemic and local expression of perforin in lymphocyte subsets in acute and chronic rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2003; 30: 660-70.



154. Weyand CM, Bryl E, Goronzy JJ. The role of T cells in rheumatoid arthritis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2000; 48:429-35.
155. Wu Z, Podack ER, McKenzie JM, Olsen KJ, Zakarija M. Perforin expression by thyroid-infiltrating T cells in autoimmune thyroid disease. *Clin Exp Immunol* 1994; 98: 470-7.
156. Yawalkar N, Schmid S, Braathen LR, Pichler WJ. Perforin and granzyme B may contribute to skin inflammation in atopic dermatitis and psoriasis. *Br J Dermatol* 2001; 144: 1133-1139.
157. Prpić L, Štrbo N, Sotošek V, Gruber F, Podack ER, Rukavina D. Assessment of perforin expression in peripheral blood lymphocytes in psoriatic patients during exacerbation of disease. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* 2000; suppl. 211: 14-6.
158. Behrendt C, Gollnick H, Bonnekoh B. Up-regulated perforin expression of CD8+ blood lymphocytes in generalized non-anaphylactic drug eruptions and exacerbated psoriasis. *Eur J Dermatol* 2000; 10: 365-369.
159. Yawalkar N, Hunger RE, Burl C, Schmid S, Egli F, Brand CU, Mueller C, Pichler WJ, Braathen LR. A comparative study of the expression of cytotoxic proteins in allergic contact dermatitis and psoriasis. Spongiotic skin lesions in allergic contact dermatitis are highly infiltrated by T cells expressing perforin and granzyme B. *Am J Pathol* 2001; 158: 803-808.
160. Agarwal R, Saraswat A. Oral lichen planus: an update. *Drugs Today (Barc)* 2002; 38: 533-547.
161. Thornhill MH. Immune mechanisms in oral lichen planus. *Acta Odontol Scand* 2001; 59: 174-177.
162. Lin SC, Hahn LJ, Kwan HW. Subsets of T lymphocytes in peripheral blood of patients with oral lichen planus. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1988; 17: 84-86.
163. Simon M, Keller J. Subpopulations of T lymphocytes in peripheral blood and in skin lesions in lichen ruber planus. *Dermatologica* 1984; 169: 112-116.
164. Rabinovich OF, Khanukova LM, Khamidulina KF. The characteristics of the immune status of patients with lichen rubber planus. *Stomatologija (Mosk)* 1999; 78: 20-23.
165. Al-Fouzan AS, Habib MA, Sallam TH, El-Samahy MH, Rostom AI. Detection of T lymphocyte subsets in lichen planus: in situ and in peripheral blood. *Int J Dermatol* 1996; 35: 426-429.

166. Sugerman PB, Voltz MJ, Savage NW, Basford KE, Seymour GJ. Phenotypic and functional analysis of peripheral blood lymphocytes in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 1992; 21: 445-450.
167. Walton LJ, Macey MG, Thornhill MH, Farthing PM. Intra-epithelial subpopulations of T lymphocytes and Langerhans cells in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 1998; 27: 116-123.
168. Bjerke JR. Subpopulations of mononuclear cells in lesions of psoriasis, lichen planus and discoid lupus erythematosus studied using monoclonal antibodies. *Acta Derm Venereol* 1982; 62: 477-483.
169. Buechner SA. T cell subsets and macrophages in lichen planus. In situ identification using monoclonal antibodies and histochemical techniques. *Dermatologica* 1984; 169: 325-329.
170. Akasu R, From L, Kahn HJ. Lymphocyte and macrophage subsets in active and inactive lesions of lichen planus. *Am J Dermatopathol* 1993; 15: 217-223.
171. Mozzanica N, Cattaneo A, Legori A, Pigatto P, Finzi AF. Immunohistologic evaluation of the effect of cyclosporine treatment on the lichen planus immune infiltrate. *J Am Acad Dermatol* 1991; 24: 550-554.
172. Zhou XJ, Sugerman PB, Savage NW, Walsh LJ, Seymour GJ. Intra-epithelial CD8+ T cells and basement membrane disruption in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 2002; 31: 23-27.
173. Giannotti B, De Panfilis G, Manara GC, Allegra F. Macrophage-T-lymphocyte interaction in lichen planus. An electron microscopic and immunocytochemical study. *Arch Dermatol Res* 1983; 275: 35-40.
174. Khan A, Farah CS, Savage NW, Walsh LJ, Harbrow DJ, Sugerman PB. Th1 cytokines in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 2003; 32: 77-83.
175. Neppelberg E, Johannessen AC, Jonsson R. Apoptosis in oral lichen planus. *Eur J Oral Sci* 2001; 109: 361-364.

