SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

Nika Hlača

CITOTOKSIČNI MEHANIZMI POSREDOVANI GRANULIZINOM, PERFORINOM I PERFORINOM-2 U PATOGENEZI VITILIGA I HALO-NEVUSA

DOKTORSKI RAD

Rijeka, 2026.

SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

Nika Hlača

CITOTOKSIČNI MEHANIZMI POSREDOVANI GRANULIZINOM, PERFORINOM I PERFORINOM-2 U PATOGENEZI VITILIGA I HALO NEVUSA

DOKTORSKI RAD

Mentor: Prof. dr. sc. Larisa Prpić Massari, dr. med.

Rijeka, 2026.

UNIVERSITY OF RIJEKA

FACULTY OF MEDICINE

Nika Hlača

CYTOTOXIC MECHANISMS MEDIATED BY GRANULYSIN, PERFORIN AND PERFORIN-2 IN THE PATHOGENESIS OF VITILIGO AND HALO NEVUS

DOCTORAL THESIS

Menthor: Prof. Larisa Prpić Massari, MD, PhD

Rijeka, 2026.

Mentor rada: Prof. dr. sc. Larisa Prpić-Massari, dr. med.

Doktorski rad obranjen je dana _____ na Medicinskom fakultetu u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Prof. dr. sc.
2. Prof. dr. sc.
3. Prof. dr. sc.

Rad ima 177 listova.

UDK: _____

ZAHVALE

Iskreno zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Larisi Prpić-Massari, na podršci tijekom istraživanja i izrade ovoga rada.

Zahvaljujem se doc. dr. sc. Andrei Dekanić te laborantima Ozrenu Štanfel i Helgi Frketić na tehničkoj podršci tijekom istraživanja.

Naposljetku, zahvaljujem svim bolesnicima i ispitanicima na sudjelovanju u ovom istraživanju.

SAŽETAK

Cilj istraživanja: Cilj istraživanja bio je utvrditi izražaj i razlike u izražaju te raspodjeli citotoksičnih molekula granulizina (GNLY), perforina (PRF) i perforina-2 (PRF-2) unutar pojedinih odjeljaka kože bolesnika s vitiligom i halo nevusom u odnosu na zdravu kožu te odrediti njihovu istodobnu pojavnost s različitim subpopulacijama stanica upalnog infiltrata.

Ispitanici i metode: Metodom jednostruke imunohistokemije istražili smo izražaj i distribuciju CD8+, CD56+, GNLY+, PRF+ i PRF-2+ stanica u bioptatima lezija i perilezijske kože pacijenata s vitiligom i halo nevusom te u zdravoj koži ispitanika kontrolne skupine. Metodom dvostruke imunohistokemije utvrdili smo izražaj i raspodjelu citotoksičnih molekula GNLY+, PRF+ i PRF-2+ unutar CD8+, CD56+ i CD68+ stanica koje čine upalni infiltrat unutar epidermisa i dermisa lezija te perilezijske kože pacijenata s vitiligom i halo nevusom.

Rezultati: Učestalost GNLY+, PRF+ i PRF-2+ stanica bila je statistički značajno veća u lezijama vitiliga i halo nevusa u odnosu na perilezijsku kožu te zdravu kožu ispitanika kontrolne skupine. GNLY+, PRF+ i PRF-2+ stanice poglavito su uočene u dermalnom odjeljku lezija i perilezijske kože vitiliga i halo nevusa, a manje u bazalnom dijelu epidermalnog odjeljka kože. Udio dvostruko pozitivnih CD8+GNLY+, CD56+GNLY+, CD8+PRF+, CD56+PRF+ i CD68+PRF-2+ stanica bio je statistički značajno veći u lezijama vitiliga i halo nevusa u odnosu na perilezijsku kožu te zdravu kožu ispitanika kontrolne skupine.

Zaključak: Povećana učestalost GNLY+, PRF+ i PRF-2+ stanica u lezijama vitiliga i halo nevusa, kao i njihov snažan izražaj u pojedinim limfocitnim populacijama, upućuju na njihovu moguću uključenost u imunopatogenezu vitiliga i halo nevusa. S obzirom na sličnost u izražaju navedenih citotoksičnih molekula u lezijama vitiliga i halo nevusa pretpostavlja se da vitiligo i halo-nevus dijele sličnu imunopatogenezu. Stoga bi halo nevus mogao poslužiti kao model za istraživanje imunosnih zbivanja u vitiligu.

Ključne riječi: Granulizin; Halo nevus; Perforin; Perforin-2; Stanice prirodne ubojice; Stanična imunost; Vitiligo.

SUMMARY

Objectives: The aim of the study was to determine the expression, differences in the expression and distribution of the cytotoxic molecules granulysin (GNLY), perforin (PRF) and perforin-2 (PRF-2) within the epidermal and dermal compartments of skin in patients with vitiligo and halo nevus compared to healthy skin as well as to determine their expression in different subpopulations of inflammatory cells.

Patients and Methods: We investigated the expression and distribution of CD8+, CD56+, GNLY+, PRF+ and PRF-2+ cells in biopsies of lesions and perilesional skin of patients with vitiligo and halo nevus and healthy skin of the control group by using single immunohistochemistry. By double immunohistochemistry, we determined the expression and distribution of cytotoxic molecules GNLY+, PRF+ and PRF-2+ within CD8+, CD56+ and CD68+ cells that make up the inflammatory infiltrate within the epidermis and dermis of lesions and perilesional skin of patients with vitiligo and halo nevus.

Results: GNLY+, PRF+, and PRF-2+ cells were significantly more frequent in vitiligo and halo nevus lesions compared to perilesional and healthy skin. These cells were predominantly located in the dermis, with limited presence in the basal epidermis. Double-positive CD8+GNLY+, CD56+GNLY+, CD8+PRF+, CD56+PRF+, and CD68+PRF-2+ cells were significantly increased in lesions of both diseases.

Conclusion: The increased presence of GNLY+, PRF+, and PRF-2+ cells suggests their involvement in the immunopathogenesis of vitiligo and halo nevus. The similar cytotoxic profiles support shared pathogenic mechanisms, with halo nevus representing a potential model for localized antimelanocyte immune responses in vitiligo.

Keywords: Granulysin; Immunity, Cellular; Macrophage-Expressed Gene 1 Protein; Natural Killer Cells; Nevus, Halo; Perforin; Vitiligo

SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA 1

1.1. VITILIGO 1

1.1.1. Epidemiološka obilježja vitiliga 1

1.1.2. Nasljeđivanje vitiliga 2

1.1.3. Klinička slika 3

1.1.3.1. Nesegmentalni vitiligo 6

1.1.3.2. Segmentalni vitiligo 6

1.1.4. Pridružene bolesti 7

1.1.4.1. Autoimune bolesti 7

1.1.4.2. Genetski sindromi 7

1.1.5. Etiopatogeneza vitiliga 7

1.1.6. Imunopatogeneza vitiliga 8

1.1.6.1. Uloga oksidativnog stresa u nastanku vitiliga 10

1.1.6.2. Uloga DAMP i PAMP molekula u nastanku vitiliga 11

1.1.7. Uloga urođene imunosti u nastanku vitiliga 12

1.1.7.1. Uloga dendritičkih stanica (DC) u nastanku vitiliga 13

1.1.7.2. Uloga stanica prirodnih ubojica i urođenih limfoidnih stanica tipa 1 u nastanku vitiliga 13

1.1.8. Stečeni imunosni odgovor u vitiligu 14

1.1.8.1. Uloga citotoksičnih CD8+ limfocita T u nastanku vitiliga 14

1.1.8.2. Uloga regulatornih limfocita T u nastanku vitiliga 15

1.1.8.3. Uloga memorijskih rezidentnih stanica T u nastanku vitiliga 16

1.1.9. Glavna mreža citokina u nastanku vitiliga.....16

1.2. HALO NEVUS 18

1.2.1. Epidemiološka obilježja halo nevusa.....18

1.2.2. Klinička slika 18

1.2.3. Patohistološka slika 20

1.2.4. Pridružene bolesti.....20

1.2.5. Imunopatogeneza halo nevusa.....21

1.3. Mehanizmi stanične citotoksičnosti posredovani granulizinom, perforinom i perforinom-2 22

1.3.1. Granulizin 23

1.3.1.1. Građa i smještaj granulizina u stanici.....23

1.3.1.2. Citotoksična uloga granulizina.....24

1.3.1.3. Antimikrobna uloga granulizina 25

1.3.1.4. Granulizin kao imunološki alarmin.....26

1.3.1.5. Dodatne uloge granulizina.....26

1.3.2. Perforin 28

1.3.2.1. Građa i izražaj perforina u stanicama.....28

1.3.2.2. Mehanizam djelovanja perforina 28

1.3.2.3. Uloga perforina u razvoju upalnih bolesti 30

1.3.3. Perforin-2 31

1.3.3.1. Građa i smještaj perforina-2 u stanici 31

1.3.3.2. Izražaj i mehanizam djelovanja perforina-2 u stanici.....32

1.3.3.3. Uloga PRF-2 u imunološkom odgovoru 33

2. CILJ ISTRAŽIVANJA 35

3. ISPITANICI, MATERIJALI I METODE 37

3.1. Kliničke značajke ispitanika 37

3.1.1. Etičnost istraživanja i informirani pristanak 38

3.2. MATERIJALI 39

3.2.1. Biološki materijal 39

3.2.1.1. Bioptati kože 39

3.2.2. Kemikalije i reagensi 39

3.2.3. Protutijela 41

3.3. METODE 41

3.3.1. Imunohistokemija 41

3.3.1.1. Jednostruka imunohistokemija 41

3.3.1.2. Dvostruka imunohistokemija 43

3.3.2. Statistička obrada podataka 44

4. REZULTATI 45

4.1. Kliničke i demografske značajke ispitanika 45

4.2. Izražaj citotoksičnih molekula granulizina, perforina i perforina-2 u leziji i perilezijskoj koži bolesnika s vitiligom.....47

4.2.1. Izražaj molekule granulizina u leziji i perilezijskoj koži pacijenata s vitiligom u odnosu na zdravu kožu kontrolne skupine.....47

4.2.2. Izražaj CD8+ i CD56+ stanica u leziji i perilezijskoj koži pacijenata s vitiligom u odnosu na zdravu kožu kontrolne skupine.....51

4.2.3. Izražaj molekule granulizina u subpopulaciji citotoksičnih CD8+ limfocita T i CD56+ stanica NK u leziji i perilezijskoj koži pacijenata s vitiligom u odnosu na zdravu kožu kontrolne skupine 55

4.2.4. Korelacija izražaja GNLY+ stanica s kliničkim pokazateljima aktivnosti i proširenosti vitiliga 61

4.2.5. Izražaj molekule perforina u lezijama i perilezijskoj koži bolesnika s vitiligom u odnosu na zdravu kožu kontrolne skupine.....62

4.2.6. Izražaj molekule perforina u subpopulaciji citotoksičnih CD8+ limfocita T i CD56+ stanica NK u leziji i perilezijskoj koži pacijenata s vitiligom u odnosu na zdravu kožu kontrolne skupine 65

4.2.7. Korelacija izražaja PRF+ stanica u lezijama vitiliga s kliničkim pokazateljima aktivnosti i proširenosti vitiliga.....71

4.2.8. Izražaj molekule PRF-2 u lezijama i perilezijskoj koži bolesnika s vitiligom u odnosu na zdravu kožu kontrolne skupine.....72

4.2.9. Izražaj molekule PRF-2+ u subpopulaciji CD68+ makrofaga u leziji i perilezijskoj koži pacijenata s vitiligom u odnosu na zdravu kožu kontrolne skupine 75

4.2.10. Korelacija izražaja PRF-2+ stanica s kliničkim pokazateljima težine bolesti 79

4.3. Izražaj citotoksičnih molekula granulizina, perforina i perforina-2 u leziji i perilezijskoj koži pacijenata s halo nevusom 80

4.3.1. Izražaj molekule granulizina u leziji i perilezijskoj koži bolesnika s halo nevusom u odnosu na zdravu kožu kontrolne skupine 80

4.3.2. Izražaj CD8+ i CD56+ stanica u leziji i perilezijskoj koži pacijenata s halo nevusom u odnosu na zdravu kožu kontrolne skupine 84

4.3.3. Izražaj molekule granulizina u subpopulaciji citotoksičnih CD8+ limfocita T i CD56+ stanica NK u leziji i perilezijskoj koži bolesnika s halo nevusom u odnosu na zdravu kožu kontrolne skupine 88

4.3.4. Izražaj molekule perforina u lezijama i perilezijskoj koži pacijenata s halo nevusom u odnosu na zdravu kožu kontrolne skupine 94

4.3.5. Izražaj molekule perforina u subpopulaciji citotoksičnih CD8+ limfocita T i CD56+ stanica NK u leziji i perilezijskoj koži pacijenata s halo nevusom u odnosu na zdravu kožu kontrolne skupine 97

4.3.6. Izražaj molekule PRF-2 u lezijama i perilezijskoj koži pacijenata s halo nevusom u odnosu na zdravu kožu kontrolne skupine 102

4.3.7. Izražaj molekule PRF-2+ u subpopulaciji CD68+ makrofaga u leziji i perilezijskoj koži pacijenata s halo nevusom u odnosu na zdravu kožu kontrolne skupine.....105

4.4. Usporedba izražaja citotoksičnih molekula granulizina, perforina i perforina-2 u lezijama i perilezijskoj koži vitiliga i halo nevusa 109

4.4.1. Usporedba ukupnog izražaja molekule GNLY, CD8+ i CD56+ stanica u lezijama i perilezijskoj koži vitiliga i halo nevusa.....110

4.4.2. Usporedba izražaja dvostruko pozitivnih CD8+GNLY+ i CD56+GNLY+ stanica u lezijama i perilezijskoj koži vitiliga i halo nevusa 113

4.4.3. Usporedba izražaja molekule perforina u lezijama i perilezijskoj koži vitiliga i halo nevusa 116

4.4.4. Usporedba izražaja dvostruko pozitivnih CD8+PRF+ i CD56+PRF+ stanica u lezijama i perilezijskoj koži vitiliga i halo nevusa 118

4.4.5. Usporedba izražaja molekule PRF-2 u lezijama i perilezijskoj koži vitiliga i halo nevusa 121

4.4.6. Usporedba izražaja dvostruko pozitivnih CD68+PRF-2+ stanica u lezijama i perilezijskoj koži vitiliga i halo nevusa 123

5. RASPRAVA 125

6. ZAKLJUČCI 144

7. LITERATURA 145

POPIS POKRATA 159

ILUSTRACIJE 164

Popis slika: 164

ŽIVOTOPIS 170

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1.1. VITILIGO

Vitiligo je kronična upalna imunosno posredovana bolest, klinički obilježena nastankom oštro ograničenih mliječno-bijelih depigmentiranih makula. Depigmentacije su najčešće simetrično ili unilateralno raspoređene na ekstenzornim stranama udova, iznad zglobova prstiju, na koljenima, laktovima te na licu, poglavito periorificijalno, u području pazuha, oko pupka, na leđima i u perigenitalnom području (1,2). Depigmentirane lezije mogu se pojaviti lokalizirano ili generalizirano, a pojedinačna žarišta mogu tvoriti veća depigmentirana područja. S obzirom na izražen kontrast između depigmentiranih područja i normalne kože, bolest može imati značajan utjecaj na kvalitetu života, a oboljeli često doživljavaju stigmatizaciju, socijalnu izolaciju te smanjeno samopoštovanje (3).

1.1.1. *Epidemiološka obilježja vitiliga*

Vitiligo je najčešći uzrok depigmentacije kože koji se s podjednakom učestalošću pojavljuje u osoba oba spola te podjednako u odrasloj i dječjoj dobi s vršnom incidencijom u drugom i trećem desetljeću života (4). Procijenjene stope prevalencije kreću se od 0.1 do 2% kod odraslih i djece. U nekim je geografskim područjima prevalencija viša, primjerice u Indiji (8,8%) i Meksiku (2,6–4%), a to su ujedno i zemlje s najvišom učestalošću vitiliga u svijetu (4). Navedene razlike u epidemiološkim podatcima o prevalenciji vitiliga posljedica su razlika u tipovima kože i etničkim skupinama u različitim geografskim područjima, kao i okolišnim te genetičkim čimbenicima koji mogu pridonijeti različitoj prevalenciji bolesti. Iako teške opekline od sunca, trudnoća, trauma kože i/ili emocionalni stres mogu prethoditi pojavi bolesti, postoje jasni dokazi samo o povezanosti vitiliga i izomorfnog odgovora, također poznatog kao Koebnerov fenomen (5).

1.1.2. *Nasljeđivanje vitiliga*

Vitiligo je multifaktorijalna bolest koja nastaje međudjelovanjem genetičkih i okolišnih čimbenika (6). Obiteljsko pojavljivanje vitiliga i studije genoma (GWAS, od engl. *genome-wide association studies*) potvrdile su da je riječ je o multifaktorijalnom poligenskom obrascu nasljeđivanja sa značajnom genetičkom heterogenošću u različitim etničkim skupinama (7). Uz nasljeđe značajnu ulogu imaju i okolišni čimbenici što je nedvojbeno pokazano u istraživanjima blizanaca oboljelih od vitiliga. Naime, podudarnost za vitiligo dokazana je u samo 23% jednojajčanih blizanaca što ukazuje da i različiti okolišni čimbenici pridonose razvoju bolesti, a procjenjuje se da oko 15-25% pacijenata ima barem jednog bliskog člana obitelji koji također boluje od vitiliga (7).

Dosadašnjim je istraživanjima utvrđeno oko 50 različitih gena podložnosti za nastanak vitiliga, poglavito u pacijenata europskog i kineskog podrijetla. Približno polovica identificiranih gena kodira proteine važne u regulaciji urođenog i stečenog imunosnog odgovora i mehanizama apoptoze, dok nekoliko njih kodira proteine specifične za razvoj pigmentnih stanica, melanocita. Pojedini kromosomski lokusi povezani s vitiligom nalaze se unutar glavnog sustava tkivne podudarnosti (MHC, od engl. major histocompatibility complex) između alela HLA (od engl. human leukocyte antigen)-A i HLA-C9 te između HLA-DRB1 i HLA-DQA1 unutar kojih su smješteni i brojni geni za nadzor imunosnog sustava (8).

Geni podložnosti za vitiligo uključeni u nadzor urođenog imunosnog sustava su TICAM1 i NALP1. TICAM1, također poznat kao molekula adapter povezana s interferonom (IFN)-β koji kodira protein sličan Toll-molekuli 1, sudjeluje u borbi protiv virusnih patogena, a NALP1 gen kodira NACHT protein povezan s pojavom vitiliga, ali i drugih autoimunih bolesti (9,10). Niz je gena podložnosti za vitiligo vezanih uz stečeni imunosni odgovor uključujući CTLA4, koji kodira istoimeni koreceptor za limfocite T i nadzire njihovu aktivaciju (11). Nadalje, gen PTPN22, koji kodira LYP protein tirozin fosfatazu te nadzire aktivaciju i razvoj limfocita T također je povezan s razvojem vitiliga (7). IL2RA, koji kodira alfa lanac interleukin (IL)-2-receptora na kromosomu 10p15.18 je još jedan gen snažno povezan s vitiligom čije povišene razine u serumu oboljelih potvrđuju značajnu ulogu limfocita T u nastanku vitiliga (8,12).

Preostali geni podložnosti za vitiligo uključeni su i u nastanak drugih autoimunih bolesti i povezanih autoupalnih poremećaja, uključujući bolesti štitnjače, dijabetes melitus tipa 1 (DM 1), alopeciju areatu, psorijazu i reumatoidni artritis (13). Primjerice, gen IKZF4 je uključen u razvoj vitiliga, a istovremeno povezan s DM1 i alopecijom areatom (14). Zanimljivo je kako su psorijaza i vitiligo povezani s istim kromosomskim lokusima unutar MHC sustava što upućuje na slične imunopatogenetske mehanizme u nastanku obje bolesti (15). Prepoznata je i genetička povezanost između vitiliga i gena za granzima B, serinske proteaze slične kaspazi koja posreduje u apoptozi stanica, a ista mutacija nađena je u juvenilnom idiopatskom artritisu i Bechetovoj bolesti (16,17).

Geni vezani uz funkciju melanocita također su povezani s nastankom vitiliga (18,19). Primjerice, enzim tirozinaza, kodiran genom TYR glavni je autoantigen u vitiligu (19). Gen MC1R koji je uključen u melanogenezu, također se smatra autoantigenom u vitiligu. U lezijama vitiliga smanjen je izražaj gena PMEL koji kodira transmembranski glikoprotein tipa I specifičan za melanocite i ima značajnu ulogu u strukturnoj organizaciji premelanosoma (20). Geni CASP7 i RERE uključeni u apoptozu i preživljavanje stanica također sudjeluju u nastanku vitiliga (21).

1.1.3. *Klinička slika*

Vitiligo obilježavaju oštro ograničene depigmentirane makule, mliječne ili boje bijele krede (**slika 1**). Pojedinačne depigmentirane lezije mogu imati promjer od nekoliko milimetara do više centimetara, a obično imaju konveksne rubove koji su oštro ograničeni od okolne normalne kože. Lezije vitiliga mogu imati više nijansi boja što može upućivati na aktivnost bolesti. Trikromne lezije obilježavaju zone bijele, svjetlosmeđe i normalne boje kože i najčešće se opažaju kod osoba s tamno pigmentiranom kožom. Kvadrikromne lezije mogu imati perifolikularnu ili rubnu hiperpigmentaciju, dok pentakromne lezije dodatno imaju plavu nijansu (1,2). Druga klinička varijanta je takozvani vitiligo ponctué, koji obilježavaju sitne depigmentirane makule poput konfeta (**slika 1A**). Lezije se mogu pojaviti u bilo kojoj dobi i bilo gdje na tijelu, s predilekcijom za lice, poglavito periorificijalno područje kao i za područja genitalija i ruku (**slika 1C**).

Ponovljena mehanička trauma (trenje) i druge vrste fizičkih trauma (npr. grebanje, kronični pritisak ili posjekotine) zajedno s alergijskim ili iritantnim kontaktnim reakcijama mogu potaknuti pojavu vitiliga na područjima kao što su vrat, laktovi i gležnjevi. Riječ je o Koebnerovom fenomenu koji se također naziva "izomorfni odgovor", a lezije vitiliga se pojavljuju na mjestima traume kože (**slika 1B,C**). Koebnerov fenomen uočava se u 20-60% pacijenata s vitiligom (5). Depigmentirane dlake često su prisutne u lezijama vitiliga. Polioza, odnosno smanjenje ili odsutnost melanina u vlasištu, obrvama i/ili trepavicama također može biti dio kliničke slike vitiliga (1,2). Halo nevusi, odnosno melanocitni nevusi okruženi okruglim područjem depigmentacije, uočeni su u 6-26 % djece s NSV-om i mogu prethoditi razvoju generaliziranog vitiliga (22).

Klinički tijek bolesti je nepredvidiv. Lezije mogu godinama ostati stabilne ili sporo napredovati (2). U većini slučajeva, opsežnost i raspored lezija se mijenjaju tijekom života osobe centrifugalnim širenjem postojećih lezija i/ili pojavom novih lezija. Progresija je češća u bolesnika koji imaju pozitivnu obiteljsku anamnezu NSV-a uz dulje trajanje bolesti, Koebnerov fenomen i zahvaćenost sluznica, ali je stopa širenja bolesti u pojedinog bolesnika nepredvidljiva (2,5,23). Pogoršanja bolesti su česta i mogu biti odvojena stabilnim razdobljima. Stabilni vitiligo je češći u djece i adolescenata, bez obzira na etničku pripadnost i tip kože (24). Lezije se mogu smatrati stabilnima ako se serijskim fotografijama ne uočavaju nikakve promjene u razdoblju od 12 mjeseci (25). Suprotno tome, aktivne lezije imaju više nijansi boja, na rubovima se uočavaju lezije poput konfeta i nazočan je Koebnerov fenomen.

Na temelju analize pacijenata s vitiligom, utvrđena su dva klinička fenotipa bolesti povezana s dobi pojavljivanja vitiliga (24). Bolesnici s početkom u djetinjstvu prije 12. godine života često imaju pozitivnu obiteljsku anamnezu vitiliga i/ili preranog sijeđenja kose, brojne halo nevuse i pozitivan Koebnerov fenomen te prijavljuju prethodne epizode depigmentacije i repigmentacije. Nasuprot tome, pacijenti s pojavom vitiliga tijekom adolescencije ili rane odrasle dobi često prijavljuju osobnu ili obiteljsku povijest autoimunih bolesti i lezije lokalizirane na licu i/ili akralnim područjima. S obzirom na lokalizaciju i raspored lezija, vitiligo se dijeli u dva oblika: nesegmentalni (NSV) i segmentalni vitiligo (SV). Nesegmentalni oblik bolesti je češći i

pojavljuje se u 80% oboljelih, a dijeli se na podtipove na temelju rasporeda kožnih lezija (25).

Slika 1. Klinička slika vitiliga. A. Oštro ograničene depigmentirane makule s rubnim lezijama poput konfeta. B. Koebnerov fenomen u vidu linearne depigmentacije. C. Akralni vitiligo s izraženim Koebnerovim fenomenom na podlakticama (fotodokumentacija autora).

1.1.3.1. *Nesegmentalni vitiligo*

NSV uključuje generalizirani, akralni, mukozni i univerzalni oblik (**slika 1**), od kojih su generalizirani i akralni vitiligo najčešći oblici bolesti. Generalizirani vitiligo obilježavaju bilateralne, često simetrične, depigmentirane makule ili makule nasumično raspoređene na različitim područjima tijela. Obično započinje u djetinjstvu ili ranoj odrasloj dobi, najčešće na mjestima izloženima pritisku, trenju i/ili traumi. Akrofacijalni ili akralni vitiligo obilježen je depigmentiranim makulama smještenim u području distalnih dijelova udova i/ili lica (2,25). Mukozni vitiligo zahvaća oralnu i/ili genitalnu sluznicu i može se pojaviti izolirano ili u sklopu generaliziranog vitiliga (26). Progresivnim širenjem generaliziranog vitiliga obično nastaje univerzalni oblik bolesti s potpunom ili gotovo potpunom depigmentacijom kože, pri čemu pojedini dijelovi kože i dlake mogu ostati pošteđeni. Poseban oblik bolesti je vitiligo minor ili hipokromni vitiligo obilježen nepotpunim gubitkom pigmentacije s područjima kože bljeđim od okolne kože, a češće se viđa kod osoba s tamno pigmentiranom kožom (27).

1.1.3.2. *Segmentalni vitiligo*

Segmentalni vitiligo je obilježen depigmentiranim područjima na koži pojedinih dermatoma, najčešće u području inervacije trigeminalnog živca. To je najrjeđi oblik bolesti i u većini slučajeva počinje tijekom djetinjstva ili u ranoj odrasloj dobi (24). Područja depigmentacije obično se stabiliziraju unutar godinu dana i rijetko se šire izvan zahvaćenog dermatoma. Rano dolazi do zahvaćanja folikula dlake (leukotrihija) s histološkim dokazima razaranja folikularnog spremnika melanocita. Plurisegmentalni vitiligo može imati više zahvaćenih segmenata, jednostrano ili bilateralno. Početak različitih segmentalnih lezija može, ali i ne mora biti istodoban. Plurisegmentalni vitiligo može se razlikovati od bilateralnog nesegmentalnog vitiliga po ograničenju lezija na segmente, prisutnosti leukotrihije i dugotrajnom tijeku.

1.1.4. *Pridružene bolesti*

1.1.4.1. *Autoimune bolesti*

Vitiligo je često povezan s autoimunim bolestima štitnjače i drugim autoimunim ili imunološki posredovanim bolestima, uključujući alopeciju areatu, psorijazu, DM1, reumatoidni artritis, upalnu bolest crijeva, perniciozu anemiju, linearnu morfeju, miasteniju gravis, diskoidni i sistemski lupus eritematozus te Sjögrenovu bolest (28). Bolesnici s pridruženim autoimunim bolestima imaju veću vjerojatnost razvoja generaliziranog vitiliga u usporedbi s pacijentima bez pridruženih bolesti (28). Vitiligo također može biti klinička značajka poliglandularnih autoimunih sindroma, primjerice autoimune poliendokrinopatije-kandidijaze-ektodermalne distrofije i Addisonove bolesti s autoimunom bolešću štitnjače (tzv. Schmidtov sindrom) (29).

1.1.4.2. *Genetski sindromi*

Vitiligo je povezan s nekoliko genetskih poremećaja, Vogt-Koyanagi-Harada sindromom, Alezzandrini sindromom i Kabuki sindromom. Vogt-Koyanagi-Harada sindrom je rijetka multisustavna bolest obilježena kroničnim uveitisom, poliozom, alopecijom, disakuzijom, vitiligom i znakovima iritacije meningea (30). Obično se pojavljuje u trećem desetljeću života, a u težem se obliku očituje u populaciji s tamno pigmentiranom kožom. Alezzandrini sindrom je rijetko stanje obilježeno jednostranim vitiligom lica, jednostranom degeneracijom mrežnice, poliozom i gubitkom sluha (31). Kabuki sindrom je rijedak višesistemski poremećaj obilježen kašnjenjem u razvoju, blagim do umjerenim intelektualnim invaliditetom, skeletnim i visceralnim anomalijama, karakterističnim dismorfizmom lica i vitiligom (32).

1.1.5. *Etiopatogeneza vitiliga*

Vitiligo je multifaktorijalni poremećaj obilježen nestankom funkcionalnih melanocita (25,33). Iako etiologija vitiliga nije u cijelosti razjašnjena, predloženo je nekoliko mehanizama uništavanja melanocita u nastanku vitiliga uključujući autoimune reakcije, oksidativni stres, stvaranje upalnih medijatora i mehanizme odvajanja melanocita. Međutim, nijedan od ovih mehanizama ne može samostalno u potpunosti objasniti nastanak različitih fenotipova vitiliga, a ukupni doprinos svakog pojedinačnog mehanizma još uvijek nije jasan.

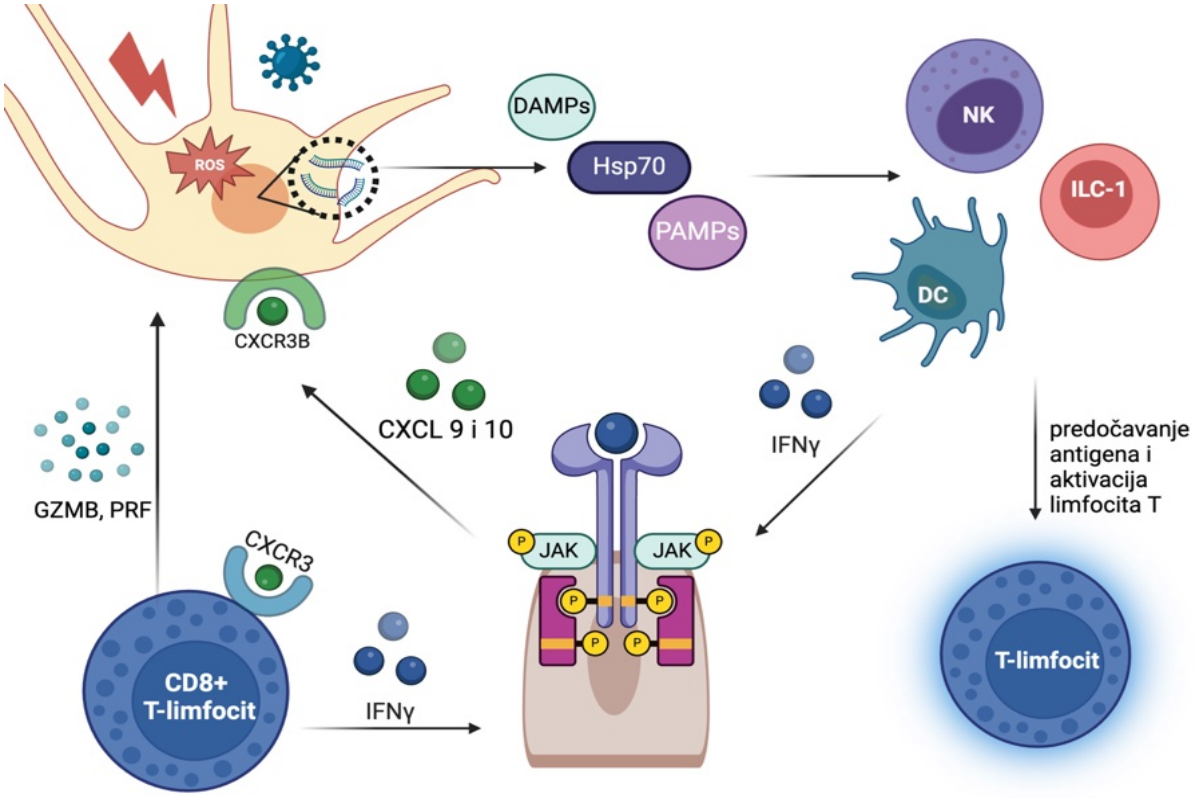
Novija istraživanja ukazuju na međudjelovanje stanica urođenog i stečenog imunološkog sustava, pri čemu trenutačno prevladava mišljenje da autoimuni mehanizmi imaju ključnu ulogu u razvoju bolesti. Progresija vitiliga i gubitak melanocita rezultat su imunološkog odgovora, degeneracije ili odvajanja stanica. “Teorija konvergencije” ili “integrirana teorija” ukazuje da više različitih mehanizama može istodobno sudjelovati u uništavanju melanocita, što u konačnici dovodi do kliničke slike vitiliga (2,33). Iako se do nedavno se smatralo da NSV i SV nastaju djelovanjem različitih patogenetskih mehanizama zbog njihove različite kliničke slike, nova istraživanja pokazuju preklapanje u patogenezi NSV i SV putem pokretanja upalne kaskade. Naime, u oba oblika bolesti dolazi do aktivacije upalne kaskade uz oslobađanje proupalnih citokina i neuropeptida izazvanih vanjskim ili unutarnjim okidačem, a potom slijedi snažan imunološki odgovor.

1.1.6. *Imunopatogeneza vitiliga*

Slično kao i druge imunosno posredovane kožne bolesti, vitiligo je multifaktorijalna bolest uzrokovana složenim interakcijama između genetičkih i okolišnih čimbenika (34–36). Dosadašnja istraživanja ukazuju na središnju ulogu brojnih stanica urođenog i stečenog imunosnog sustava i njihovih medijatora u nastanku bolesti. U složenu imunološku kaskadu uključene su dendritičke stanice (DC, od engl. dendritic cells), prirodno ubilačke (NK, od engl. natural killer cells) stanice i urođene limfoidne stanice tipa 1 (ILC-1, od engl. innate lymphoid cells) uz pomoćničke limfocite T tipa 1 (Th1, od engl. T helper 1), citotoksične limfocite T, regulatorne i rezidentne memorijske limfocite T. Sukladno dosadašnjim spoznajama ključni posrednici upale su interferon-γ (IFN-γ), kemokini CXCL9 i CXCL10 te IL-15 (34,36). Osim toga, neimunosne stanice poput melanocita, keratinocita, fibroblasta i matičnih stanica također sudjeluju u upalnoj kaskadi vitiliga. Međutim, točan slijed događaja koji dovode do pojave bolesti još uvijek nije u cijelosti razjašnjen.

Početnim događajem u vitiligu smatra se oksidativni stres koji uzrokuje aktivaciju urođenih imunosnih stanica u najranijim fazama razvoja bolesti (37). Genetički i okolišni čimbenici potiču oslobađanje reaktivnih kisikovih spojeva (ROS, od engl. Reactive Oxygen Species) koji mijenjaju staničnu DNA te potiču stvaranje molekularnih uzoraka povezanih s oštećenjima (DAMP, od engl. damage-associated molecular patterns). Neke od DAMP molekula uključene u nastanak vitiliga su antigeni

specifični za melanocite, miRNA i proteini toplinskog šoka (HSP, od engl. heat shock protein) (37–39). Ove molekule djeluju kao signali opasnosti odnosno alarmini te mogu aktivirati receptore za prepoznavanje uzoraka na urođenim imunosnim stanicama kao što su makrofagi, stanice NK i DC. Pod utjecajem HSP proteina 70 (iHSP70) dolazi do sazrijevanja DC-a koje putem IFN-γ potiču diferencijaciju limfocita T (39). IFN-γ aktivira signalni put posredovan Janus kinazom (JAK) 1 i 2 te pretvaračem signala i aktivatorom transkripcije (STAT1) čime potiče stvaranje kemokina CXCL9 i CXCL10 koji potom privlače autoreaktivne CD8+ stanice T u kožu uzrokujući snažan protumelanocitni odgovor (40). Slijedi apoptoza melanocita posredovana citotoksičnim limfocitima T ili aktivacijom kemokinskog receptora CXCR3B na melanocitima (41,42) (**Slika 2**).



Slika 2. Shematski prikaz imunopatogeneze vitiliga. Imunološki odgovor pokreću urođene stanice imunosnog sustava (DC, NK stanice i ILC-1 stanice) koje prepoznaju signale melanocita povezanih s oštećenjem (DAMP i PAMP molekule) te nakon aktivacije, luče IFN-γ, koji preko JAK/STAT signalnog puta potiče keratinocite na lučenje kemokina CXCL9 i CXCL10. Slijedi predočavanje antigena te aktivacija i

usmjeravanje CD8+ limfocita T u kožu preko CXCR3 receptora. CD8+ limfociti luče IFN-γ, PRF i granzim B, te uzrokuju apoptozu melanocita. Kemokin CXCL10 također potiče apoptozu melanocita putem CXCR3B receptora na melanocitima. CXCL9, ligand kemokina 9; CXCL10, ligand kemokina 10; CXCR3, kemokinski receptor tipa 3; DAMP, molekularni uzorak povezan s oštećenjem; DC, dendritične stanice; IFN-γ, interferon-γ; ILC-1, urođena limfoidna stanica skupine 1; JAK, Janus kinaza; NK, stanice prirodne ubojice; PAMP, molekularni obrasci povezani s patogenom; ROS, reaktivne vrste kisika; STAT1, pretvarač signala i aktivator transkripcije 1. Prilagođeno prema:(35)

1.1.6.1. *Uloga oksidativnog stresa u nastanku vitiliga*

Koža ima ulogu barijere i pruža zaštitu od vanjskih štetnih čimbenika uključujući ultraljubičasto (UV) zračenje, mikroorganizme i oksidirajuće kemikalije. Svi navedeni čimbenici mogu poticati stvaranje ROS-a u melanocitima te tako mijenjati oksidativnu homeostazu kože (37,39). Stoga je kod pacijenata s vitiligom uočena neravnoteža u razini antioksidansa, uz povišene razine superoksid dismutaze, snižene razine katalaze i povećane peroksidacije lipida (43). Osim vanjskih, postoje i endogeni izvori ROS-a koji uglavnom nastaju tijekom sinteze melanina (39). Melanociti u vitiligu osjetljiviji su na djelovanje endogenih reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) zbog strukturnih oštećenja kao što su dilatacija endoplazmatskog retikuluma (ER), disfunkcija mitohondrija i poremećaji u građi melanosoma (39,44). Dilatacija ER-a nastaje zbog nakupljanja pogrešno savijenih proteina, što dodatno opterećuje ovu organelu i potiče oksidativni stres. Savijanje proteina u ER-u također je narušeno zbog nestabilnosti proteina TYRP1, uključenog u melanogenezu što dovodi do nakupljanja međuprodukata melanina u pacijenata s vitiligom i pokretanja odgovora na nesmotane proteine (UPR, od engl. unfolded protein response) (45,46). Povećan rizik za razvoj vitiliga povezan je i s genetskim polimorfizmima gena uključenih u UPR, kao što su XBP1 i UVRAG, a uloga UPR-a potvrđena je i kod dijabetesa tipa 1 (DM1) (47). U koži i serumu oboljelih od vitiliga, UPR potiče sintezu proupalnih citokina i kemokina poput IL-6 i IL-8, te nastanak DAMP molekula (48).

Poremećaj funkcije antioksidativnog puta NRF2 (od engl. nuclear factor erythroid 2-related factor 2) dodatno pridonosi oksidativnom stresu i aktivaciji UPR-a u vitiligu. NRF2 je nuklearni čimbenik koji regulira ekspresiju gena uključenih u

obrambene antioksidativne mehanizme, uključujući glutationom i tioredoksinom posredovane sustave (49). U odgovoru na oksidativni stres također sudjeluju male nekodirajuće ribonukleinske kiseline (ncRNA, od engl. non-coding ribonucleic acid), osobito mikroRNA (miRNA) koje nadziru translaciju mRNA i transkripciju proteina važnih za pojavu bolesti (50). U koži i serumu pacijenata s vitiligom uočene su promjene u izražaju više vrsta miRNA, uključujući miR-421, miR-25 i miR-211 (50).

1.1.6.2. *Uloga DAMP i PAMP molekula u nastanku vitiliga*

Nakupljanje ROS-a u melanocitima uslijed oksidativnog stresa uzrok je karbonilacije i oksidacije proteina melanocita što dovodi do stvaranja neoantigena ili DAMP molekula (37,51). DAMP molekule aktiviraju receptore za prepoznavanje uzoraka (PRR, od engl. pattern recognition receptors) kao što su receptori slični Tollu (TLR), receptori slični RIG-I (RLR, od engl. RIG-I-like receptors) i receptori za domenu sličnu oligomerizaciji nukleotida (NLR, od engl. nucleotide oligomerization domain–like receptors) što stanicama urođenog imunosnog sustava omogućuje prepoznavanje oštećenih melanocita (52). HSP70 je jedan od poznatih DAMP-ova u vitiligu i u korelaciji je s aktivnošću bolesti (53). Izloženost određenim kemikalijama, poput fenola, može potaknuti lučenje HSP70 u melanocitima pacijenata s vitiligom. Uslijed toga dolazi do ekspresije liganda koji potiče apoptozu povezanog s ligandom koji uzrokuje apoptozu srodnim TNF-u (TRAIL, od engl. Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand) na površini melanocita i nakupljanja DC-a u perilezijskoj koži oboljelih. Nedavno istraživanje na modelu svinja Sinclair pokazalo je da izmijenjena verzija iHSP70, odnosno HSP70iQ435A može izazvati repigmentaciju lezija što ga čini mogućim terapijskim ciljem (54). Sljedeći važan DAMP je protein B1 skupine visoke pokretljivosti (HMGB1, od engl. high-mobility group protein B1) koji posreduje odgovor na oksidativni stres što za posljedicu ima aktivaciju DC-a (51). HMGB1 se oslobađa iz aktiviranih imunosnih i neimunosnih stanica kao što su melanociti i keratinociti, a uočene su povećane razine HMGB1 u serumu i lezijama kože pacijenata s aktivnim vitiligom (51). Ključni posrednici HMGB1, CXCL16 i IL-8 uzrokuju nakupljanje CD8+ limfocite T u perilezijskoj koži (55). Kalretikulin (CRT) je ER-protein uključen u homeostazu iona kalcija te također ima ulogu u odgovoru melanocita na oksidativni stres. Naime, CRT može povećati imunogeničnost melanocita izravno povećanjem svoje ekspresije ili neizravno putem lučenja proupalnih citokina, poput IL-6 i TNFα što

posljedično dovodi do apoptoze melanocita i dodatne aktivacije urođenih imunosnih stanica (56).

Pojedina istraživanja ukazuju na povezanost virusnih i bakterijskih infekcija s razvojem vitiliga (57). Budući da urođene stanice mogu prepoznati virusne i bakterijske molekularne obrasce (PAMP, od engl. pathogen-associated molecular patterns), njihova aktivacija može se odvijati i tim putem. Naime, nedavno je utvrđen povećani izražaj citosolnog virusnog senzora, tj. proteinom 5 povezanim s diferencijacijom melanoma (MDA5, od engl. melanoma differentiation-associated protein 5) i IgM protutijelima na citomegalovirus u bolesnika s aktivnim vitiligom. Štoviše, gen IFIH1 koji kodira MDA5 je prepoznat kao jedan od rizičnih gena za pojavu vitiliga. Virusna infekcija može aktivirati MDA5 nakon čega keratinociti luče CXCL10 i CXCL16 koji dovode do pojačanog nakupljanja CD8+ limfocita T u koži, što je ključni događaj u nastanku vitiliga (58). Uloga bakterijskih infekcija u nastanku vitiliga za sada još nije razjašnjena, iako postoje studije o poremećenom mikrobiomu crijeva i kože u pacijenata s vitiligom te nazočnosti disbioze u lezijama vitiliga u usporedbi s perilezijskom kožom (57,59). Zaključno, uloga i put aktivacije PAMP-a u vitiligu još uvijek nisu razjašnjeni, stoga budućim istraživanjima treba rasvijetliti ulogu infektivnih okidača u nastanku bolesti s obzirom na povezanost između drugih imunosno posredovanih kožnih bolesti i infektivnih okidača.