## 8. ŽIVOTOPIS

### DATUM I MJESTO ROĐENJA:

31. ožujka 1971. Rijeka

### ZAPOSLENJE

Katedra za dermatovenerologiju, Klinički bolnički centar Rijeka

### ŠKOLOVANJE

1977. - 1985. Osnovna škola "Josip Brusić" u Rijeci

1985. - 1989. CUO za kadrove u obrazovanju i kulturi, Rijeka

1989. - 1989. Ellensburg High School, Washington, SAD (program razmjene učenika)

1989. - 1995. Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

1995. - 1997. Pripravnički staž (1997. položen državni ispit)

1995. - 1997. Poslijediplomski znanstveni studij "Biomedicina", izborni smjer "Klinička imunologija",  
Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

2003. - 2004. Poslijediplomski stručni studij "Dermatovenerologija", Medicinski fakultet Sveučilišta u  
Zagrebu

### AKADEMSKI STUPNJEVI

1995. Doktor medicine, Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci

1999. Asistent na Katedri za dermatovenerologiju, Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci

### ZNANSTVENI STUPNJEVI

1998. Magistar biomedicinskih znanosti, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

1999. znanstveni novak na Katedri za dermatovenerologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci

### ZNANSTVENO USAVRŠAVANJE

1992. provela tri mjeseca u laboratoriju za molekularnu biologiju i imunologiju istraživačkog instituta Hoffman-La Roche, Bazel, Švicarska u cilju znanstvenog usavršavanja

### A. ZNANSTVENA DJELATNOST

#### *Kvalifikacijski rad*

Prpić Larisa. Imunofenotipizacija u diferencijalnoj dijagnostici akutnih leukemija. Magistarski rad, 1998. Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci (mentori: prof. dr. sc. B. Labar i prof. dr. sc. D. Rukavina )

## 1. Znanstveni radovi

### 1.1. Primarni znanstveni radovi objavljeni u časopisu citiranom u tercijarnim publikacijama (CC)

1. Prpić L., Štrbo N, Sotošek V, Gruber F, Podack ER and Rukavina D. Assessment of perforin expression in peripheral blood lymphocytes in psoriatic patients during exacerbation of disease. Acta Derm Venereol 2000; Suppl 211:14-16.
2. Brajac I, Prpić Massari L., Stojnić Soša L, Gruber F. Dermatomycoses in the Rijeka area, Croatia, before, during and after the war 1990-1999. Mycoses 2003; 46: 213-217.
3. Brajac I, Prpić Massari L., Stojnić Soša L, Gruber F. Survey on the epidemiology of *Microsporium canis* infection in Rijeka area, Croatia. Mycoses. (primljeno u tisak).
4. Prpić Massari L., Kaštelan M, Gruber F, Laškarin G, Sotošek Tokmadžić V, Štrbo N, Zamo G, Žauhar G and Rukavina D. Perforin expression in peripheral blood lymphocytes and skin infiltrating cells in lichen planus patients. Br J Dermatology. (primljeno u tisak)

### 1.2. Primarni znanstveni radovi objavljeni u časopisu citiranom u sekundarnim publikacijama (*Index medicus, Excerpta medica*)

1. Peharda V, Gruber F, Prpić L., Kaštelan M, Brajac I. Comparison of mometasone furoate 0,1% ointment and betamethasone dipropionate 0,05% ointment in the treatment of psoriasis vulgaris. Acta Dermatovenereol Croat 2000; 8(4):223-226.
2. Rukavina D, Balen Marunić S, Prpić L. The role of perforin mediated cytotoxicity in infections. Med Razg 2000; 39(54):95-100.

## 2. Znanstveni projekti

### 2.1. Aktivno sudjelovanje u realizaciji znanstvenih projekata

“Imunopatogenetski mehanizmi u psorijazi” (projekt br. 062041) glavnog istraživača prof. dr. sc. Franje Grubera

## 4. Sudjelovanje na znanstvenim skupovima

### 4.1. Sudjelovanje na međunarodnom skupu

1. Prpić L., Gruber F, Štrbo N, Sotošek V, Rukavina D. Assessment of perforin expression in peripheral blood lymphocytes in psoriatic patients during exacerbation of disease. Alpe Adria Meeting on Psoriasis, Trst, 21. November 1998, Abstract book: str. 18
2. Brajac I, Kaštelan M, Tkalčić M, Simonić E, Prpić L. Sexual behavior and self-esteem of patients with condylomata acuminata: a preliminary study. 5<sup>th</sup> Alpe Adria Danube Sexually Transmitted Diseases Workshop, Opatija, October 29-31 1999, Acta Dermatovenereol Croat:190,