1.1.7. *Uloga urođene imunosti u nastanku vitiliga*

Sustav urođene imunosti most je između oksidativnog stresa i sustava stečene imunosti (57,60). Naime, urođene imunosne stanice, poput NK i DC prepoznaju oštećene stanice putem receptora za prepoznavanje uzoraka (PRR, od engl. pattern recognition receptors) (18,36). Dosadašnjim je istraživanjima utvrđena sustavna i lokalna pojačana aktivnost i izražaj stanica NK (41,42). DC prepoznaju DAMP molekule koje oslobađaju oštećeni melanociti pod stresom i predočuju antigen limfocitima T u limfnim čvorovima, a zatim slijedi protumelanocitni odgovor posredovan limfocitima T (57,60) (**Slika 2**). Štoviše, u serumu pacijenata s vitiligom uočene su povećane razine citokina koje luče stanice NK i DC uključujući IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15 i TNF-α (60). Genetičkim analizama je također utvrđen pojačan izražaj gena uključenih u nadzor urođenog imunosnog odgovora u lezijama i perilezijskoj koži pacijenata s vitiligom kao što su NALP1, TICAM1, IFIH1 (61,62).

1.1.7.1. *Uloga dendritičkih stanica (DC) u nastanku vitiliga*

DC imaju ključnu ulogu u povezivanju oksidativnog stresa sa stečenim imunosnim protumelanocitnim odgovorom (57). Nakon prepoznavanja DAMP-ova, primjerice HSP70i, DC oslobađaju visoke razine IFN-α koji potiče keratinocite na lučenje CXCL9 i CXCL10 te uzrokuje diferencijaciju pomoćničkih limfocita T u Th1 fenotip (48). U aktivnim lezijama vitiliga, plazmocitoidne DC (pDC) izražavaju HSP70 receptor, Lox-1, a smještene su blizu keratinocita koji također izražavaju HSP70. Egzogeni HSP70 može izravno aktivirati pDC i potaknuti lučenje IFN-α, a u prilog tome govore infiltrati DC-a i povećane razine IFN-α uočene u perilezijskoj koži pacijenata s vitiligom (63). Suprotno tome, uočene su smanjene razine IFN-α u krvi bolesnika s vitiligom uz povećane razine cirkulirajućih DCa, IL-12 i TNF-α. Također je utvrđeno da pacijenti s aktivnim vitiligom imaju više razine proupalnih DC-a (CD11b+CD11c+) u perifernoj krvi i u koži u usporedbi s pacijentima sa stabilnom bolešću. Zanimljivo je da su razine protuupalnih DC-a (CD11b+) i protuupalnog citokina IL-10 smanjene u pacijenata s aktivnom bolešću, a razine proupalnog citokina IL-17A su u istih pacijenata povišene. Ovi najnoviji podatci naglašavaju ulogu DC-a u širenju vitiliga putem nadzora razine pro- i protuupalnih citokina (64).

1.1.7.2. *Uloga stanica prirodnih ubojica i urođenih limfoidnih stanica tipa 1 u nastanku vitiliga*

Stanice NK i ILC-1 ubrajaju se u skupinu urođenih limfocita koji čine prvu liniju obrane protiv infekcija i tumora (42). Stanice NK su uključene u rani razvoj vitiliga kao ključne stanice koje potiču stečeni imunosni odgovor. Imaju citotoksično djelovanje te putem aktivacijskih receptora potiču imunosni odgovor ili ga ograničavaju aktivacijom inhibicijskih receptora (42). Prethodnim su istraživanjima uočene povišene razine stanica NK i ILC-1 u krvi i perilezijskoj koži oboljelih od vitiliga (42). U perilezijskoj koži oboljelih je također utvrđen povećan izražaj receptora stanica NK, uključujući receptor aktivacije prirodnih stanica ubojica (NKTR, od engl. natural killer cell triggering receptor) kao i receptora C1 sličnog lektinu stanica ubojica (KLRC1, od engl. killer cell lectin-like receptor C1), CCL20 molekule i citokina TNFα i IL-15 (65). U prilog tome govori analiza transkriptoma gena iz kože oboljelih koja ukazuje na povećan izražaj

gena povezanih s urođenim imunosnim odgovorom poglavito s aktivnošću stanica NK (61).

Kao odgovor na oksidativni stres i DAMP molekule poput HSP70 i HMBG1, stanice NK i ILC-1 pojačavaju lučenje IFN-γ i potiču sintezu kemokina u keratinocitima i melanocitima, poput CXCL9, CXCL10, CXCL11 i IFN-γ. Stoga se čini da stanice NK i ILC-1 imaju ključnu ulogu u početnim fazama nastanka vitiliga te u nadzoru odgovora melanocita i keratinocita na oksidativni stres tijekom kojeg lučenjem velikih količina IFN-γ i kemokina uzrokuju snažan CD8+ posredovani protumelanocitni imunosni odgovor (42,60).

1.1.8. *Stečeni imunosni odgovor u vitiligu*

1.1.8.1. *Uloga citotoksičnih CD8+ limfocita T u nastanku vitiliga*

Vitiligo je složena imunosno posredovana bolest u kojoj su citotoksični limfociti T usmjereni protiv melanocita s posljedičnom pojavom depigmentiranih makula. Iako imunopatogeneza vitiliga nije u cijelosti razjašnjena, citotoksični limfociti T imaju središnju ulogu u započinjanju, održavanju i širenju bolesti. CD8+ limfociti T se nakupljaju u lezijama vitiliga i pokreću protumelanocitni imunosni odgovor (66,67). Autoreaktivni CD8+ limfociti T luče IFN-γ, slijedi IFN-γ-ovisno usmjeravanje limfocita T u periferna tkiva uz lučenje brojnih kemokina i pojačan izražaj adhezijskih molekula na endotelu stanica u lezijama kože (66). Nadalje, IFN-γ potiče keratinocite na lučenje CXCL9 i CXCL10 koji su odgovorni za usmjeravanje antigen-specifičnih autoreaktivnih CD8+ T-limfocita u kožu i za poticanje njihovih izvršnih učinaka (42,68).

Povišen izražaj kemokina CXCL9 i CXCL10 te njima pridruženog receptora CXCR3 uočen je u pacijenata s vitiligom, a razine CXCL9 i CXCL10 su u korelaciji s aktivnošću bolesti, dok je CXCL10 povezan i s težinom bolesti (40,68). Nakupljanje CD8+ limfocita T u blizini epidermalnih melanocita čini izvršnu fazu protumelanocitnog odgovora u vitiligu. Infiltrati limfocita T, poglavito CD8+ fenotipa, uz CD4+ limfocite T, nađeni su u lezijama kože pacijenata s vitiligom što ukazuje na snažan protumelanocitni odgovor posredovan CD8+ limfocitima T (67). Aktivacija CD8+ limfocita T specifičnim melanocitnim antigenima potvrđena je na temelju povećanog izražaja citotoksičnih biljega kao što su granzim-B, perforin (PRF), IFN-γ i TNF-α u lezijama vitiliga (69).

Osim povećanog izražaja granzima B, PRF-a i IFN-γ, CD8+ limfociti T pojačano izražavaju ligand fragmenta stimulacije apoptoze (FasL, od engl. apoptosis stimulation fragment ligand) uzrokujući tako smrt melanocita (70). Osim navedenih citolitičkih molekula, nedavna istraživanja ukazuju na aktivnost drugog puta apoptoze melanocita koji se odvija putem kemokinskog receptora-3 izoforme B, CXCR3B. CXCR3B se nalazi na površini melanocita i veže se za ligand CXCL10 te tako dovodi do apoptoze melanocita. Čini se da je ovaj apoptotski put pojačan u prisutnosti CD8+ limfocita T (41,42).

1.1.8.2. *Uloga regulatornih limfocita T u nastanku vitiliga*

Regulatorne T stanice (Tregs) su CD4+ limfociti T, ključni za uspostavu periferne tolerancije na autoantigene suzbijanjem aktivacije autoreaktivnih CD8+ stanica. One izravno koče izvršne funckije limfocita T, kontaktom između stanica ili lučenjem inhibicijskih citokina (71). Treg stanice se razlikuju prema izražaju CD4+, CD25+ i FOXP3 proteina (72,73). Dosadašnja istraživanja ukazuju na važnu ulogu poremećaja količine i djelovanja Treg stanica u razvoju vitiliga. Smatra se da izmijenjeni omjer Tregs stanica u korist CD8+ stanica T može dovesti do trajne aktivacije ovih protumelanocitnih stanica (74). Osim toga, izražaj Treg stanica smanjen je u područjima izvan granica depigmentacije u koži, čime se omogućuje CD8+ posredovano citotoksično djelovanje protiv melanocita (75). Manjak Tregs-a kod vitiliga uzrokovan je smanjenjem izražaja Tregs receptora CCL22 u koži pacijenata s vitiligom čija uloga je usmjeriti te stanice u lezije. Treg stanice u aktivnim lezijama vitiliga imaju nekoliko funkcionalnih nedostataka poput manjeg izražaja imunosupresivnih citokina kao što su TGF-β i transkripcijski faktor FoxP3 (72). FoxP3 je važan zbog svoje imunomodulatorne uloge, budući da povećava izražaj imunosupresivnih molekula CD25 i CTLA-4, dok istovremeno smanjuje izražaj IL-2 i IL-4, koji su neophodni za aktivaciju stanica T (76). Međutim, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se utvrdila uloga Tregs-a u vitiligu te moguće buduće terapijske strategije temeljene na modulaciji njihove uloge.

1.1.8.3. *Uloga memorijskih rezidentnih stanica T u nastanku vitiliga*

Memorijske T-stanice (TRM, od engl. tissue-resident memory) su raznolika populacija nerecirkulirajućih memorijskih T-stanica koje osiguravaju lokalnu zaštitu od ponovne infekcije patogenima ili stranim antigenima (67,77). Njihova uloga u mnogim imunosno posredovanim kožnim bolestima, uključujući vitiligo, predmet je brojnih istraživanja. Klinički tijek vitiliga obilježen je periodima stabilne bolesti te učestalim recidivima u prethodno zahvaćenim područjima. Smatra se da su autoreaktivne TRM stanice u koži odgovorne za recidiv vitiliga nakon pojave različitih okidača. Infiltrati TRM stanica su uočeni u lezijama i perilezijskoj koži pacijenata s vitiligom (67,78,79). TRM stanice u koži izražavaju biljeg CD69 (lektin tipa C), CD103 (integrin αE) te fakultativno izražavaju CD49a (80). Nedavnim je istraživanjima utvrđena prisutnost melanocitno specifičnih CD8+ TRM-a u perilezijskoj koži pacijenata sa stabilnim i aktivnim vitiligom (81). To ukazuje na njihovu trajnu nazočnost u koži nakon upale koju pokreću T-stanice i na njihovu sposobnost moduliranja budućih recidiva bolesti te održavanja depigmentacije. CD4+ TRM stanice prisutne su u dermisu, dok se CD8+ TRM specifične za melanocite nalaze u epidermisu perilezijske kože u blizini melanocita (78,81). CD8+ TRM su moćni proizvođači IFN-γ i TNFα koji potiču keratinocite na lučenje CXCL9 i CXCL10 uz posljedični dodatni utok TRM stanica u kožu. Usmjeravanje i nakupljanje TRM stanica u kožu posreduje receptor CXCR3 putem liganda CXCL9 i CXCL10 (81,82). CD49a je nedavno utvrđen kao biljeg citotoksičnih CD8+ TRM stanica, koje su snažni proizvođači IFN-γ. Međutim, njihov izražaj ključnih citotoksičnih medijatora, kao što su PRF i granzim, ovisi o IL-15 kojeg luče keratinociti i urođene imunosne stanice. Osim toga, CD8+ TRM stanice izražavaju NKG2D (od engl. C-type lectin-like receptor Natural Killer Group 2D), biljeg njihove aktivacije. U perilezijskoj koži pacijenata s vitiligom nađene su TRM stanice specifične za melanocite koje na površini ne izražavaju aktivacijske receptore. Upravo te stanice mogu uzrokovati pojavu novih lezija vitiliga uz prethodnu aktivaciju odgovarajućim okidačima (81,83).

1.1.9. *Glavna mreža citokina u nastanku vitiliga*

Ključna mreža citokina u patogenezi vitiliga uključuje IFN-γ i TNF-α, uz IL-15 i citokine povezane s Th17 odgovorom kao što su IL-17 i IL-23. Uloga IFN-γ signalnog puta već je prepoznata u patogenezi vitiliga, osobito tijekom početka bolesti (42).

Glavni okidači koji potiču proizvodnju IFN-γ su ROS, Hsp70i i HMGB1 s posljedičnim povišenim izražajem CXCR3B u melanocitima, kao i CXCL9 i CXCL10 u keratinocitima (42). CXCL9 i CXCL10 su ligandi CXCR3 koji potiču nakupljanje stanica stečenog imunosnog sustava u koži i širenje vitiliga (42). IFN-γ djeluje preko JAK/STAT puta s aktivacijom JAK1, JAK2, JAK3 i tirozin kinaze 2 (TYK2) koji posreduju signalizaciju citokina te potiču urođeni i stečeni imunosni odgovor (36). Naime, IFN-α aktivira JAK1/TYK2 dok IFN-γ posreduje svoje učinke putem JAK1/JAK2, IL-2 i IL-15 te aktivira put JAK1/JAK3. Važnost JAK puta u patogenezi vitiliga dokazan je obećavajućim rezultatima postignutim s liječenjem JAK inhibitorima u kliničkim ispitivanjima na pacijentima s vitiligom. TNF-α, s druge strane, djeluje preko receptora TNFR1 ili TNFR2 te aktivira put protein kinaze aktivirane mitogenom (MAPK, od engl. mitogen-activated protein kinase) i nuklearni čimbenik kapa B (NF-kB, od engl. nuclear factor-kappa B). Međutim, rezultati kliničkih ispitivanja TNF-α inhibitora u vitiligu nisu obećavajući, čak je kod nekih pacijenata ta terapija dovela do pogoršanja bolesti (84). Put posredovan citokinom IL-15 također je značajan u patogenezi vitiliga, poglavito zbog njegove uloge u nadzoru TRM stanica (80). IL-15 djeluje preko CD122 receptorske podjedinice koja se nalazi na površini TRM stanica. Luče ga keratinociti bazalnog sloja, a utvrđen je povišen izražaj receptora IL-15R na keratinocitima u perilezijskoj koži pacijenata s vitiligom. Nedavna istraživanja povezuju oksidativni stres s povećanom ekspresijom IL-15 i IL-15Rα u epidermisu oboljelih. Osim toga, IL-15 je u stanju intenzivirati citotoksični potencijal CD49a+ TRM stanica kao i proizvodnju IFN-γ, koji je glavni pokretač razvoja vitiliga (85). Važnost puta IL-15 dodatno je potvrđena rezultatima postignutih inhibicijom IL-15 u mišjem modelu vitiliga (83). Druga osovina citokina koja se istražuje u vitiligu je IL-23/IL-17 os (86). Neke *in vitro* studije su pokazale da IL-17 smanjuje broj melanocita, inhibira melanogenezu i potiče autofagiju putem citokina IL-1β, IL-6 i TNF-α (86). U nekim je istraživanjima uočen povećan broj Th17 limfocita te razine IL-17 i IL-23 u serumu i koži pacijenata s vitiligom (87). Suprotno tome, u drugim istraživanjima nisu utvrđene povišene razine IL-17 u koži oboljelih u usporedbi sa zdravom ili psorijatičnom kožom (78). Nadalje, inhibitor IL-17A sekukinumab, nije pokazao klinički učinak u liječenju vitiliga, nego je pogoršao stanje kod većine pacijenata (88). Stoga, ulogu puta IL-17/23 u razvoju vitiliga treba dodatno razjasniti budućim istraživanjima.

1.2. HALO NEVUS

Halo nevus (HN), također poznat kao Suttonov nevus, leukoderma acquisitum centrifugum ili perinevoidni vitiligo, melanocitni je nevus okružen okruglim ili ovalnim, obično simetričnim prstenom depigmentacije (89). S vremenom često dolazi do regresije središnjeg, pigmentnog dijela nevusa imunološkim odgovorom citotoksičnih limfocita T usmjerenim protiv antigena nevus stanica (90,91). Halo fenomen pojavljuje se oko stečenih melanocitnih nevusa, ali se također može uočiti kod kongenitalnih melanocitnih nevusa, plavih nevusa, Spitzovih nevusa i melanoma.

1.2.1. *Epidemiološka obilježja halo nevusa*

Halo nevusi se pojavljuju s podjednakom učestalošću u osoba oba spola te u prosjeku zahvaćaju oko 1 % populacije (92). Najčešće se pojavljuju oko 15. godine života, poglavito na leđima te u području glave i vrata, a otprilike polovina pacijenata ima više halo nevusa. Često se pojavljuju u djece i adolescenata te mogu biti udruženi s vitiligom (93). Iako točan mehanizam povezanosti halo nevusa i vitiliga nije razjašnjen, čini se da su slični imunosni mehanizmi posredovani stanicama T uključeni u razvoj obje bolesti (90). Halo nevusi se tako češće pojavljuju u pacijenata s povećanim brojem nevusa i/ili osobnom ili obiteljskom poviješću vitiliga. Za razliku od vitiliga, koji često ima kroničan i progresivan tijek, halo nevus predstavlja ograničen i samoregulirajući citotoksični imunološki odgovor, što ga čini prikladnim modelom za proučavanje kontrolirane antimelanocitne imunosti (90). Iako neuobičajeni, poznati su i obiteljski slučajevi pojavljivanja halo nevusa (92). Halo nevusi se rjeđe javljaju u starijoj životnoj dobi te tada treba razmotriti i moguću imunosnu reakciju na melanom (94).

1.2.2. *Klinička slika*

Halo nevusi su melanocitni nevusi okruženi okruglom ili ovalnom aureolom depigmentacije veličine 0,5 do 5 cm (**slika 3**). Središnji melanocitni nevus obično je manji od 5 milimetara u promjeru, homogene je boje i ima oštro ograničene, simetrične rubove (89). Tijekom mjeseci ili čak godina, u halo nevusima odvija se proces involucije koji završava potpunom regresijom središnjeg nevusa. Ovaj proces počinje pojavom aureole depigmentacije oko nevusa, potom se uočava gubitak pigmenta središnjeg

nevusa, s vremenom slijedi potpuni nestanak nevusa i zaostaje kružna depigmentacija, a u završnom stadiju dolazi do repigmentacije kože (95). Opisane promjene mogu se razvijati dulje od 10 godina. Potpuna regresija središnjeg nevusa zabilježena je u više od 50 % slučajeva (95). Međutim, u nekim slučajevima središnji nevus može potamniti umjesto posvijetliti, razvijajući tako retikularnu hiperpigmentaciju. U pojedinim se slučajevima prije ili istodobnom s pojavom okolne depigmentacije može uočiti površinska hiperkeratoza središnjeg nevusa (95). Trenutačno u literaturi postoji malo podataka o čimbenicima koji utječu na promjer aureole, kao i o značaju tog promjera i mogućim korelacijama između promjera nevusa i promjera aureole. Rongioletti i sur. su ustanovili značajnu korelaciju između ova dva parametra. Dakle, što je veći nevus, to je veća njegova aureola. Oni su također opisali "melanocitnu antigenu jedinicu" (MAU, od engl. melanocyte antigenic unit) koja se sastoji od melanocita radijalno raspoređenih oko središnje melanocitne lezije s kojom dijele fenotip i o kojoj funkcionalno ovise (96). Halo fenomen se osim kod halo nevusa može pojaviti i oko pojedinih dobroćudnih tvorbi poput seboroičnih keratoza, dermatofibroma kao i oko malignih tumora, uključujući melanom i karcinom bazalnih stanica kože (97,98). Dermatoskopija, neinvazivna metoda pregleda kožnih lezija dermatoskopom, može pomoći u procjeni i dijagnosticiranju halo nevusa. Globularan i homogen uzorak ili kombinacija ta dva uzorka, tipična su dermatoskopska obilježja halo nevusa, a rjeđe se uočava retikularni uzorak. Okolni hipopigmentirani prsten najčešće je blijed, homogen, simetričan i oštro ograničen od okolne kože (95,99).

Slika 3. Klinička slika halo nevusa. Brojni melanocitni nevusi okruženi ovalnom aureolom depigmentacije (fotodokumentacija autora).

1.2.3. *Patohistološka slika*

Prije samog nastanka klinički vidljive depigmentacije, u okolini gnijezda melanocita ponekad se histološki uočava gusti limfohistiocitni infiltrat (95). Pritom je klinička korelacija vrlo važna, jer neki nevusi mogu imati izražen upalni infiltrat, ali klinički nemaju vidljiv halo, a drugi, neupalni halo nevusi, mogu biti okruženi aureolom, ali histološki nema upalnog infiltrata. Histološki pregled središnjeg nevusa otkriva guste limfocitne i histiocitne infiltrate, a prisutnost i raspored nevus stanica ovisi o stupnju regresije. U potpuno regrediranim halo nevusima mogu se uočiti upalni infiltrati bez nevus stanica (95). Halo nevusi najčešće su povezani sa složenim ili intradermalnim nevusima (100). Upalni infiltrat ima različitu gustoću, sastav i distribuciju u različitim fazama regresije. U početnoj fazi opažaju se intaktna gnijezda nevusa bez atipije te je upalni infiltrat građen od citotoksičnih CD8+ limfocita T i manjeg broja Langerhansovih stanica (LC). Napredovanjem regresije uočavaju se gnijezda melanocita s neravnim rubovima, blagom nuklearnom atipijom i upalnim infiltratom, pretežno građenim od citotoksičnih limfocita T koji okružuju i napadaju gnijezda nevus stanica. Većina T-stanica izražava granzim B, PRF i Fas ligand, što ukazuje na njihovu citotoksičnu aktivnost (91). U leziji se također nalaze pojedinačni CD68+ makrofagi. Konačno, u stadiju potpune regresije nema nevomelanocita i zaostaje oskudan dermalni upalni infiltrat (95).

1.2.4. *Pridružene bolesti*

Halo nevusi mogu biti udruženi s autoimunim bolestima poglavito s vitiligom s kojim dijele sličnu imunopatogenezu (101,102). Tako se halo nevusi često opažaju u djece s postojećim vitiligom, a u pacijenata s vitiligom javljaju se u ranijoj životnoj dobi (22). Međutim, za sada nije razjašnjeno jesu li halo nevusi čimbenik rizika za razvoj vitiliga u djece (102). Veća učestalost halo nevusa uočena je u djece s generaliziranim vitiligom nego kod onih s lokaliziranim oblicima (segmentnim i žarišnim) bolesti. Iako je u nekoliko istraživanja pojava višestrukih halo nevusa povezana s vitiligom, van Geel i sur. smatraju da se rizik od vitiliga smanjuje kada je broj halo nevusa veći od tri (102). Zhou i sur. su pokazali da pacijenti s halo nevusima i Koebnerovim fenomenom imaju veći rizik nastanka vitiliga (103). Štoviše, pacijenti s halo nevusima imaju povećan rizik za razvoj vitiliga, ako član njihove obitelji boluje od vitiliga.

Bolesnici s halo nevusima i vitiligom češće obolijevaju od drugih autoimunih bolesti, poput Hashimotovog tireoiditisa, u usporedbi s pacijentima s halo nevusima bez vitiliga (103). Opisani su i slučajevi halo nevusa koji se pojavljuju uz autoimunu hipertireozu i hipotireozu, a čini se da se halo nevusi povezani s NSV-om češće javljaju u bolesnika s obiteljskom poviješću autoimunih bolesti (103). Pojava halo nevusa također je primijećena u bolesnika s Turnerovim sindromom, genetskim poremećajem karakteriziranim niskim rastom, poremećenim gonadnim i spolnim razvojem što ukazuje na genetsku osnovu za sklonost razvoju halo nevusa (104).

1.2.5. *Imunopatogeneza halo nevusa*

Iako točan patofiziološki mehanizam nastanka halo nevusa nije razjašnjen, smatra se da halo nevusi nastaju stanično posredovanim imunosnim odgovorom usmjerenim protiv antigena nevomelanocita (105). Ovaj imunosni odgovor dovodi do regresije i uništenja nevus stanica, pritom stvarajući karakterističan prsten depigmentacije u lezijama halo nevusa. Nova istraživanja ukazuju na ključnu ulogu citotoksičnog T-staničnog odgovora u patogenezi halo nevusa (106). Naime, CD8+ limfociti T čine većinu upalnih stanica tijekom svih faza razvoja halo nevusa, varirajući od 75% u ranom stadiju do više od 90% kod uznapredovalih lezija (107). Većina limfocita T u lezijama halo nevusa pojačano izražava granzim B, PRF i Fas ligand što govori o njihovoj izrazitoj citotoksičnoj aktivnosti (91). Međutim, točni molekularni ciljevi citotoksičnih stanica T ili način na koji se one aktiviraju u halo nevusu za sada nisu razjašnjeni.

Identifikacija limfocita T, koji se lokalno nakupljaju i aktiviraju antigenima nevus stanica ključna je u istraživanju imunopatogeneze halo nevusa. Analizom staničnih receptora limfocita T koji se nakupljaju u dermisu halo nevusa utvrđena je lokalna proliferacija pojedinih staničnih klonova. Razlikuju se dvije različite populacije limfocita T koje infiltriraju halo nevuse, neaktivirani i poliklonalno ili klonalno aktivirani limfociti T. Većina tih stanica koje se nakupljaju u halo nevusima su mirne ili poliklonske stanice, iz periferne cirkulacije dolaze u kožu te nose biljeg CLA (od engl. cutaneous lymphocyte antigen) koji ih usmjerava u kožu. Samo manji broj klonova limfocita T proliferira *in situ*. Dakle, ograničen broj klonova limfocita T u halo nevusima pojedinog pacijenta najvjerojatnije je rezultat prepoznavanja malog broja antigena (91).

Uz oligoklonski imunosni odgovor limfocita T u halo nevusima, proliferacija specifičnih limfocita T koje dijele istu Vβ-CDR3-Jβ nukleotidnu sekvencu utvrđena je u više halo nevusa kod istog pacijenta. Bez obzira na to dijele li te stanice isti preuređeni TCR α-lanac, ove specifične stanice potječu od malog broja istih klonova αβ T-stanica i prema tome vjerojatno prepoznaju istu molekularnu metu na različitim mjestima u koži (91). Halo nevusi kod pojedinog pacijenta vjerojatno imaju zajedničke ili srodne antigene, stoga ponavljanje TS ili TSG motiva u CDR3 sekvencama proliferirajućih limfocita T kod različitih pacijenata također ukazuje na prepoznavanje srodnih melanocitnih antigena tijekom imunosnog odgovora. Pretpostavlja se da bi antigen koji pokreće imunosnu kaskadu u halo nevusu mogao nastati tijekom diferencijacije normalnih nevusa na koje je imunosni sustav inače tolerantan. Stoga bi se uništavanje melanocita u halo nevusu moglo promatrati kao liza posebnog tipa stanica kroz proces sličan autoimunom posredovan oligoklonskim T-staničnim odgovorom (91).

1.3. Mehanizmi stanične citotoksičnosti posredovani granulizinom, perforinom i perforinom-2

S ciljem obrane organizma od mikroorganizama ili tumora, stanice imunosnog sustava koriste se različitim mehanizmima stanične smrti. Smrt stanice se odvija putem nekroze gdje dolazi do brzog pucanja stanične membrane i posljedično upalnog oslobađanja unutarstaničnog sadržaja, i apoptoze, neupalne programirane smrti stanice u kojoj aktivno sudjeluje stanica koja umire. Uz nekrozu i apoptozu, posljednja istraživanja ukazuju na nove oblike stanične smrti koji uključuju programiranu upalnu nekrozu, nekroptozu i piroptozu, kao i druge oblike programirane stanične smrti neovisne o kaspazi (108). Izvršenje ovih različitih putova stanične smrti posredovano je različitim molekulama koje permeabiliziraju membrane stanica kao što su komplement, PRF, perforin-2 (PRF-2), granulizin (GNLY), gasdermini i pseudokinaza slična domeni kinaze miješane loze (MLKL, od engl. Mixed Lineage Kinase Domain-Like Pseudokinase) (108). GNLY, PRF i PRF-2 pripadaju skupini proteina koji stvaraju pore u membranama (PFP, od eng. pore forming proteins). Stanice imunosnog sustava koriste ih kao ključne izvršne molekule u posredovanju stanične smrti. Nakon aktivacije proteolitičkim cijepanjem ili fosforilacijom, ovi proteini oligomeriziraju, vežu se na membranske lipide te narušavaju integritet membrane (109). Neki od tih proteina učinkovito uništavaju membrane mikroorganizama (komplement, GNLY), drugi djeluju

samo na membrane sisavaca (PRF), a preostali djeluju na oboje (gasdermini) (108,109). Njihovo djelovanje na membrane ciljnih stanica može biti izravno (komplement, gasdermini, MLKL), ili neizravno stvaranjem pora (PRF, GNLY) u membrani ciljne stanice koje omogućavaju isporuku enzima koji aktiviraju programiranu staničnu smrt (110). Svaki od ovih proteina aktivira različitu vrstu stanične smrti: komplement stvara otvore u membranama kako bi uzrokovao nekrozu; PRF isporučuje granzime stanicama kako bi potaknuo o kaspazi neovisnu i ovisnu programiranu staničnu smrt; GNLY pokreće nekrozu i programiranu staničnu smrt u mikrobima, gasdermini posreduju u piroptozi izazvanoj infekcijom ili citosolnim signalima opasnosti, a MLKL sudjeluje u nekroptozi izazvanoj signalizacijom receptora smrti kada je kaspaza-8 inhibirana. Neki od ovih proteina multimeriziraju i umeću se u ciljnu membranu kako bi oblikovali velike pore u obliku β bačvi (komplement, PRF-1 i -2, gasdermini); drugi su manji α-helikalni proteini (GNLY, MLKL) koji oligomeriziraju i oštećuju stanične membrane putem nepotpuno razjašnjenih mehanizama koji mogu, ali i ne moraju uključivati stvaranje transmembranskih pora (108,109).

1.3.1. *Granulizin*

GNLY je citolitički protein nalik sapozinu pohranjen u citoplazmatskim granulama citotoksičnih stanica. Uloga GNLY-a je dvojaka, naime, osim što pomaže u borbi protiv mikroorganizama i tumora, ima i ulogu imunosnog alarmina (110,111). GNLY izražavaju pojedine stanice urođenog (NK, gama delta limfociti T, NKT-stanice) i stečenog imunološkog sustava (CD4+ i CD8+ limfociti) (112). Izražaj GNLY-a potiče IL-2 obitelj citokina te IL-12 iz DC-a kao odgovor na prisutnost PAMP molekula povezanih s mikrobnim peptidima (113).

1.3.1.1. *Građa i smještaj granulizina u stanici*

GNLY je kationski protein građen u obliku peterostruke uzvojnice, pripada obitelji sapozina koji svoj citolitički učinak ostvaruju međudjelovanjem s membranskim lipidima. Građom je homologan svinjskoj molekuli NK-lizinu s kojom dijeli i citotoksični učinak (111). GNLY je konstitutivno izražen u gotovo svim podskupinama NK stanica, CD8+ T-stanicama te manje u CD4+ T-stanicama gdje ga izražavaju izvršni memorijski CD4+ limfociti. Također je nazočan u ostalim citotoksičnim stanicama, uključujući NKT stanice, CD1-ograničene stanice i Vδ2+ γδ T stanice. GNLY je nedavno uočen i u

regulatornim T-stanicama tipa 1, za koje se pokazalo da imaju citotoksično djelovanje ovisno o granzimu i GNLY-u (111,114).

GNLY je u citotoksičnim stanicama pohranjen u obliku dvije izoforme, veličine 15 kDa i 9 kDa koje izvršavaju različite imunosne učinke. 15 kDa i 9 kDa GNLY nazočni su u različitim granulama unutar stanice i oslobađaju se aktivacijom različitih putova. GNLY 9 kDa smješten je u granulama citotoksičnih limfocita s granzimom B i PRF-om te se nakon aktivacije oslobađa procesom egzocitoze uz prisutnost iona kalcija (111). Nasuprot tome, GNLY 15 kDa se nalazi unutar vlastite granule te se oslobađa uz protein kinazu C neovisno o kalciju (115). GNLY 9 kDa vrši citotoksičnu i antimikrobnu ulogu, dok 15 kDa GNLY utječe na sazrijevanje antigen-predočnih stanica te migraciju imunoloških stanica, a njegov moguć citotoksični učinak nije u cijelosti razjašnjen. S obzirom na različite uloge pojedinih izoformi GNLY-a, imunosna stanica odlučuje koju granulu treba koristiti i otpustiti, ovisno o odgovoru koji želi izazvati.

1.3.1.2. *Citotoksična uloga granulizina*

Citotoksična uloga GNLY-a poglavito je vezana uz izoformu 9 kDa koja posjeduje širok spektar citotoksičnih učinaka usmjerenih na brojne bakterije, gljive i protozoe te tumorske stanice. Istraživanja pokazuju kako su u posredovanju citotoksičnosti putem GNLY 9 kDa osobito važne uzvojnice 2 i 3 koje dovode do lize bakterija, dok uzvojnica 3 ima i sposobnost citolize ljudskih stanica i liposoma (116). GNLY 9 kDa je tisuću puta učinkovitiji u razaranju membrana mikroorganizama u usporedbi s ljudskim staničnim membranama u kojima kolesterol priječi djelovanje GNLY -a (108).

Način na koji GNLY 9 kDa ulazi u ciljnu stanicu još uvijek nije u cijelosti razjašnjen, no smatra se kako presavijanjem proizvodi pozitivno nabijeni džep, koji zatim može interferirati s negativno nabijenim regijama staničnih membrana na zaraženim ili maligno promijenjenim stanicama (117). Istraživanje mehanizama kojim GNLY 9 kDa posreduje staničnu smrt pokazuje da povećanje intracelularnog kalcija unutar ciljnih stanica dovodi do oštećenja mitohondrija, povećanja citokroma c i posljedične aktivacije kaspaze 3 te pokretanja apoptoze ciljne stanice (108,117). Povećanje intracelularnog kalcija kao odgovor na rekombinantni GNLY 9 kDa prisutno je u citosolu i u mitohondrijima, a također je povezano sa smanjenjem kalija i

povećanjem čimbenika indukcije apoptoze (AIF, od engl. Apoptosis induction factor) koji predstavljaju biljeg početka procesa apoptoze (111). Međutim, dok rekombinantni GNLY 9 kDa potiče apoptozu na način sličan granzimima, oštećenjem mitohondrija i aktivacijom kaspaze 3, GNLY 9 kDa iz stanica NK uzrokuje oštećenje ER-a te započinje apoptozu putem aktivacije kaspaza 7 i 12, bez aktivacije kaspaze 3 (118). Ukratko, nakon aktivacije, citotoksična stanica otpušta GNLY 9 kDa putem egzocitoze granula ovisnom o kalciju. Ulazak GNLY 9kDa u ciljnu stanicu uzrokuje povećanje koncentracije citoplazmatskog kalcija, uz istodobno smanjenje citoplazmatskog kalija. Slijedi početni stadij apoptoze uz oštećenje ER-a i mitohondrija. Oštećenje ER-a uzrokuje aktivaciju kaspaza 7 i 12, dok oštećenje mitohondrija dovodi do aktivacije kaspaze 3. Indukcija kaskade kaspaza aktivira endonukleaze što na kraju dovodi do smrti stanice (118).

1.3.1.3. *Antimikrobna uloga granulizina*

GNLY je uključen u imunosni odgovor na mnoge različite patogene, uključujući bakterije, parazite, gljive i protozoe. Posebice je značajna njegova uloga u imunosnom odgovoru na *Mycobacterium tuberculosis* gdje je uočena snažna korelacija između prisutnosti GNLY-a i pozitivnog kliničkog ishoda bolesti (119). GNLY izravno uništava izvanstanične bakterije mijenjajući integritet membrane patogena, povećavajući propusnost membrane što za posljedicu ima osmotsku lizu bakterijske stanice (110). Za lizu unutarstaničnih bakterija potrebna je molekula PRF-a koji stvara pore i tako omogućava GNLY-u pristup zaraženoj stanici (111). Zanimljivo, osim što je uključen u izravno ubijanje patogena, GNLY omogućuje ulaz granzima u zaraženu stanicu koji potom aktivacijom kaskade kaspaze i posljedičnom apoptozom ubija ciljnu stanicu (120). GNLY je također uključen u imunološki odgovor na brojne druge patogene uključujući *Mycobacterium leprae*, *Listeria monocytogenes*, *Cryptococcus neoformans* te *Plasmodium falciparum* (121).

1.3.1.4. *Granulizin kao imunološki alarmin*

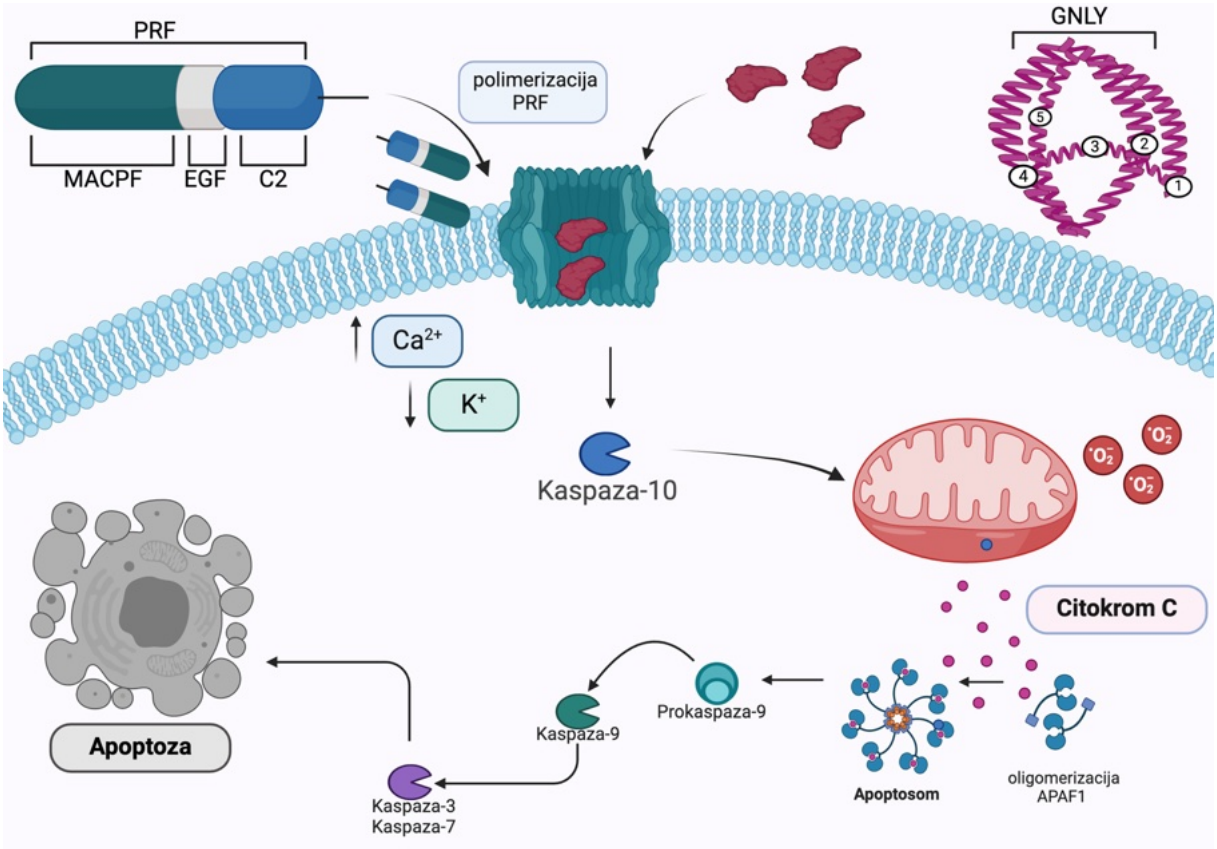
Alarmini su endogeni medijatori, koji usmjeravaju i aktiviraju antigen-predočne stanice, kao što su DC-e, i tako potiču imunosni odgovor. Ulogu imunosnog alarmina vrši GNLY 15 kDa putem kojeg citotoksične stanice potiču sazrijevanje i priljev DC-a na mjesto infekcije ili tumora (111). GNLY 15 kDa usmjerava imunološke stanice, uključujući memorijske CD4+ i CD8+ αβ limfocite T, monocite, stanice NK i DC-e na mjesto upale. Osobito je zanimljiva sposobnost ovog oblika GNLY-a u posredovanju kemotaksije zrelih DC-a, ovisno o njegovoj koncentraciji. Naime, GNLY u niskim koncentracijama privlači zrele DC-e, dok ih u visokim koncentracijama odbija (111). Dakle, GNLY usmjerava nezrele DC-e na mjesto upale ili tumora, dok zrele DC-e upućuje u regionalne limfne čvorove s ciljem pokretanja stečenog imunološkog odgovora. Tako su više koncentracije GNLY 15 kDa uočene na mjestima upale, primjerice kod Stevens-Johnsonovog sindroma, infekcija i tumora (122).

1.3.1.5. *Dodatne uloge granulizina*

GNLY osim antimikrobne aktivnosti vrši i niz drugih funkcija (123). Primjerice, GNLY je biomarker za odbacivanje transplantata, a serumske vrijednosti GNLY u korelaciji su s težinom reakcije presatka protiv domaćina. Nadalje, GNLY se povezuje s nizom kožnih bolesti, poglavito s teškom kožnom reakcijom na lijek, Stevens-Johnsonovim sindromom te pojedinim imunosno posredovanim bolestima poput alopecije areate, lichen planusa te psorijaze (122,124,125). GNLY je ushodno izražen u stanicama NK kože te stanicama placente tijekom prvog tromjesečja trudnoće što ukazuje na njegovu ulogu u zaštiti barijernog epitela od infekcije, a povišena koncentracija GNLY u decidui u ranoj trudnoći povezana je s preeklampsijom (126). Značajno je i protutumorsko djelovanje GNLY-a, osobito izoforme 9 kDa. Osim što je GNLY uključen u izravno uništavanje tumorskih stanica, izražaj GNLY povezan je s boljom prognozom pojedinih tumora (127). Citotoksične stanice urođenog imunosnog sustava, kao što su stanice NK, Vδ2+γδ T stanice i CD-1 ograničene urođene imunosne stanice oslobađaju GNLY 9 kDa kao odgovor na tumor. Nakon toga, GNLY ulazi u ciljnu stanicu kako bi započeo apoptozu. U isto vrijeme, ove urođene citotoksične stanice konstitutivno oslobađaju GNLY 15 kDa i pomažu u usmjeravanju dodatnih populacija imunosnih stanica, uključujući DC-e, na mjesto tumora. Unutar samog tumora, nezrele DC-e fagocitiraju tumorski materijal i zatim, uz pomoć GNLY,

sazrijevaju. Potom se djelovanjem visokih koncentracija GNLY zrele DC-e udaljavaju od samog tumora te se uz gradijent kemokina CCL19 i CCL21 usmjeravaju prema regionalnim limfnim čvorovima gdje pokreću stečeni imunosni odgovor na tumor (111).

Zaključno, GNLY ima dvojaku ulogu u imunosnom odgovoru, citotoksičnu, koju ostvaruje putem izoforme 9 kDa te ulogu imunosnog alarmina koju ostvaruje putem 15 kDa oblika, ključnog za sazrijevanje i usmjeravanje dodatnih populacija imunosnih stanica na mjesto tumora ili infekcije.



Slika 4. Građa i mehanizam djelovanja perforina i granulizina. Monomeri PRF vežu se za lipidni dvosloj te počinju kaskadni proces utiskivanja u staničnu membranu i oblikovanja pora. Tako omogućavaju ulaz GNLY u ciljnu stanicu što dovodi do povećanje razine kalcija unutar ciljnih stanica. Posljedica je oštećenje mitohondrija, povećanje citokroma c uz aktivaciju kaskade kaspaza s posljedičnom apoptozom ciljne stanice. Prilagođeno prema:(120,133)

1.3.2. *Perforin*

PRF je citolitički protein pohranjen u citoplazmatskim granulama stanica NK, γδ T-limfocitima, CD8+ T-stanica te u manjoj mjeri CD4+ T-stanica (108,128). Sposoban je utisnuti se u lipidne dvosloje te tako oblikovati pore u staničnoj membrani ciljnih stanica (129). Stoga se PRF ubraja u proteine koji stvaraju pore na membranama. Posrednik je citotoksičnog imunosnog odgovora na bakterijske i virusne infekcije, tumore, a uključen je i u reakciju odbacivanja transplantata te nastanak niza autoimunih bolesti (130).

1.3.2.1. *Građa i izražaj perforina u stanicama*

PRF je glikoprotein veličine 60-70 kDa (131). Pojedinačna molekula PRF-a sastoji se od četiri domene. N-terminalna i C-terminalna domena specifične su za PRF i povezane s njegovim biološkim ulogama. N-terminalna domena PRF-a sadrži mjesto vezanja iona Ca2+ koje je neophodno za stvaranje pora u membrani ciljne stanice. Preostale dvije domene, nalaze se u središtu molekule, i manjim su dijelom homologne s domenama komponenti komplementa C6, C7, C8 i C9. Jedna od homolognih domena je hidrofobna i ugrađuje se u membranu ciljne stanice pomoću dvije β-plohe i jedne α-heliks strukture. Molekula PRF-a sadrži i domenu bogatu cisteinom, homolognu receptoru lipoproteina niske gustoće (LDL) tipa B i prekursoru epitelnog čimbenika rasta (EGF, od engl. epidermal growth factor) (129,131).