3. Brajac I, Prpić L, Stojnić L, Stašić A, Lenković M. Epidemiology of dermatomycoses in the Rijeka area: 1990-1999. International Symposium "The current trends in dermatomycology". Dubrovnik, June 16-17, 2000, Acta Dermatovenereol Croat, . 104.
4. Prpić L, Laškarin G, Sotošek V, Gruber F, Rukavina D. The role of perforin mediated cytolytic pathway in the patophysiology of psoriasis. 9<sup>th</sup> Congress of European Academy of Dermatology and Venereology, Geneva, 11-15 October 2000, JEADV 2000; 14, Suppl 1: 253.
5. Brajac I, Kaštelan M, Zamolo G, Simonić E, Stojnić L, Prpić L, Gruber F. Folliculitis decalvans after emotional stress. 20<sup>th</sup> World Congress of Dermatology, Paris, 1-5<sup>th</sup> June 2002.
6. Prpić Massari L, Kaštelan M, Gruber F, Zamolo G, Jonjić N, Rukavina D. Perforin expression in skin lesions of psoriatic patients. 10<sup>th</sup> Congress of European Academy of Dermatology and Venerology, Prague, 2-6 October 2002, JEADV 2002; 16 (Suppl 1): 290.
7. Kaštelan M, Čečuk E, Grubić Z, Gruber F, Brajac I, Prpić Massari L, Kaštelan A. Type I psoriasis is asociated with CW\*0602-B57-DRB1\*0701-DQA1\*0201-DQB1\*0201 extended haplotype in the Croatian population. 10<sup>th</sup> Congress of European Academy of Dermatology and Venerology, Prague, 2-6 October 2002, JEADV 2002; 16 (Suppl 1): 290.
8. Gruber F, Kaštelan M, Brajac I, Čabrijan L, Prpić L. HIV vaccines. 8<sup>th</sup> Alpe Adria Danube Congress on Sexually Transmitted Diseases and Infections of the Skin, Kranjska Gora, 15-17 November 2002.
9. Brajac I, Prpić Massari L, Stojnić Soša L, Simonić E, Stašić A, Gruber F. Microsporum canis infections in Rijeka area, Croatia. 7<sup>th</sup> Alpe Adria Danube Congress on Sexually Transmitted Diseases and Infections of the Skin, Kranjska Gora, 15-17 November 2002.
10. Prpić Massari L, Kaštelan M, Zamolo G, Laskarin G, Štrbo N, Sotošek V, Gruber F and Rukavina D. Increased perforin expression in peripheral blood lymphocytes of psoriatic patients in exacerbation phase of disease. The 9<sup>th</sup> international psoriasis symposium, New York, 17-22 June 2003.
11. Kaštelan M, Gruber F, Čečuk-Jeličić E, Grubić Z, Prpić Massari L, Simonić E, Kaštelan A. Polymorphysm of HLA-DQ alleles in Croatian patients with psoriasis. 12<sup>th</sup> Congress of the European Academy of Dermatology and Venerology, Barcelona, 15-18 October 2003.

#### 4.2. Sudjelovanje na domaćem skupu s međunarodnim učešćem

1. Prpić Massari L, Kaštelan M, Brajac I, Gruber F, Zamolo G, Laškarin G, Sotošek V, Rukavina D. Analysis of perforin expression in peripheral blood lymphocytes and skin lesions in psoriatic patients. 2<sup>nd</sup> Congress of Croatian dermatovenerologists. New highlights in dermatovenerology, Opatija, Croatia, May 16-19, 2002. Acta Dermatovenereol Croat 2002; 10(2): 120.
2. Kaštelan M, Čečuk Jeličić E, Grubić Z, Gruber F, Prpić L, Simonić E, Kaštelan A. Polymorphism of HLA class II alleles and HLA class II haplotypes in Croatian patients with

psoriasis. 2<sup>nd</sup> Congress of Croatian dermatovenerologists. New highlights in dermatovenerology, Opatija, Croatia, May 16-19, 2002. Acta Dermatovenerol Croat 2002; 10(2): 116.

3. Stašić A, Lenković M, Simončić E, Prpić Massari L. The role of HLA antigens in the development of contact dermatitis. 2<sup>nd</sup> Congress of Croatian dermatovenerologists. New highlights in dermatovenerology, Opatija, Croatia, May 16-19, 2002. Acta Dermatovenerol Croat 2002; 10(2): 120.
4. Lenković M, Prpić Massari L, Stašić A, Brajac I. Epidemiology of fungal diseases in Rijeka area. 2<sup>nd</sup> Congress of Croatian dermatovenerologists. New highlights in dermatovenerology, Opatija, Croatia, May 16-19, 2002. Acta Dermatovenerol Croat 2002; 10(2): 108.

#### 4.2. *Sudjelovanje na domaćem skupu*

1. Prpić L, Trobonjača Z, Sever-Prebelić M, Načinović-Duletić A. Doprinos imunofenotipizacije u dijagnostici leukemija. I. Hrvatski kongres hematologa i transfuziologa, Zagreb, 7.11.-10.11.1995. Knjiga sažetaka: str.56

#### 5. *Znanstvena društva*

1. Hrvatsko dermatovenerološko društvo
2. Hrvatska liječnička komora

#### 12. *Znanstvena nagrada*

1. Druga nagrada za poster pod nazivom "Analysis of perforin expression in peripheral blood lymphocytes and skin lesions in psoriatic patients" autora: Prpić Massari L, Kaštelan M, Brajac I, Gruber F, Zamolo G, Laškarin G, Sotošek V, Rukavina D. na 2. kongresu hrvatskih dermatovenerologa s međunarodnim sudjelovanjem.

### B. NASTAVNA DJELATNOST

#### 13. *Dodiplomska nastava (predavanja, vježbe, seminari)*

Voditelj vježbi i po potrebi predavanja slijedećih kolegija u akademskim godinama od 1999: dermatovenerologija za studente opće medicine, dermatovenerologija za studente stomatologije.

SVEUČILIŠNA KNJIŽNICA  
RIJEKA