PRF u ciljnoj stanici stvara pore promjera 5-20 nm (132). Poru veličine 14 nm oblikuje približno 20 molekula PRF-a. Nedavno je dokazano da svega 3-4 molekule PRF-a mogu oblikovati dovoljno veliku poru za ulaz izvršnih molekula u ciljnu stanicu (slika 4). Polimerizirane molekule PRF-a tvore cilindrične, hidrofobne pore koje omogućuju slobodan, neselektivan, pasivan transport iona, vode, malomolekulskih tvari i enzima što narušava cjelovitost ciljne stanice (108).

1.3.2.2. *Mehanizam djelovanja perforina*

PRF ima važnu ulogu u citotoksičnom učinku stanica NK i CD8+ limfocita T (128). NK i CD8+ stanice koriste iste mehanizme za uništavanje ciljnih stanica, međutim, putovi njihove aktivacije se razlikuju. Prvi korak citotoksične reakcije je prepoznavanje ciljnih stanica koje može biti specifično, kod CD8+ stanica, ili

nespecifično kod stanica NK. Stanice NK, za razliku od CD8+ stanica, ne prepoznaju antigene vezane na MHC te posjeduju spontanu citotoksičnost prema ciljnim stanicama koja ovisi o oslobađanju PRF-a i granzima B (129,133).

Mehanizam citolize posredovan PRF-om započinje dodirom te prepoznavanjem ubilačke i ciljne stanice vezanjem TCR/CD3-kompleksa i koreceptora na ubilačkoj stanici s antigenima MHC, koji predočavaju peptid i koreceptorima na ciljnoj stanici (131). Taj aktivacijski signal potiče utok iona Ca^{2+} u citotoksične stanice uz orijentaciju njihova sekretornog kompleksa prema membrani ciljne stanice. Slijedi egzocitoza granula u zonu dodira s ciljnom stanicom. Naime, nakon utoka Ca^{2+} u imunološku sinapsu, monomeri PRF-a stječu avidnost za lipide stanične membrane i započinju kaskadni proces utiskivanja u membranu ciljne stanice i oblikovanje pora. PRF monomeri vežu se na fosforilkolinske nastavke na membrani ciljne stanice te polimeriziraju u cilindrične kanale građene od lipofilne vanjske i hidrofilne unutarnje površine (131).

Procesi ugradnje i polimerizacije molekula PRF-a ovise o različitim čimbenicima uključujući temperaturu, sadržaj fosfatidilserina, čimbeniku aktivacije trombocita (PAF, od engl. Platelet Activation Factor) kao i aktivaciji membranskih receptora (129). Oko 20 udruženih monomera stvara tubularnu strukturu unutarnjeg promjera od 5 do 20 nm, koja je utisnuta u lipidni dvosloj. Perforinski kanali služe kao visokovodljivi, neselektivni ionski kanali kroz koje voda i molekule niske molekularne mase mogu slobodno ući u ciljnu stanicu (129,131). Tako nastaje poremećaj koloidno-osmotskog gradijenta i smrt stanice nekrozom. Dakle, PRF može izravno ukloniti ciljnu stanicu toničkim šokom ili omogućiti granzimima i drugim apoptotskim molekulama ulaz u ciljnu stanicu. Granzim B uzrokuje staničnu smrt aktivacijom kaskade kaspaza ili cijepanjem proteina Bid odnosno endogenim (mitohondrijskim) putem apoptoze (132).

Toksini pohranjeni u citotoksičnim sekretornim vezikulama (CSV, od engl. cytotoxic secretory vesicles) dovode do smrti ciljne stanice u samo nekoliko minuta. U vezikulama se osim PRF, nalaze i pro-apoptotske serin proteaze od kojih su najjači granzim B i kondroitin sulfat proteoglikani, koji zajedno s kiselim pH (oko 5,0) imaju ključnu ulogu u usmjeravanju PRF-a i granzima u CSV, a također sudjeluju u stabilizaciji vezikula (134,135). Naime, PRF je potpuno neaktivan prije nego što uđe u sekretorne granule, budući da N-glikozilacija C-završetka na mjestu Asn549 sprječava

oligomerizaciju monomera PRF-a i stvaranje pora, štiteći tako stanicu domaćina. Uklanjanje ovog glikana proteolitičkim cijepanjem unutar CSV-a aktivira PRF, međutim, on ostaje funkcionalno inertan zbog kiselog pH unutar granula. Potpuna aktivacija se događa kada se PRF otpusti u neutralnu pH okolinu imunosne sinapse, gdje je koncentracija slobodnih iona Ca2+ visoka (>1,0 mM), što omogućava djelovanje PRF-a na membranu ciljne stanice (136).

1.3.2.3. *Uloga perforina u razvoju upalnih bolesti*

PRF se povezuje s nastankom brojnih kroničnih upalnih imunosno posredovanih bolesti (IMID, od engl. Immune-Mediated Inflammatory Disease). Povišen izražaj PRF-a uočen je u krvi i kožnim lezijama bolesnika sa psorijazom i lihen planusom što upućuje na značaj PRF-a u imunopatogenezi obje bolesti (137,138). Osim psorijaze i lihen planusa, povezan je s razvojem reumatoidnog i psorijatičnog artritisa, vulgarnog pemfigusa, sustavnog eritematoznog lupusa te Behcetove bolesti (139). PRF također ima ulogu i u nizu neuroupalnih bolesti poput multiple skleroze, Susac sindroma te Parkinsonove bolesti (140–142). Niži izražaj PRF-a utvrđen je kod djece s Hashimotovom bolešću uz značajnu korelaciju između izražaja PRF-a i kliničke slike bolesti. Suprotno tome, povišen izražaj PRF-a uočen je kod odraslih bolesnika s Gravesovom i Hashimotovom bolešću (143). PRF je ushodno reguliran u dijabetesu tipa 1 gdje citotoksične T-stanice uništavaju β stanice gušterače citolitičkim putem ovisnom o PRF/granzimu B i Fas/FasL-u uz potporu proupalnih citokina (144). Mehanizmi stanične smrti posredovani PRF-om pokreću se kao odgovor na vanjski imunosni podražaj, obično patogene viruse ili unutarstanične patogene (145). Međutim, u nekim je slučajevima imunosni odgovor kvalitativno ili kvantitativno neodgovarajući i uzrokuje oštećenje tkiva. Primjerice, citotoksičan odgovor usmjeren protiv *Coxsackie* virusa koji inficiraju stanice srčanog mišića može uzrokovati kolateralno oštećenje miokarda s gubitkom mišićne mase što za rezultat ima zatajenje srca (146,147). PRF-om posredovana smrt makrofaga zaraženih protozoom *Leishmania braziliensis* za posljedicu ima kroničnu upalu kože s ulceracijama koje traju mjesecima nakon uklanjanja patogena antiparazitarnim lijekovima (148). Uslijed infekcija virusom hepatitisa B, zbog izraženog citotoksičnog odgovora u koji je uključen i PRF, može doći do fulminantnog zatajenja jetre (149).

1.3.3. *Perforin-2*

PRF-2 je protein koji stvara pore u membranama, ključan u posredovanju urođenog imunosnog odgovora protiv fagocitiranih bakterija (150). PRF-2 kodira gen MPEG1 (od engl. Macrophage Expressed Gene 1) koji je prvi puta opisan 1995. godine u makrofagima. Konstitutivno ga izražavaju fagociti (makrofagi, DC-e, neutrofili, mikroglija), pojedini urođeni limfociti poput γδT stanica i stanica NK te epitelne stanice, uključujući keratinocite. Osim fagocita, PRF-2 može izražavati svaka stanica sisavaca ektodermalnog, mezodermalnog i endodermalnog porijekla konstitutivno ili potaknuta IFN-om tipa I i II (151).

1.3.3.1. *Građa i smještaj perforina-2 u stanici*

PRF-2 se ubraja u superobitelj proteina koji stvaraju pore u membrani ciljnih stanica putem kompleksa koji napada membranu (MACPF, od engl. Membrane Attack Complex, Perforin domain) (152). Istoj superobitelji pripadaju i litički bakterijski toksini kao što su pneumolizin i perfringolizin O te komponente komplementa C9 i PRF (153). Riječ je o superobitelji proteina neophodnih za borbu protiv bakterijskih patogena. Iako primarno tvore pore u membranama ciljnih patogena te time dovode do poremećaja homeostaze i stanične smrti, ovi proteini također omogućuju ulaz ostalim izvršnim molekulama u ciljne stanice (154). Nedavnim je istraživanjima utvrđeno da PRF-2 olakšava ulazak brojnih antimikrobnih izvršnih molekula u stanice uključujući proteaze, reaktivne vrste kisika i dušika te baktericidne peptide (155).

PRF-2 je transmembranski protein tipa I koji se pomoću C-terminalne transmembranske spirale sidri u fosfolipidni dvosloj stanične membrane (Slika 5). Presavijena ektodomena PRF-2 nalazi se na luminalnoj strani ER s repom koji strši u citoplazmu. Citoplazmatski rep i transmembranska spirala olakšavaju prijenos PRF-2 kroz ER i Golgijev aparat do sekretornih vezikula kako bi se spojio i nakupio unutar ranih vezikula endosomskog antigena 1 (EEA1, od engl. early endosome antigen 1) (151). Za razliku od PRF-a i komponente komplementa C9 koji nemaju transmembransku i P2 domenu, u molekuli PRF-2, domena P2 veže se za negativno nabijene lipide i posreduje u početnim interakcijama s membranom ciljne stanice. Domene P2 i MACPF tvore vanjski odnosno unutarnji prsten polimera, a čini ga 16 monomera visine 83 Å. Nastanak pora u ciljnoj membrani prati dramatično povećanje

visine monomera koji rastvaraju svoja četiri amfipatska β-lanca. Potom se β-lanci poravnavaju jedan s drugim te s onima susjednih podjedinica oblikuju poru poput bačve u staničnoj membrani (152).

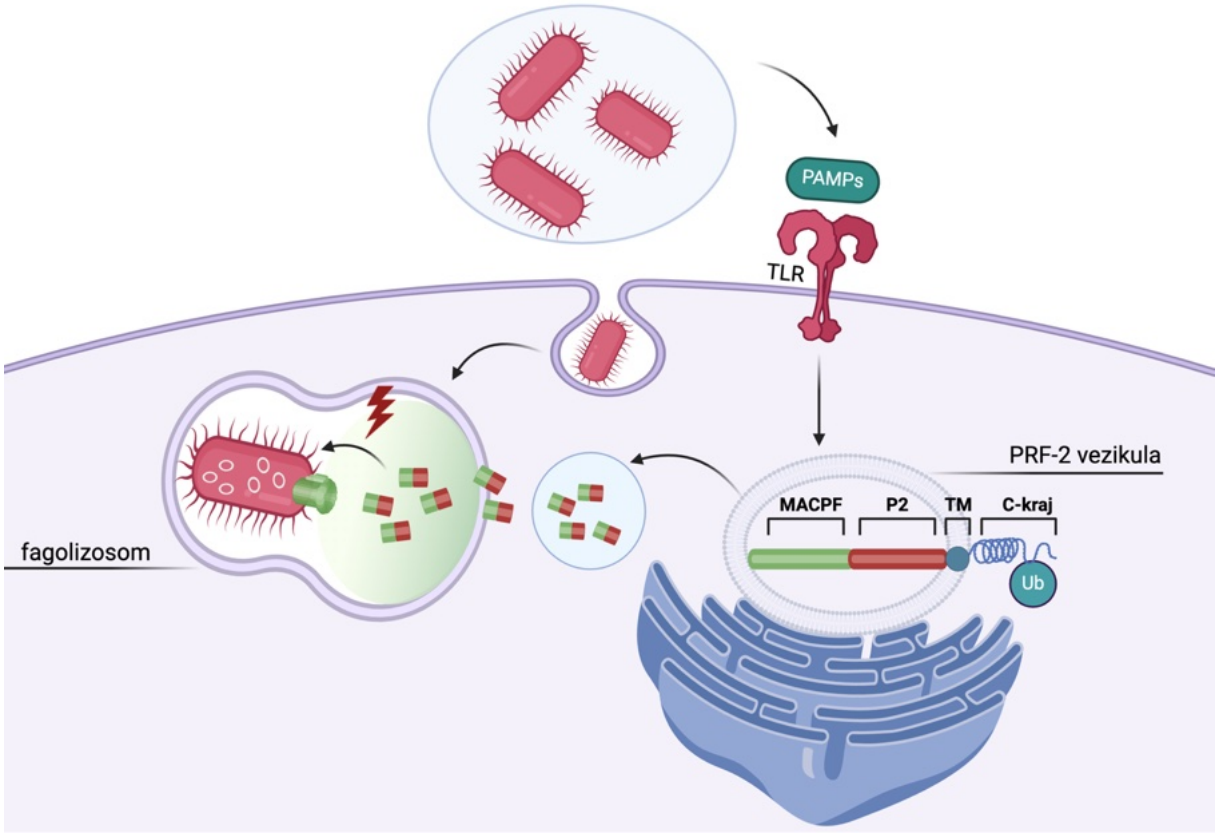
1.3.3.2. *Izražaj i mehanizam djelovanja perforina-2 u stanici*

PRF-2 je prvotno otkriven u makrofagima, međutim, danas je poznato da mnoge vrste stanica izražavaju PRF-2 (151). Konstitutivno je izražen u makrofagima i urođenim limfocitima, no njegov se izražaj može potaknuti u velikom broju drugih vrsta stanica poput epitelnih stanica i fibroblasta nakon aktivacije proupalnim signalima (156). Tako čimbenik tumorske nekroze α (TNFα) i lipopolisaharid (LPS) sinergistički potiču izražaj PRF-2 u brojnim stanicama preko MyD88 i NFκB signalnog puta. Signaliziranje putem LPS-a i IFN tipa II dovodi do posttranslacijske modifikacije citosolne regije molekule PRF-2 (157). Nakon ulaska mikroorganizama, stanice potaknute LPS-om i IFNγ započinju monoubikvitinaciju PRF-2 s pomoću Cullin-RING ligaze i kompleksa proteina koji sadrži ponavljanje β-transducina. Potom se EEA1+/PRF2+ vezikule prenose i stapaju s vezikulama povezanim s LAMP+ proteinom (LAMP, od engl. lysosome-associated membrane protein) u kasnim fagosomima, fagolizosomima i/ili lizosomima. U konačnici se PRF-2 smješta unutar vezikula fagosoma koje sadrže endocitirane mikroorganizme gdje slijedi izvršna faza citotoksičnog odgovora (150).

PRF-2 može premostiti dva lipidna dvosloja mehanizmom sličnim primordijalnoj unutarstaničnoj imunosnoj sinapsi, gdje se membrana fagosoma i ciljna membrana dovode u neposrednu blizinu s pomoću konjugiranih staničnih mehanizama, npr. interakcije receptor:antigen. Takva blizina omogućava ciljano stvaranje pore samo u dvoslojnoj membrani patogena, dok istovremeno priječi oštećenje stanične membrane domaćina. Razlike u svojstvima membrane domaćina i patogena tako osiguravaju selektivnost djelovanja PRF-2 (150).

1.3.3.3. *Uloga PRF-2 u imunološkom odgovoru*

PRF-2 jest izvršna molekula urođenog imunosnog sustava čija točna uloga u imunosnom odgovoru još nije u cijelosti razjašnjena. Pretpostavlja se da je PRF-2 predak poznatijih imunosnih izvršnih molekula poput komponente komplementa C9 i PRF-a. PRF-2 ima sposobnost ubijanja širokog spektra unutarstaničnih bakterija, uključujući meticilin otporan *Staphylococcus aureus (MRSA), enteropatogenu Escherichiju coli, Salmonellu typhimurium, Mycobacterium avium i smegmatis, Yersiniu pseudotuberculosis, Chlamydiju trachomatis i Listeriju monocytogenes*. Stoga u odsustvu PRF-2, stanice podliježu bakterijskoj infekciji (151,157). PRF-2 je uključen u nadzor signalnog puta IFN-a tipa I i ključan je za pravilno sklapanje i signalizaciju proksimalnih kompleksa receptora interferon-α/β (IFNAR) (158). U staničnoj liniji s manjkom PRF-2, signalni put IFN tipa I postaje neučinkovit zbog gubitka fosforilacije STAT1, STAT2, JAK1 i TYK2 puta posredovanih IFNAR-om. Suprotno tome, PRF-2 ima važnu ulogu u prekomjernoj signalizaciji putem IFN-a tijekom imunosnog odgovora što je obilježje brojnih upalnih imunosno posredovanih bolesti. PRF-2 također ima ulogu u cijeljenju rane i njihovoj zaštiti od infekcije patogenim bakterijama. Naime, γδ limfociti T, bazalni keratinociti, endotelne stanice i fibroblasti izražavaju PRF-2 u epidermisu što ima značajnu ulogu u obrani kože od infekcije patogenim mikroorganizmima. Povećani izražaj PRF-2, uočen tijekom ranjavanja kože i kasnije tijekom epitelizacije rane, ključan je za uklanjanje patogena, međutim infekcija *S. aureusom* smanjuje imunosni odgovor posredovan s PRF-2. Dakle, PRF-2 je neophodan za uklanjanje bakterija, a njegovo utišavanje odnosno manjak mijenja okruženje rane, onemogućava učinkovito cijeljenje rana što dovodi do kronične infekcije (156). Zaključno, MPEG1 nije značajan samo u izvršnom imunološkom odgovoru posredovanom stanicama, već i u nadzoru imunološkog odgovora putem IFNα/β signalnog puta uključenog u nastanak autoimunih bolesti i tumora.



Slika 5. Shematski prikaz građe i mehanizma djelovanja perforina-2. Nakon prepoznavanja PAMP molekula putem TLR receptora na makrofagima, dolazi do monoubikvitinacije PRF-2. Slijedi otpuštanje PRF-2 vezikula iz ER-a te stapanje s membranom fagolizosoma. Potom se MACPF domena usmjerava na uzročnika i stvara pore u njegovoj membrani. ER-endoplazmatski retikulum, C-citoplazmatski, PAMP-molekularni obrasci povezani s patogenom, TLR-toll like receptor, TM - transmembranski dio. Prilagođeno prema:(152)

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Iako su GNLY, PRF i PRF-2 prepoznati kao citotoksične molekule uključene u razvoj mnogih imunosno posredovanih bolesti, podataka o njihovoj ulozi u nastanku vitiliga i halo nevusa gotovo da nema. Stoga je glavni cilj istraživanja bio ispitati izražaj citotoksičnih molekula GNLY, PRF i PRF-2 u vitiligu i halo nevusu.

U ovom istraživanju polazimo od osnovne hipoteze da su citotoksične molekule GNLY, PRF i PRF-2 uključene u patogenezu vitiliga i halo nevusa te da postoji značajna razlika u njihovu izražaju u lezijama vitiliga i halo nevusa u odnosu na perilezijsku kožu i kožu zdravih osoba kontrolne skupine, kao i razlika u njihovu izražaju između epidermalnog i dermalnog odjeljka kože. Također pretpostavljamo da postoji razlika u izražaju navedenih citotoksičnih molekula u različitim limfocitnim subpopulacijama između vitiliga i halo nevusa.

Stoga su postavljeni sljedeći ciljevi istraživanja:

- Istražiti izražaj citotoksičnih molekula GNLY, PRF i PRF-2 u lezijama i perilezijskoj koži pacijenata s vitiligom te u zdravoj koži kontrolne skupine
- Istražiti izražaj citotoksičnih molekula GNLY, PRF i PRF-2 u lezijama i perilezijskoj koži pacijenata s halo nevusom te u zdravoj koži kontrolne skupine
- Istražiti razlike u izražaju citotoksičnih molekula GNLY, PRF i PRF-2 u lezijama pacijenata s vitiligom i halo nevusom u odnosu na perilezijsku kožu bolesnika s vitiligom i halo nevusom te u odnosu na zdravu kožu kontrolne skupine
- Istražiti izražaj GNLY-a u subpopulaciji CD8+ limfocita T i CD56+ stanica NK u lezijama i perilezijskoj koži pacijenata s vitiligom i halo nevusom te u zdravoj koži kontrolne skupine
- Istražiti izražaj PRF-a u subpopulaciji CD8+ limfocita T i CD56+ stanica NK u lezijama i perilezijskoj koži pacijenata s vitiligom i halo nevusom te u zdravoj koži kontrolne skupine
- Istražiti izražaj PRF-2 u subpopulaciji CD68+ makrofaga u lezijama i perilezijskoj koži pacijenata s vitiligom i halo nevusom te u zdravoj koži kontrolne skupine

- Istražiti razlike u izražaju dvostruko pozitivnih CD8+GNLY+ i CD56+GNLY+ stanica u lezijama i perilezijskoj koži pacijenata s vitiligom i halo nevusom te u zdravoj koži kontrolne skupine
- Istražiti razlike u izražaju CD8+PRF+ i CD56+PRF+ stanica u lezijama i perilezijskoj koži pacijenata s vitiligom i halo nevusom te u zdravoj koži kontrolne skupine
- Istražiti razlike u izražaju CD68+PRF-2+ stanica u lezijama i perilezijskoj koži pacijenata s vitiligom i halo nevusom te u zdravoj koži kontrolne skupine
- Istražiti distribuciju stanica koje izražavaju citotoksične molekule GNLY, PRF i PRF-2 u lezijama i perilezijskoj koži pacijenata s vitiligom i halo nevusom, zasebno u epidermalnom i dermalnom odjeljku kože

3. ISPITANICI, MATERIJALI I METODE

U istraživanje je bilo uključeno 30 pacijenata s vitiligom, 30 s halo nevusom te 30 ispitanika kontrolne skupine zdravih osoba usklađenih prema dobi i spolu s istraživanim skupinama bolesnika. Dijagnoze navedenih bolesti, u skladu s kliničkim kriterijima i dermatološkim statusom, postavio je specijalist dermatovenerologije te su dodatno potvrđene patohistološkom dijagnostikom. U pacijenata s vitiligom je potom, prema kliničkim mjerilima VES (Vitiligo Extent Score) i VIDA (Vitiligo Disease Activity) indeksima, procijenjena proširenost i aktivnost bolesti.

3.1. Kliničke značajke ispitanika

Temeljna mjerila za uključivanje ispitanika u skupinu pacijenata s vitiligom bila su: klinička obilježja kožnih lezija koja odgovaraju vitiligu, patohistološka potvrda dijagnoze, pacijenti koji nikada nisu liječeni sustavnom terapijom ili su s njezinom primjenom prestali prije najmanje četiri mjeseca te pacijenti koji nisu primjenjivali lokalnu terapiju za liječenje vitiliga u posljednja dva tjedna. U skupinu pacijenata s halo nevusom uključeni su pacijenti s kliničkim obilježjima kožnih lezija koja odgovaraju halo nevusu uz patohistološku potvrdu dijagnoze halo nevusa. U kontrolnu skupinu zdravih ispitanika uključene su punoljetne osobe mlađe od 70 godina, bez kožne ili sustavne bolesti, koje su dobrovoljno potpisale informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju. Iz istraživanja su isključeni maloljetni pacijenti ili oni stariji od 70 godina, pacijenti s drugom dokazanom sustavnom, imunosnom ili zloćudnom bolesti te pacijenti koji su uzimali terapiju s mogućim utjecajem na imunosni odgovor.

Svi ispitanici nalazili su se u popisu pacijenata Klinike za dermatovenerologiju KBC Rijeka. Pacijentima koji su zadovoljili uključne kriterije sudjelovanja u istraživanju uzeta je detaljna anamneza s ciljem dobivanja podataka o spolu, dobi, trajanju bolesti i pratećim bolestima. Klinički oblik bolesti određen je dermatološkim statusom, u skladu s karakterističnim izgledom i rasporedom kožnih lezija. Kod pacijenata s vitiligom težina bolesti procijenjena je primjenom kliničkih mjerila aktivnosti i proširenosti bolesti, VIDA i VES zbrojem.

VIDA je ljestvica od šest stupnjeva za procjenu aktivnosti vitiliga. Bodovanje se temelji na subjektivnoj procjeni pacijenta o aktivnosti bolesti tijekom određenog razdoblja.

Aktivni vitiligo se definira kao širenje postojećih lezija ili pojava novih lezija. Ocjenjivanje je sljedeće: +4 aktivna bolest u posljednjih 6 tjedana ili manje, +3 aktivna bolest u posljednjih 6 tjedana do 3 mjeseca, +2 aktivna bolest u posljednjih 3 - 6 mjeseci, +1 aktivna bolest u posljednjih 6 - 12 mjeseci, 0 stabilna bolest tijekom posljednje godine ili više godina, -1 stabilna bolest sa spontanom repigmentacijom tijekom posljednje godine ili više godina.

S pomoću VES zbroja utvrđena je proširenost vitiliga. Riječ je o računalnoj aplikaciji za kliničku procjenu proširenosti vitiliga autora van Geel i suradnika te međunarodne radne skupine za procjenu vitiliga (159). VES zbroj se temelji na procjeni postotka depigmentacije na 19 različitih područja tijela, osim dlanova, tabana i stražnje površine tjemena. Proširenost vitiliga na pojedinačnom području može biti 0% do 100%. Odabirom slike koja je najsličnija kliničkoj slici pacijenta na tom području tijela procjenjuje se svako od navedenih 19 područja, a ukupna vrijednost VES zbroja dobiva se zbrajanjem vrijednosti depigmentacije svih 19 lokalizacija.

3.1.1. *Etičnost istraživanja i informirani pristanak*

Istraživanje je provedeno u skladu s četiri temeljna bioetička načela (osobni integritet – autonomnost, pravednost, dobročinstvo i neškodljivost), te onima iz njih izvedenima (privatnost, povjerenje), uvažavajući Nürnberški kodeks, najnoviju reviziju Helsinške deklaracije te ostale mjerodavne dokumente. Svi ispitanici upoznati su s planom i ciljevima istraživanja usmenim i pisanim putem prije uključivanja u ispitivanje. Svaki ispitanik je vlastoručno potpisao obrazac pisanog pristanka odnosno informiranu suglasnost. Svi uzorci tkiva šifrirani su brojevima i slovima kako se imena sudionika ne bi mogla povezati s medicinsko-znanstvenim rezultatima ispitivanja. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo KBC Rijeka te Etičko povjerenstvo za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci.

3.2. MATERIJALI

3.2.1. *Biološki materijal*

Od svih su se ispitanika istraživanja, nakon potpisivanja informiranog pristanka, uzorkovali bioptati kože. Ispitanicima kontrolne skupine je pri elektivnom kirurškom uklanjanju dobroćudne kožne promjene (fibroma ili dermalnog madeža) uzorkovan bioptat zdrave kože koji čini periferni dio ekscizata.

3.2.1.1. *Bioptati kože*

U bolesnika s vitiligom se u lokalnoj anesteziji uzorkovao bioptat lezije vitiliga i perilezijske kože veličine 5 x 5 mm. Bioptati lezije halo nevusa te perilezijske kože dijelom su izdvojeni iz arhivskog materijala, a dijelom dobiveni ekscizijom halo nevusa u lokalnoj anesteziji. Biopsije vitiliga su uzete s trupa (n=18), gornjih i donjih ekstremiteta (n=9) i područja zapešća (n=3).

Pojedine lezije pokazivale su kliničke znakove aktivne bolesti kao što su trikromno obojenje (n=6), depigmentacije nalik na konfete (n=9) i Koebnerov fenomen (n=3), dok su preostale bile klinički stabilne (n=12). Bioptati perilezijske kože uzeti su 5 mm udaljeno od ruba lezije vitiliga odnosno halo nevusa. Potom se patohistološki potvrdila dijagnoza vitiliga i halo nevusa te je uslijedilo ispitivanje imunosnih zbivanja. Kod zdravih ispitanika kontrolne skupine se u lokalnoj anesteziji kirurški uklonila dobroćudna kožna promjena i uzorkovao bioptat zdrave kože koji je činio periferni dio ekscizata.

3.2.2. *Kemikalije i reagensi*

Kemikalije, puferske otopine i kitovi koji su korišteni tijekom istraživanja navedeni su u **tablici 1**.

Tablica 1. Kemikalije i reagensi

Kemikalija, reagens, pufer	*Proizvođač*
Aceton	Kemika, Zagreb, Hrvatska
DAB (diaminobenzidin)	Dako, Glostrup, Danska
Destilirana ili deionizirana voda	Kemika, Zagreb, Hrvatska
Citratni pufer, pH 6.0	Serva, Heidelberg, Njemačka
Etilni alkohol	Merck, Darmstadt, Njemačka
Goveđi serumski albumin (BSA, od engl. *bovine serum albumin*)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Njemačka
Hematoksilin	Merck, Darmstadt, Njemačka
Kozji serum	Dako, Glostrup, Danska
Ksilen	Merck, Darmstadt, Njemačka
LSAB kit (od engl. *labelled streptavidin biotin*)	Dako, Glostrup, Danska
Natrij acetat trihidrat	Kemika, Zagreb, Hrvatska
Natrij-azid (NaN_3)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Njemačka
Natrij-citrat	Difco, Detroit, SAD
Natrij-dihidrogenfosfat-2-hidrat	Kemika, Zagreb, Hrvatska
Natrij-hidrogenfosfat-2-heksahidrat ($NaH_2PO_4 \times 2H_2O$)	Kemika, Zagreb, Hrvatska
Natrij-hidroksid (NaOH)	Kemika, Zagreb, Hrvatska
Natrij-klorid (NaCl)	Kemika, Zagreb, Hrvatska
Octena kiselina	Kemika, Zagreb, Hrvatska
Paraformaldehid	Kemika, Zagreb, Hrvatska
Puferirana fiziološka otopina, TBS (od engl. *Tris buffered saline*)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Njemačka
Puferirana fiziološka otopina, TBST (od engl. *Tris buffered saline-Tween)*	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Njemačka
Tris-Etilen-daimin-tetra-acetat (EDTA), pH 9.0	Gibco, Gaithersburg, MD, SAD
Puferirana fiziološka otopina (PBS)	Gibco, Gaithersburg, MD, SAD
Tween 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Njemačka
Vodikov peroksid (H_2O_2)	Kemika, Zagreb, Hrvatska

3.2.3. *Protutijela*

Protutijela koja su korištena u izvođenju istraživanja navedena su u **tablici 2**.

Tablica 2. Protutijela

Protutijelo	Proizvođač
protiv granulizina (NCL-L-granulysin), mišje monoklonalno	Leica Biosystems, Newcastle, UK
protiv perforina-2, zečje poliklonalno	Abcam, Cambridge, UK
protiv perforina, mišje monoklonalno	Abcam, Cambridge, UK
protiv CD8, mišje monoklonalno	Dako, Glostrup, Danska
protiv CD56, mišje monoklonalno	Dako, Glostrup, Danska
protiv CD68, mišje monoklonalno	Dako, Glostrup, Danska
kozje protu-zečje, biotinizirano	Dako, Glostrup, Danska
kozje protu-mišje, biotinizirano	Dako, Glostrup, Danska

3.3. METODE

3.3.1. *Imunohistokemija*

Izražaj molekula GNLY, PRF i PRF-2 istražen je metodom imunohistokemije na rezovima tkiva lezije i perilezijske kože pacijenata s vitiligom i halo nevusom te na rezovima zdrave kože kontrolne skupine. Jednostrukom imunohistokemijom utvrdili smo obrazac izražaja pojedine ispitivane molekule kako bi utvrdili njezinu lokalizaciju i distribuciju unutar epidermisa i dermisa ispitivanog uzorka kože. Dvostrukom imunohistokemijom istražena je istovremena pojavnost molekula GNLY, PRF i PRF-2 s pojedinim limfocitnim subpopulacijama (CD3+CD8+ limfociti T i CD3+CD56+ stanice NK) ili makrofagima (CD68) u koži.

3.3.1.1. *Jednostruka imunohistokemija*

Bioptati kože pripremljeni su standardnim postupkom za patohistološku analizu, uključujući 24-satnu fiksaciju u 4%-tnom paraformaldehidu i uklapanje u parafin. Iz parafinskih blokova učinjeni su rezovi debljine 3 μm kliznim mikrotomom (Leica

Microsystems, Wetzlar, Njemačka) te montirani na SuperFrost™ Ultra Plus mikroskopska stakalca (Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Njemačka). Nakon deparafinizacije u ksilolu i rehidracije kroz silazne koncentracije alkohola (100%–70%), uslijedio je postupak otkrivanja antigena kuhanjem rezova u puferskoj otopini Tris-EDTA, pH 9.0 tijekom 15 minuta te hlađenje tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi. Endogena peroksidazna aktivnost blokirana je inkubacijom rezova u 3%-tnoj otopini vodikova peroksida tijekom 10 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega su rezovi isprani Trisom puferiranom fiziološkom otopinom (TBS, od engl. *Tris buffered saline*). Nakon permeabilizacije membrane stanica primjenom Tweena, sadržanog u TBST-u (od engl. *Tris buffered saline with Tween*) tijekom 15 minuta, provedena je inkubacija u 2%-tnoj otopini kozjeg seruma (NGS, od engl. *normal goat serum*) i 2%-tnoj otopini goveđeg serumskog albumina (BSA, od engl. *bovine serum albumin*) uz dodatak 0,05% NaN_3, tijekom 30 minuta kako bi se spriječilo nespecifično vezanje protutijela. Uslijedila je inkubacija u otopini primarnog protutijela tijekom 1 sata na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije s primarnim protutijelom, primijenjena je otopina konjugata sekundarnog protu-mišjeg i protu-zečjeg protutijela, polimera i peroksidaze hrena (Dako Envision+Dual Link System-HRP (od engl. *horseradish peroxidase detection system*), Dako, Glostrup, Danska) tijekom 30 minuta kako bi se pojačao signal specifičnog vezanja. Između pojedinih koraka protokola uzorci su ispirani TBS-om. Diaminobenzidin (DAB) je korišten kao kromogen tijekom 8-10 minuta, a kontrastiranje je postignuto primjenom hematoksilina. Nakon dehidracije rezova kroz seriju gradijenata koncentracije alkohola (od 70 do 100%) rezovi su montirani i naknadno fotodokumentirani. Kao negativne kontrole korišteni su rezovi tkiva koji su inkubirani u puferskoj otopini, a ne u otopini primarnog protutijela. Protutijela, reagensi i puferske otopine korištene u postupku imunohistokemije navedeni su u tablici 1. i 2.

Nakon imunohistokemijskog bojenja, digitalizirani rezovi (Fritz, Precipoint, Njemačka) analizirani su pomoću softvera QuPath (verzija 0.4.2, The University of Edinburgh, UK) (160). Za svaki uzorak analizirano je 10 reprezentativnih vidnih polja pri povećanju 400x, pri čemu su područja analize odabrana iz epidermalnog i dermalnog odjeljka uz izbjegavanje artefakata i područja nekroze. Detekcija stanica provedena je automatskim algoritmom za prepoznavanje jezgri, uz naknadnu klasifikaciju stanica na pozitivne i negativne prema intenzitetu DAB signala. Prag pozitivnosti određen je na temelju intenziteta obojenja u negativnim i pozitivnim kontrolnim uzorcima te je

primijenjen jednako na sve analizirane preparate. Rezultati su izraženi kao postotak pozitivno obojenih stanica u odnosu na ukupan broj detektiranih stanica u pojedinom odjeljku kože. Ukupni izražaj po uzorku izračunat je kao omjer ukupnog broja pozitivnih stanica u epidermisu odnosno dermisu prema ukupnom broju svih stanica u pojedinom odjeljku kože. Analiza je provedena na šifriranim uzorcima bez uvida u kliničke podatke ispitanika.

3.3.1.2. *Dvostruka imunohistokemija*

Tkivni rezovi pripremljeni su postupkom rehidracije, otkrivanja antigena i permeabilizacije kako je opisano u postupku jednostruke imunohistokemije. Blokada endogene peroksidazne aktivnosti provedena je kako je prethodno opisano u postupku jednostruke imunohistokemije. Rezovi su najprije inkubirani s primarnim protutijelom protiv GNLY, PRF ili PRF-2, nakon čega je provedena vizualizacija primjenom HRP/DAB sustava. Nakon ispiranja u TBS-u, rezovi su inkubirani s drugim primarnim protutijelom, mišjim monoklonalnim protu-ljudskim protutijelom protiv CD8 (1:100), CD56 (1:1000) odnosno CD68 (1:100), tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi. Irelevantno mišje monoklonalno IgG protutijelo korišteno je kao negativna kontrola. Nakon ispiranja rezovi su inkubirani s biotiniliranim kozjim protu-mišjim sekundarnim protutijelom tijekom 30 minuta, a signal je potom pojačan LSAB (streptavidin–biotin) sustavom konjugiranim s alkalnom fosfatazom (Dako REAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse; Dako, Glostrup, Danska) tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon blokade endogene alkalne fosfataze primjenom puferske otopine s levamizolom, primijenjen je Fast Red kromogen, kojim su CD8+, CD56+ odnosno CD68+ stanice obojene crveno. Dvostrukom imunohistokemijom na istom su preparatu vizualizirana različita obojenja (smeđe i crveno) radi kvantifikacije jednostruko pozitivnih stanica (GNLY+, PRF+ i PRF-2+ – smeđe; CD8+, CD56+, CD68+ – crveno) te dvostruko pozitivnih stanica (CD8+GNLY+, CD8+PRF+, CD56+GNLY+, CD56+PRF+ i CD68+PRF-2+ – kombinacija smeđe i crvene boje). Time je omogućena procjena lokalizacije, distribucije i udjela navedenih staničnih subpopulacija u pojedinim kožnim odjeljcima. Protutijela, reagensi i puferske otopine korištene u postupku dvostruke imunohistokemije navedene su u tablicama 1 i 2. Rezultati dvostruke imunohistokemije izraženi su kao postotak dvostruko pozitivnih stanica unutar ukupnog broja odgovarajuće stanične subpopulacije u pojedinom

odjeljku kože. Konkretno, CD8+GNLY+ i CD8+PRF+ stanice izražene su kao postotak među svim CD8+ T-limfocitima, CD56+GNLY+ i CD56+PRF+ stanice kao postotak među svim CD56+ NK-stanicama, a CD68+PRF-2+ stanice kao postotak među svim CD68+ makrofagima. Ukupni izražaj po uzorku izračunat je na temelju ukupnog broja dvostruko pozitivnih stanica u epidermisu i dermisu u odnosu na ukupan broj odgovarajućih stanica u oba odjeljka, čime je dobiven objedinjeni izražaj u lezijama i perilezijskoj koži vitiliga i halo nevusa.

3.3.2. *Statistička obrada podataka*

Rezultati istraživanja statistički su analizirani uporabom računalnog programa GraphPad Prism, verzija 10.1.1 (Dotmatics Inc., Boston, MA, SAD). Podaci su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom (25. – 75. percentila). Za usporedbu kvantitativnih varijabli između triju nezavisnih skupina korišten je Kruskal–Wallisov test, uz Dunnov post hoc test za višestruke usporedbe među pojedinim skupinama. Razlike između dviju nezavisnih skupina analizirane su Mann–Whitneyjevim U-testom. Rezultati su grafički prikazani okvirnim dijagramima (box-plot), pri čemu okvir predstavlja interkvartilni raspon (25. – 75. percentila), medijan je označen središnjom linijom, a brkovi prikazuju minimalnu i maksimalnu vrijednost (min–max). Rezultati su smatrani statistički značajnima pri razini $p<0,05$. Za ispitivanje povezanosti kontinuiranih numeričkih varijabli korišten je Spearmanov koeficijent korelacije (ρ). Statistička značajnost korelacije procijenjena je pri razini $p<0,05$. Jačina povezanosti tumačena je prema apsolutnoj vrijednosti Spearmanova koeficijenta korelacije (ρ): $\rho < 0,20$ – neznatna ili bez povezanosti, $0,20 \leq \rho < 0,40$ – slaba povezanost, $0,40 \leq \rho < 0,70$ – umjerena povezanost, $\rho \geq 0,70$ – jaka povezanost. Slikovni i tablični prikazi izrađeni su u programima GraphPad Prism, verzija 10.1.1 (Dotmatics Inc., Boston, MA, SAD) i Microsoft PowerPoint 2018 (Microsoft, Redmond, WA, SAD).

4. REZULTATI

4.1. Kliničke i demografske značajke ispitanika

U istraživanje su uključene tri skupine ispitanika, pacijenti s vitiligom i halo nevusom koji su ambulantno liječeni na Klinici za dermatovenerologiju KBC Rijeka te kontrolna skupina zdravih ispitanika. Kliničke i demografske značajke ispitanika prikazane su u **tablici 3**.

Od 30 pacijenata s vitiligom, njih 14 su bili muškarci (47%), a 16 žene (53%), životne dobi u rasponu od 23 do 68 godina (prosječna dob 38 godina). Pacijenti su bolovali od vitiliga u trajanju od 2 mjeseca do 10 godina (prosječno 3,11 godine). Najčešće prateće bolesti kod pacijenata s vitiligom bile su bolesti štitnjače kod 10 pacijenata (33%), halo nevusi kod 3 pacijenta (10%) i psorijaza kod 2 pacijenta (6%). Proširenost i aktivnost bolesti kod pacijenata s vitiligom procijenjeni su pomoću VES i VIDA zbroja. VES zbroj iznosio je od 0,25 - 14,60 (prosječna vrijednost 4,79), a VIDA zbroj od 0 do +4 (prosječna vrijednost 2,4). Aktivne lezije (konfeti, trikromne lezije, Koebnerov fenomen) zabilježene su kod 18 (60%) pacijenata, dok su stabilne lezije utvrđene u 12 pacijenata (40%).

U istraživanje je uključeno i 30 pacijenata s halo nevusom, od kojih su 11 (36%) bili muškarci, a 19 (63%) žene. Raspon životne dobi bio je od 18 do 63 godine (prosječna dob 30 godina). Pacijenti su halo nevus imali u trajanju od 3 mjeseca do 12 mjeseci (prosječno 7,5 mjeseci). Najčešće pridružene bolesti kod pacijenata s halo nevusom bile su bolesti štitnjače kod 2 pacijenta (6,67%) i vitiligo kod 2 pacijenta (6,67%).

Kontrolnu skupinu činilo je 30 zdravih osoba, 18 muškaraca (60%) i 12 žena (40%), usporedivih prema spolu i dobi s oboljelima od vitiliga odnosno halo nevusa. Dob ispitanika kontrolne skupine kretala se od 22 do 66 godina (prosječna dob 47 godina).

Tablica 3. Kliničke i demografske značajke ispitanika

	Vitiligo	**Halo nevus**	**Kontrolna skupina**
Broj pacijenata	30	30	30
Spol, n (%)			
Muški	14 (47%)	11 (34%)	18 (60%)
Ženski	16 (53%)	19 (63%)	12 (40%)
Dob, SV (raspon)	38 (23–68)	30 (18-63)	47 (22-66)
Pridružene bolesti n, (%)			
Bolest štitnjače	10 (33%)	2 (6,67%)	
Psorijaza	2 (6%)		
Halo nevusi	3 (10%)		
Vitiligo		2 (6.67%)	
Trajanje bolesti, SV (raspon)	3,11 g. (2 mj.–10g.)	7,5 mj. (3–12 mj.)	
VES zbroj	4,79 (0,25-14,60)		
VIDA zbroj	2,4 (0-4)		
Aktivne lezije			
Lezije poput konfeta	9 (30%)		
Trikromne lezije	6 (20%)		
Koebnerov fenomen	3 (10%)		
Stabilne lezije	12 (40%)		

g.-godina, mj.-mjesec, SV-srednja vrijednost, VES (od engl. Vitiligo Extent Score), VIDA (od engl. Vitiligo Disease Activity)

4.2. Izražaj citotoksičnih molekula granulizina, perforina i perforina-2 u leziji i perilezijskoj koži bolesnika s vitiligom

S obzirom na to da su mehanizmi stanične citotoksičnosti posredovane molekulama granulizinom, perforinom i perforinom-2 u vitiligu još uvijek nedovoljno ispitani, u ovom smo istraživanju krenuli od pretpostavke da navedene molekule imaju važnu ulogu u imunopatogenezi ove bolesti. S ciljem razjašnjavanja njihova doprinosa lokalnoj i perilezijskoj upalnoj kaskadi bolesti, istražili smo izražaj GNLY, PRF i PRF-2 u lezijama i perilezijskoj koži pacijenata s vitiligom. Kako bismo utvrdili postoje li razlike u lokalnom izražaju navedenih citotoksičnih molekula, analizirali smo njihov izražaj u koži lezija vitiliga te u klinički nepromijenjenoj perilezijskoj koži pacijenata, a dobivene rezultate usporedili smo s izražajem GNLY-a, PRF-a i PRF-2 u zdravoj koži ispitanika kontrolne skupine. Na taj smo način nastojali razjasniti sudjeluju li ove molekule u lokalnom citotoksičnom oštećenju melanocita te imaju li perilezijska područja vitiliga obilježja rane ili subkliničke imunološke aktivnosti koja prethodi razvoju klinički vidljivih lezija.

Kako bismo precizno utvrdili koje stanice upalnog infiltrata izražavaju citotoksične molekule od interesa, proveli smo analizu njihova izražaja unutar određenih subpopulacija imunoloških stanica primjenom metode dvostruke imunohistokemije. Stoga smo ispitali izražaj GNLY i PRF u citotoksičnim CD8+ limfocitima T te CD56+ stanicama NK, dok je izražaj PRF-2 ispitan u CD68+ stanicama monocitno-makrofagne linije, koje sudjeluju u pokretanju, održavanju i regulaciji lokalnog upalnog odgovora.

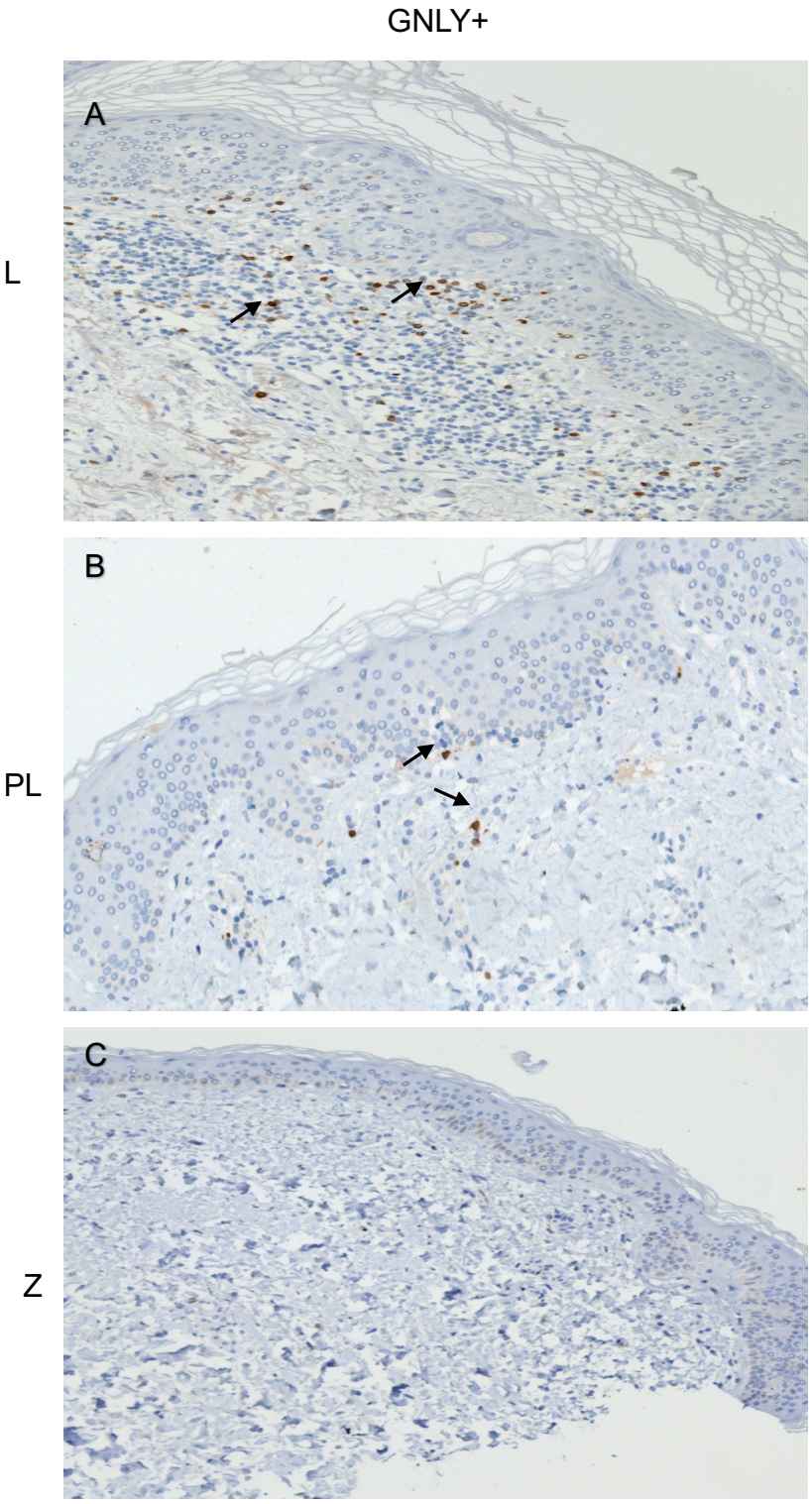
4.2.1. *Izražaj molekule granulizina u leziji i perilezijskoj koži pacijenata s vitiligom u odnosu na zdravu kožu kontrolne skupine*

Izražaj GNLY u leziji i perilezijskoj koži pacijenata s vitiligom te u zdravoj koži ispitanika kontrolne skupine prikazan je na slici 6 i 7. Imunohistokemijski izražaj navedene molekule analiziran je u oba odjeljka kože, odnosno u epidermisu i dermisu. GNLY+ stanice uglavnom su uočene u dermalnom odjeljku lezije vitiliga, poglavito u gornjim slojevima papilarnog dermisa, a manje u bazalnom i suprabazalnom sloju epidermisa (slika 6A). Isti obrazac izražaja GNLY+ stanica, ali u značajno manjoj mjeri, opažen je u perilezijskoj koži oboljelih gdje GNLY+ stanice također većinom infiltriraju dermis, a

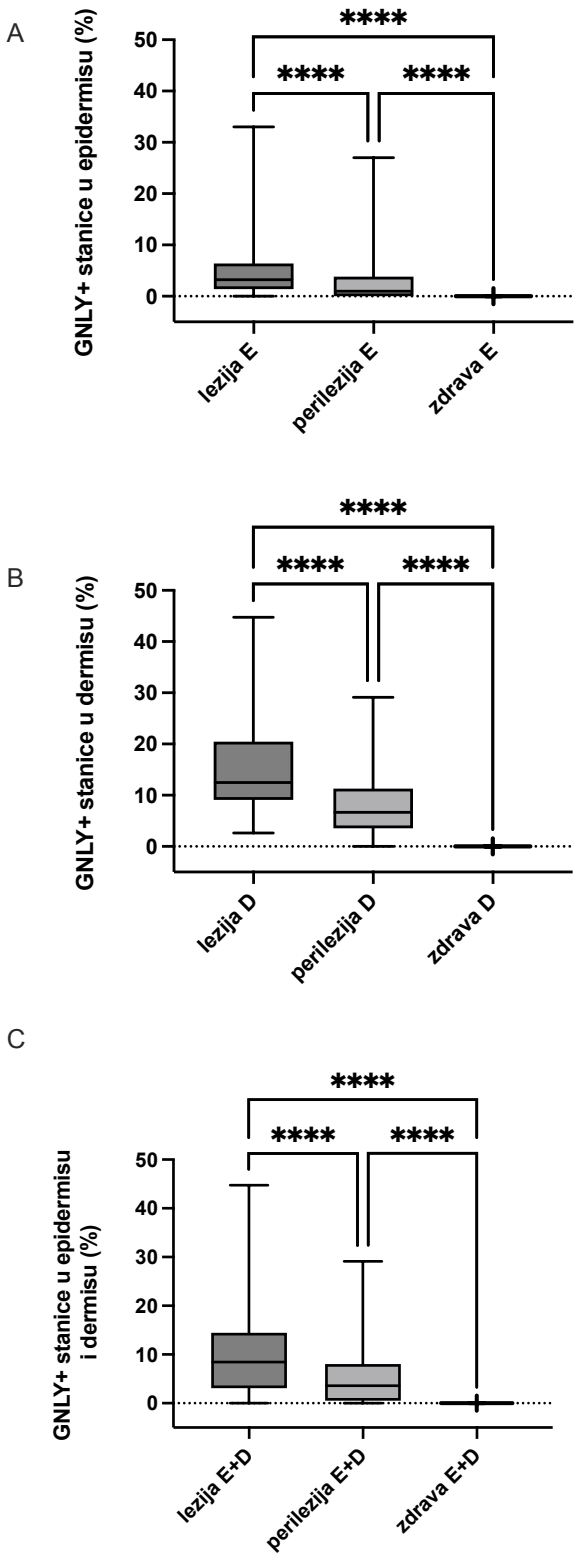
u manjem broju bazalni sloj epidermisa (slika 6B). U kontrolnoj skupini ispitanika nisu uočene GNLY+ stanice u epidermisu niti u dermisu (slika 6C).

Istraživanjem kvantitativnog izražaja GNLY u epidermalnom odjeljku ispitivanih bioptata utvrđen je značajno viši udio GNLY+ stanica u epidermisu lezije u odnosu na epidermis perilezijske kože pacijenata s vitiligom ($p<0,0001$), kao i u odnosu na epidermis zdrave kože kontrolne skupine ($p<0,0001$) (slika 7A). Također je zapažen statistički značajno viši udio GNLY+ stanica u epidermisu perilezijske kože oboljelih u odnosu na epidermis ispitanika kontrolne skupine ($p<0,0001$) (slika 7A). Ispitivanjem izražaja GNLY u dermalnom odjeljku uočen je statistički značajno viši udio GNLY+ stanica u dermisu lezije u odnosu na dermis perilezijske kože pacijenata s vitiligom ($p<0,0001$) te u odnosu na dermis zdrave kože kontrolnih ispitanika ($p<0,0001$) (slika 7B). Također je utvrđen statistički značajno viši udio GNLY+ stanica u dermisu perilezijske kože oboljelih u odnosu na dermis ispitanika kontrolne skupine ($p<0,0001$) (slika 7B).

Kvantitativnom analizom ukupnog izražaja GNLY u epidermalnom i dermalnom odjeljku lezije i perilezijske kože pacijenata s vitiligom te zdrave kože kontrolne skupine, utvrđen je statistički značajno viši postotak GNLY+ stanica u lezijama u odnosu na perilezijsku kožu pacijenata s vitiligom ($p<0,0001$) te zdravu kožu kontrolne skupine ($p<0,0001$) (slika 7C). Također je uočen statistički značajno viši udio GNLY+ stanica u perilezijskoj koži oboljelih u odnosu na kožu ispitanika kontrolne skupine ($p<0,0001$) (slika 7C).



Slika 6. GNLY+ stanice u: (A) leziji vitiliga, (B) perilezijskoj koži te u (C) zdravoj koži (povećanje 200x). GNLY+ stanice su obilježene smeđom bojom. GNLY+ stanice su bile najbrojnije u leziji vitiliga (A), malobrojne u perilezijskoj koži (B), dok u zdravoj koži kontrolne skupine GNLY+ stanice nisu nađene (C). L-lezija, PL-perilezija, Z-zdrava koža



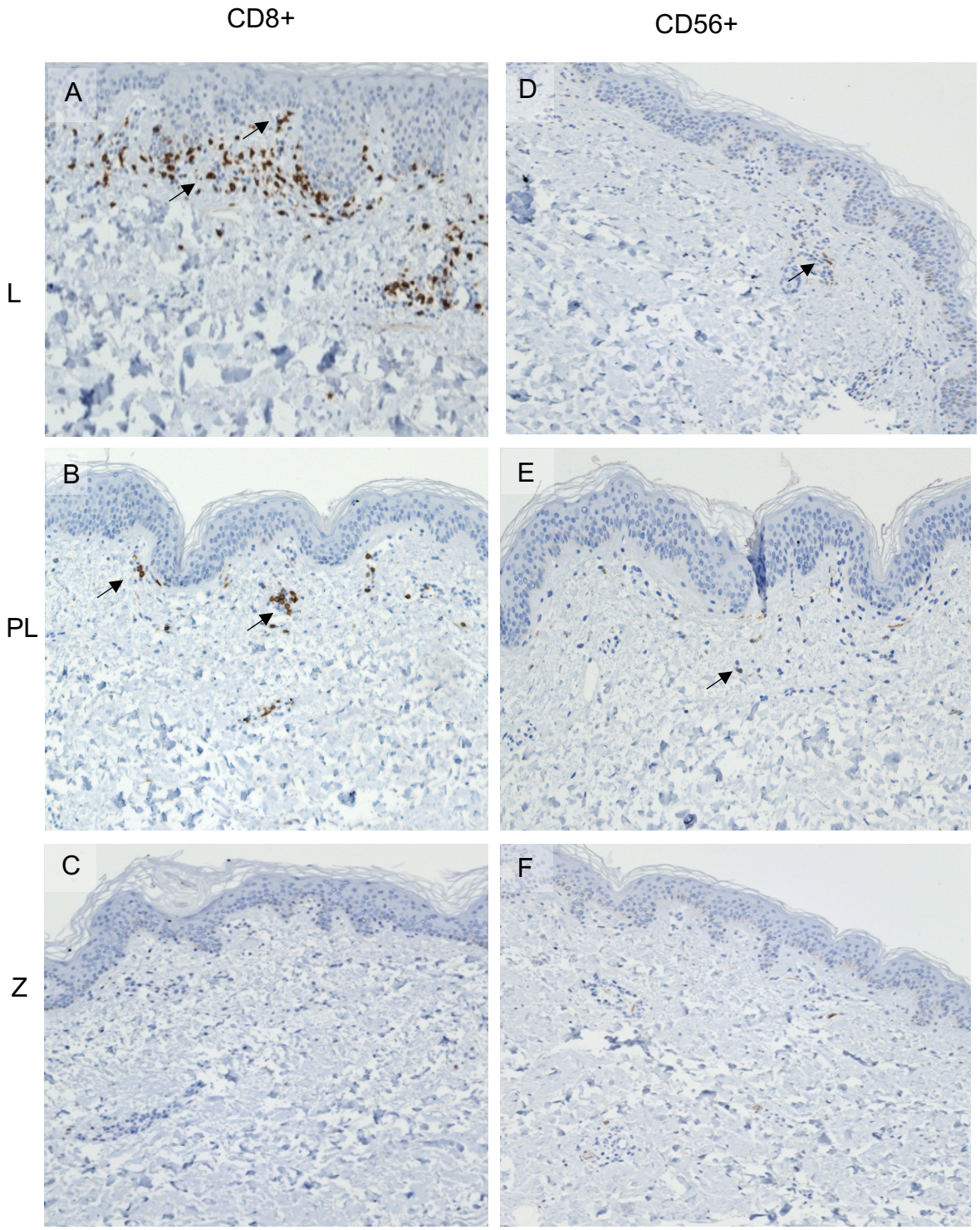
Slika 7. Postotak GNLY+ stanica među stanicama: (A) epidermisa lezije, perilezijske i zdrave kože; (B) dermisa lezije, perilezijske i zdrave kože i (C) epidermisa i dermisa lezije, perilezije i zdrave kože kontrolne skupine. ****p<0,0001

4.2.2. *Izražaj CD8+ i CD56+ stanica u leziji i perilezijskoj koži pacijenata s vitiligom u odnosu na zdravu kožu kontrolne skupine*

Izražaj izvršnih citotoksičnih stanica, CD8+ limfocita T i CD56+ stanica NK istražen je u epidermisu i dermisu bioptata lezije i perilezijske kože pacijenata s vitiligom te u oba odjeljka zdrave kože kontrolne skupine (slika 8 i 9). Gust upalni infiltrat CD8+ T-limfocita opažen je u dermisu lezija vitiliga, većinom u papilarnom sloju i u vršcima dermalnih papila, a manje u bazalnom sloju epidermisa (slika 8A). U lezijama je uočen značajno veći broj CD8+ stanica nego u perilezijskoj koži pacijenata s vitligom i u zdravoj koži kontrolnih ispitanika. Sličan obrazac izražaja CD8+ stanica utvrđen je u perilezijskoj koži oboljelih, s manjim brojem CD8+ limfocita T smještenih većinom u papilarnom sloju dermisa (slika 8B). U zdravoj koži kontrolne skupine ispitanika nisu uočene CD8+ stanice, ni u epidermisu niti u dermisu (slika 8C).

Rijedak infiltrat CD56+ stanica NK uočen je u lezijama vitiliga, no njihov je broj ipak značajno veći nego u perilezijskoj koži pacijenata s vitiligom i u koži zdravih ispitanika (Slika 8D). Glavnina CD56+ stanica opažena je u srednjim dijelovima papilarnog dermisa te manje u bazalnom sloju epidermisa lezija vitiliga (slika 8D). U perilezijskoj koži oboljelih od vitiliga uočen je nešto manji broj CD56+ stanica NK nego u lezijama, rijetko raspoređenih poglavito u papilarnom dermisu, a u epidermisu ih uopće nema (slika 8E). U zdravoj koži nisu nađene CD56+ stanice NK (slika 8F).

Istraživanjem kvantitativnog izražaja CD8+ limfocita T u epidermalnom odjeljku ispitivanih bioptata utvrđen je statistički značajno viši udio CD8+ stanica u epidermisu lezije u odnosu na epidermis perilezijske kože ($p<0.01$) te epidermis zdrave kože ($p<0.0001$) (slika 9A). Također je uočen statistički značajno viši udio CD8+ stanica u epidermisu perilezijske kože oboljelih u odnosu na zdravu kožu kontrolnih ispitanika ($p<0.0001$) (slika 9A). Ispitivanjem izražaja CD8+ stanica u dermalnom odjeljku uočen je statistički značajno viši udio CD8+ stanica u dermisu lezije u odnosu na dermis perilezijske kože pacijenata s vitiligom ($p<0.0001$) te u odnosu na dermis zdrave kože kontrolne skupine ($p<0.0001$) (slika 9B). Također je uočen statistički značajno viši udio CD8+ stanica u dermisu perilezijske kože oboljelih u odnosu na zdravu kožu kontrolnih ispitanika ($p<0.0001$) (slika 9B).



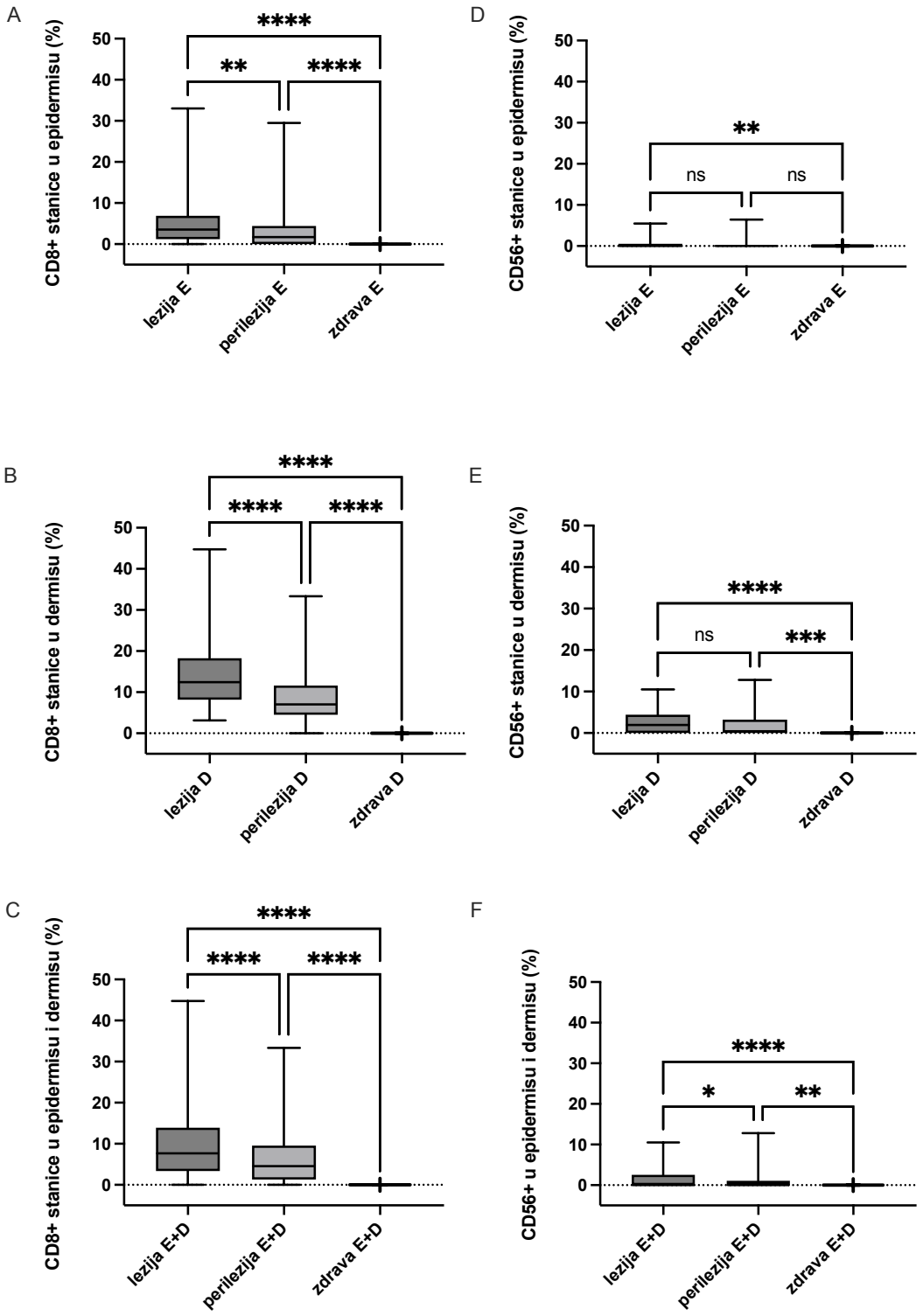
Slika 8. CD8+ i C56+ stanice u: (A,D) leziji vitiliga, (B,E) perilezijskoj koži te (C,F) u zdravoj koži kontrolne skupine (povećanje 200x). CD8+ i CD56+ stanice su obilježene smeđom bojom. CD8+ i CD56+ stanice su bile najbrojnije u leziji vitiliga (A,D), malobrojne u perilezijskoj koži (B,E), dok u zdravoj koži kontrolne skupine CD8+ i CD56+ stanice nisu nađene (C,F). L-lezija, PL-perilezija, Z-zdrava koža

Kvantitativnom analizom izražaja CD8+ limfocita T u epidermalnom i dermalnom odjeljku lezije i perilezijske kože pacijenata s vitiligom te zdrave kože kontrolne skupine, utvrđen je statistički značajno viši postotak CD8+ stanica u lezijama u odnosu na perilezijsku kožu oboljelih ($p<0,0001$) te zdravu kožu kontrolne skupine ($p<0,0001$) (slika 9C). Također je uočen statistički značajno viši udio CD8+ stanica u perilezijskoj koži oboljelih u odnosu na zdravu kožu kontrolnih ispitanika ($p<0,0001$) (slika 9C).

Kvantitativnim istraživanjem izražaja CD56+ NK stanica u epidermalnom odjeljku ispitivanih bioptata nije uočena statistički značajna razlika u udjelu CD56+ stanica između epidermisa lezije vitiliga i epidermisa perilezijske kože, kao ni između epidermisa perilezijske i zdrave kože. Međutim, u epidermisu lezije vitiliga utvrđen je statistički značajno viši udio CD56+ stanica u usporedbi s epidermisom zdrave kože kontrolne skupine ($p<0,01$) (slika 9D).

Analizom izražaja CD56+ NK stanica u dermalnom odjeljku uočeno je da, iako je u dermisu lezije vitiliga prisutan nešto veći broj CD56+ stanica u odnosu na dermis perilezijske kože, ta razlika nije bila statistički značajna. Nasuprot tome, u usporedbi s dermisom zdrave kože kontrolnih ispitanika, uočen je statistički značajno viši udio CD56+ stanica u dermisu lezije vitiliga ($p<0,0001$), kao i u dermisu perilezijske kože ($p <0,001$) (slika 9E).

Kvantitativnom analizom ukupnog izražaja CD56+ NK stanica u epidermisu i dermisu lezije i perilezijske kože pacijenata s vitiligom te zdrave kože kontrolne skupine, utvrđen je statistički značajno viši postotak CD56+ stanica u lezijama u odnosu na perilezijsku kožu pacijenata s vitiligom ($p<0,05$) te u odnosu na zdravu kožu kontrolnih ispitanika ($p<0,0001$) (slika 9F). Također je utvrđen statistički značajno viši udio CD56+ stanica u perilezijskoj koži oboljelih u usporedbi s kožom ispitanika kontrolne skupine ($p<0,01$) (slika 9F).



Slika 9. Postotak CD8+ i CD56+ stanica među stanicama: (A,D) epidermisa lezija vitiliga, perilezijske kože i zdrave kože; (B,E) dermisa lezija vitiliga, perilezijske kože i zdrave kože; (C,F) epidermisa i dermisa lezija vitiliga, perilezijske i zdrave kože. *p<0,05; **p< 0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001; ns – nije značajno

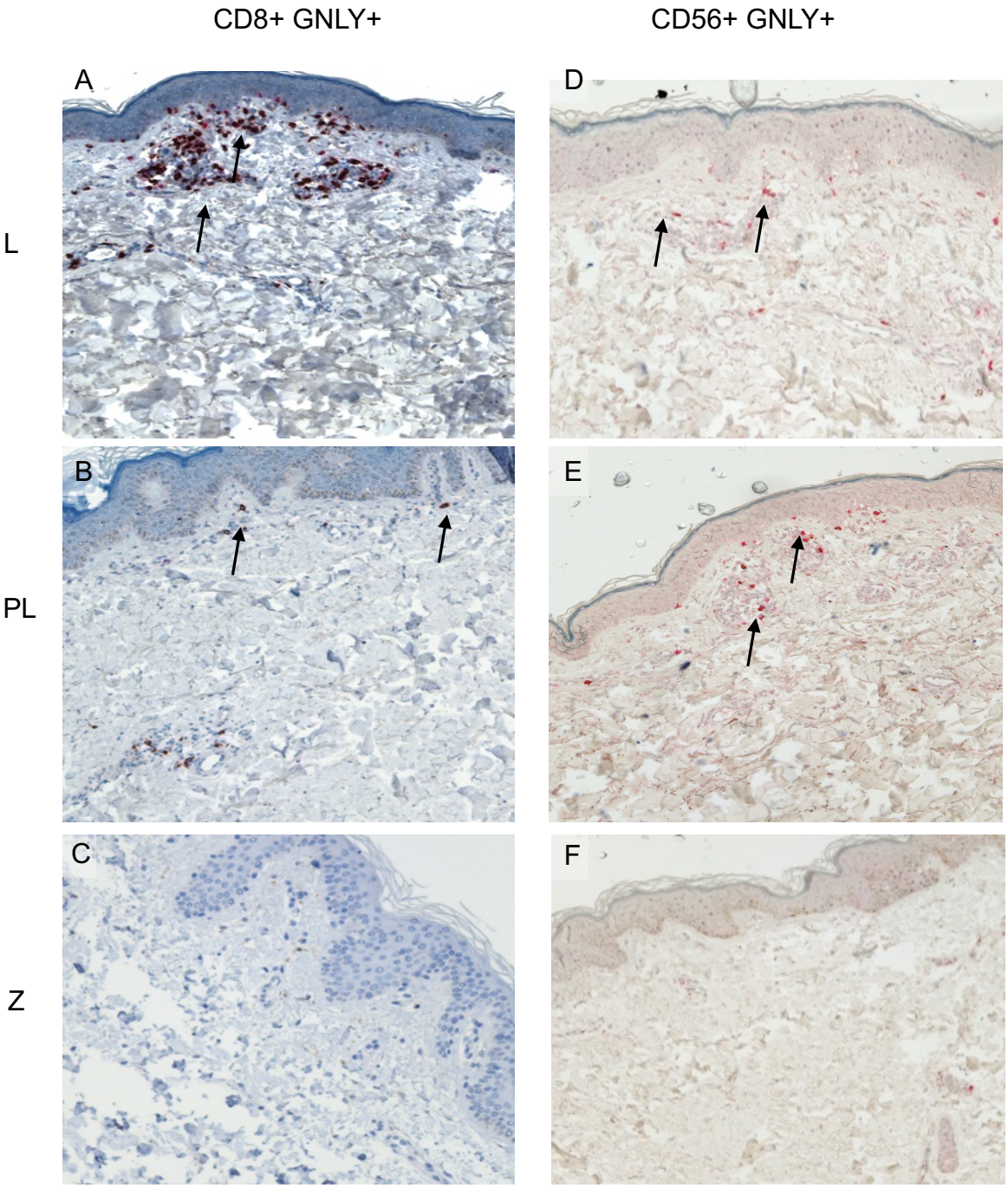
4.2.3. *Izražaj molekule granulizina u subpopulaciji citotoksičnih CD8+ limfocita T i CD56+ stanica NK u leziji i perilezijskoj koži pacijenata s vitiligom u odnosu na zdravu kožu kontrolne skupine*

Budući da je jednostrukom imunohistokemijom uočena povećana učestalost i karakteristična distribucija GNLY+ stanica u lezijama i perilezijskoj koži pacijenata s vitiligom u odnosu na zdravu kožu kontrolne skupine, detaljno je analizirano koje stanice upalnog infiltrata izražavaju GNLY. S obzirom da GNLY izražavaju upalne stanice s izraženim citotoksičnim učinkom, dvostrukom imunohistokemijom je utvrđen udio stanica koje, uz GNLY, dodatno izražavaju CD8 i CD56 biljeg.

Izražaj CD8+GNLY+ i CD56+GNLY+ stanica istražen je u epidermalnom i dermalnom odjeljku lezije i perilezijske kože pacijenata s vitiligom te u zdravoj koži kontrolne skupine (slika 10 i 11). Značajno veći broj CD8+GNLY+ stanica uočen je u lezijama kože pacijenata s vitiligom u usporedbi s uzorcima zdrave kože kontrolne skupine (Slika 10A). Dvostruko pozitivne CD8+GNLY+ stanice nađene su u značajno većem broju u dermalnom odjeljku lezija i to uglavnom u gornjim dijelovima dermisa, a manjim dijelom u bazalnom sloju epidermisa (slika 10A). Gotovo sve CD8+ stanice u lezijama pacijenata s vitiligom izražavale su biljeg GNLY+ (slika 10A).

Isti obrazac izražaja, ali u značajno manjoj mjeri, opažen je u perilezijskoj koži oboljelih od vitiliga (slika 10B). Značajno veće nakupljanje CD8+GNLY+ stanica uočeno je u perilezijskoj koži pacijenata s vitiligom u usporedbi sa zdravom kožom (slika 10B). Većina CD8+GNLY+ stanica smještena je u dermisu perilezijske kože u blizini melanocita (Slika 10B). Dvostruko pozitivnih CD8+GNLY+ stanica uopće nema u zdravoj koži (Slika 10C).

U uzorcima kože pacijenata s vitiligom, dvostruko pozitivne CD56+GNLY+ stanice uočene su u manjem broju u dermalnom infiltratu lezija, poglavito u srednjem dijelu papilarnog dermisa (slike 10D). Iako je broj CD56+GNLY+ stanica u lezijama vitiliga malen, ipak je nešto veći u usporedbi s perilezijskom kožom oboljelih (slika 10E) i zdravom kožom kontrolne skupine (slika 10F). U perilezijskoj koži pacijenata s vitiligom utvrđen je sličan obrazac izražaja s oskudnim infiltratom CD56+GNLY+ stanica koje su smještene u srednjem sloju dermisa (slika 10E). U zdravoj koži nisu uočene CD56+GNLY+ stanice (slika 10F).

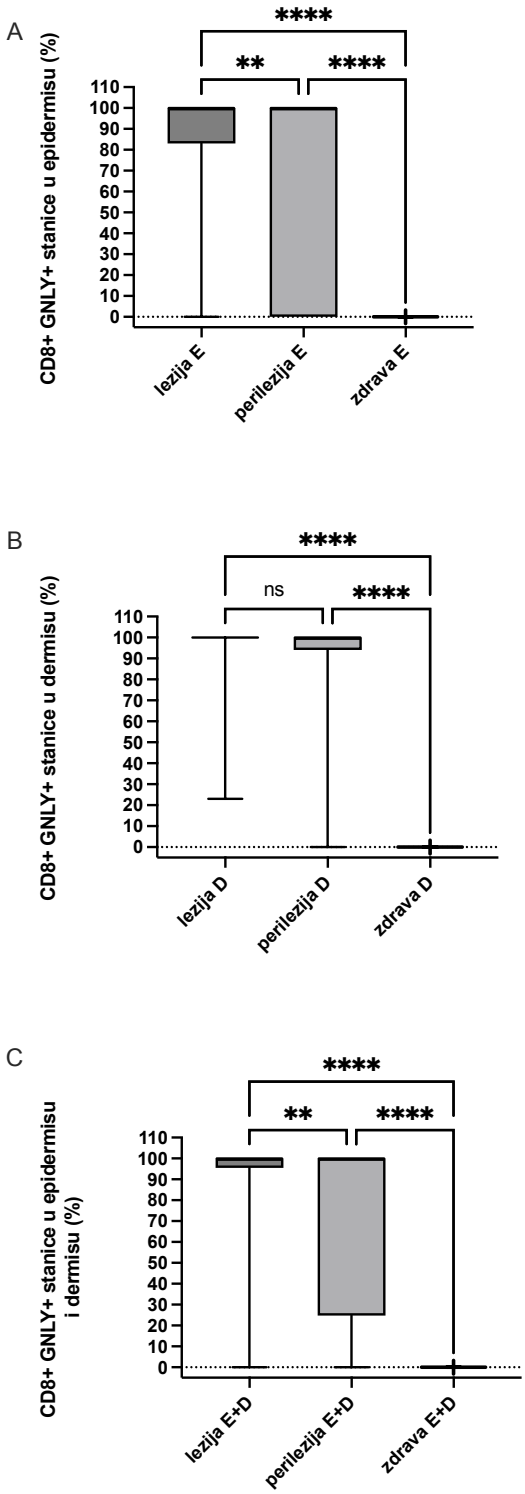


Slika 10. CD8+GNLY+ i CD56+GNLY+ stanice u: (A,D) leziji vitiliga, (B,E) perilezijskoj koži te (C,F) u zdravoj koži kontrolne skupine (povećanje 200x). CD8+GNLY+ i CD56+GNLY+ stanice su obilježene smeđom i crvenom bojom. CD8+GNLY+ i CD56+GNLY+ stanice su bile najbrojnije u leziji vitiliga (A,D), malobrojne u perilezijskoj koži (B,E), dok u zdravoj koži kontrolne skupine CD8+GNLY+ i CD56+GNLY+ stanice nisu nađene (C,F). L-lezija, PL-perilezija, Z-zdrava koža

Kvantitativnom analizom epidermalnog odjeljka utvrđen je statistički značajno veći udio CD8+GNLY+ stanica u epidermisu lezije u usporedbi s epidermisom perilezijske kože oboljelih od vitiliga ($p<0,01$) te u odnosu na epidermis zdrave kože kontrolne skupine ($p<0,0001$) (slika 11A). Učestalost CD8+GNLY+ stanica u epidermisu perilezijske kože bila je također statistički značajno viša u usporedbi s epidermisom zdrave kože kontrolnih ispitanika ($p<0,0001$) (slika 11A).

Dvostruko pozitivni citotoksični limfociti T, CD8+GNLY+ stanice, uočeni su u statistički značajno većem postotku u dermisu lezije pacijenata s vitiligom u odnosu na dermis zdrave kože kontrolne skupine ($p<0,0001$), dok razlika u odnosu na dermis perilezijske kože oboljelih nije bila statistički značajna (slika 11B). Međutim, usporedbom dermisa perilezijske kože oboljelih od vitiliga s dermisom zdrave kože kontrolnih ispitanika utvrđena je statistički značajno viša učestalost CD8+GNLY+ stanica u dermisu perilezijske kože ($p<0,0001$) (slika 11B).

Kvantitativnom analizom ukupnog izražaja dvostruko pozitivnih CD8+GNLY+ stanica u epidermisu i dermisu lezije te perilezijske kože pacijenata s vitiligom utvrđena je statistički značajno viša učestalost CD8+GNLY+ citotoksičnih limfocita T u lezijama u usporedbi s perilezijskom kožom oboljelih ($p<0,01$) te u odnosu na zdravu kožu kontrolne skupine ($p<0,0001$) (slika 11C). Učestalost CD8+GNLY+ stanica u epidermisu i dermisu perilezijske kože bila je također statistički značajno viša u usporedbi sa zdravom kožom kontrolnih ispitanika ($p<0,0001$) (slika 11C).

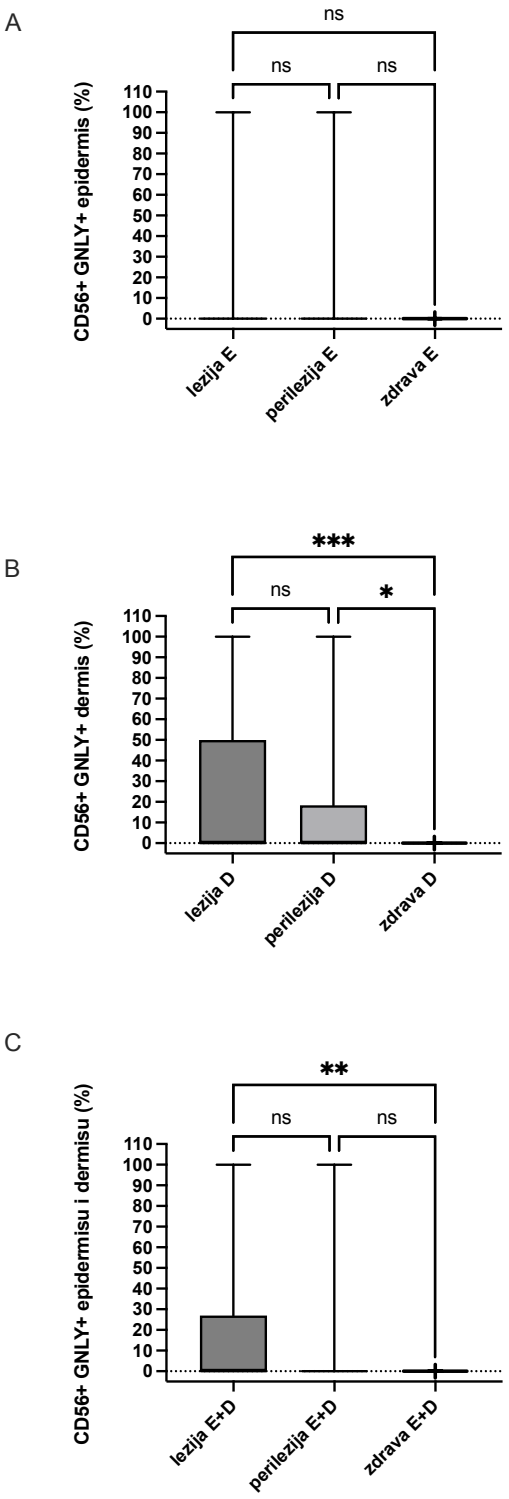


Slika 11. Udio CD8+GNLY+ stanica unutar subpopulacije citotoksičnih limfocita T (CD3+CD8+) u: (A) epidermisu lezija vitiliga, perilezijskoj koži i zdravoj koži; (B) dermisu lezija vitiliga, perilezijskoj koži i zdravoj koži; (C) epidermisu i dermisu lezija vitiliga, perilezijske i zdrave kože. *p<0,05; **p <0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001; ns – nije značajno

Kvantitativnom analizom učestalosti dvostruko pozitivnih citotoksičnih NK stanica, CD56+GNLY+ stanica, u epidermalnom odjeljku ispitivanih bioptata nije uočena statistički značajna razlika u udjelu CD56+GNLY+ stanica između lezija vitiliga, perilezijske kože oboljelih i zdrave kože kontrolnih ispitanika (slika 12A).

Kvantitativnim ispitivanjem izražaja dvostruko pozitivnih CD56+GNLY+ stanica u dermalnom odjeljku utvrđen je statistički značajno viši udio CD56+GNLY+ stanica u dermisu lezije pacijenata s vitiligom u odnosu na dermis zdrave kože kontrolne skupine ($p<0,001$). Iako je u dermisu lezije zabilježen veći broj ovih stanica u usporedbi s dermisom perilezijske kože oboljelih, ta razlika nije bila statistički značajna (slika 12B). Usporedbom dermisa perilezijske kože pacijenata s vitiligom s dermisom zdrave kože kontrolnih ispitanika također je utvrđen statistički značajno viši udio CD56+GNLY+ stanica u perilezijskoj koži ($p<0,05$) (slika 12B).

Analizom ukupnog udjela CD56+GNLY+ stanica u epidermisu i dermisu lezija vitiliga, perilezijske kože oboljelih te zdrave kože kontrolnih ispitanika uočen je statistički značajno viši udio CD56+GNLY+ stanica u lezijama u odnosu na zdravu kožu kontrolne skupine ($p<0,01$), dok razlika između lezija i perilezijske kože nije bila statistički značajna (slika 12C). Nije utvrđena statistički značajna razlika CD56+GNLY+ stanica u perilezijskoj koži u usporedbi sa zdravom kožom kontrolnih ispitanika (slika 12C).

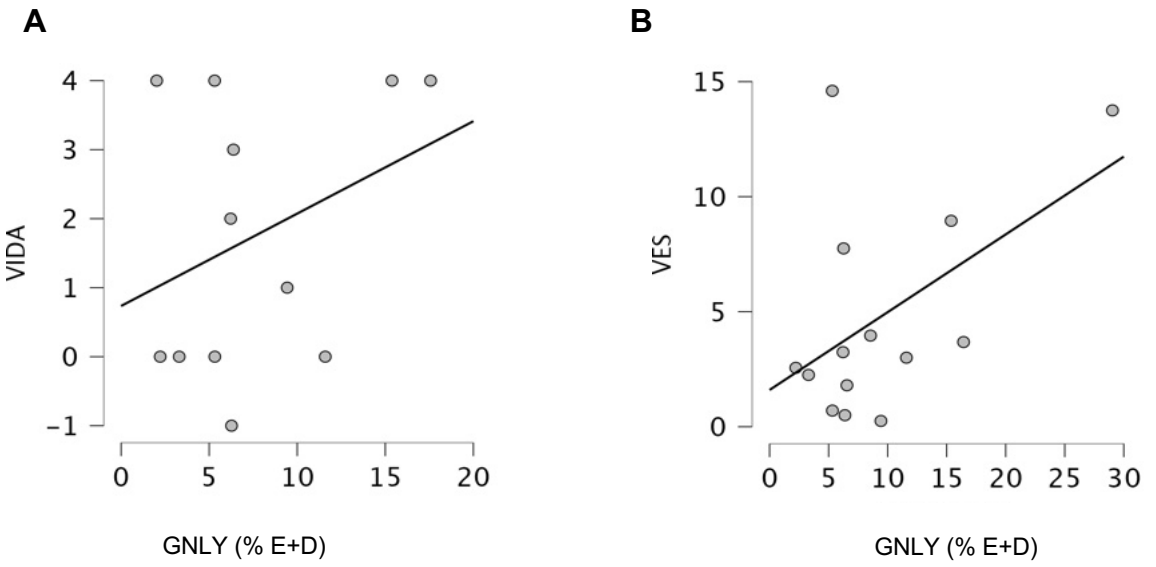


Slika 12. Udio CD56+GNLY+ stanica unutar subpopulacije citotoksičnih stanica NK (CD3-CD56+) u: (A) epidermisu lezija vitiliga, perilezijske kože i zdrave kože; (B) dermisu lezija vitiliga, perilezijske kože i zdrave kože; (C) epidermisu i dermisu lezija vitiliga, perilezijske i zdrave kože. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ns – nije značajno

4.2.4. *Korelacija izražaja GNLY+ stanica s kliničkim pokazateljima aktivnosti i proširenosti vitiliga*

Istraživanje povezanosti udjela GNLY+ stanica u lezijama pacijenata s vitiligom s kliničkim pokazateljima aktivnosti i proširenosti bolesti, VIDA i VES zbrojem, prikazano je na slici 13. Analiza korelacije VIDA zbroja s udjelom GNLY+ stanica u lezijama oboljelih od vitiliga, pokazala je slabo pozitivan koeficijent korelacije (ρ=0,174), bez statistički značajne povezanosti. Dakle, udio GNLY+ stanica u lezijama pacijenata s vitiligom nije povezan s aktivnošću bolesti procijenjenom VIDA zbrojem (slika 13A).

Ispitivanjem korelacije VES zbroja s udjelom GNLY+ stanica uočena je pozitivna korelacija s koeficijentom korelacije ρ=0,240, koji ukazuje na slabu povezanost ispitivanih varijabli, ali također bez statistički značajne povezanosti. Slijedom toga, udio GNLY+ stanica u lezijama pacijenata s vitiligom slabo je povezan s proširenošću bolesti procijenjenim VES zbrojem (slika 13B).



Slika 13. Korelacijski dijagrami povezanosti udjela GNLY+ stanica u lezijama vitiliga s aktivnošću bolesti, (A) VIDA zbrojem i proširenošću bolesti, (B) VES zbrojem. (A) ρ=0,174, ns; (B) ρ=0,240, ns. ns-nije značajno

4.2.5. *Izražaj molekule perforina u lezijama i perilezijskoj koži bolesnika s vitiligom u odnosu na zdravu kožu kontrolne skupine*

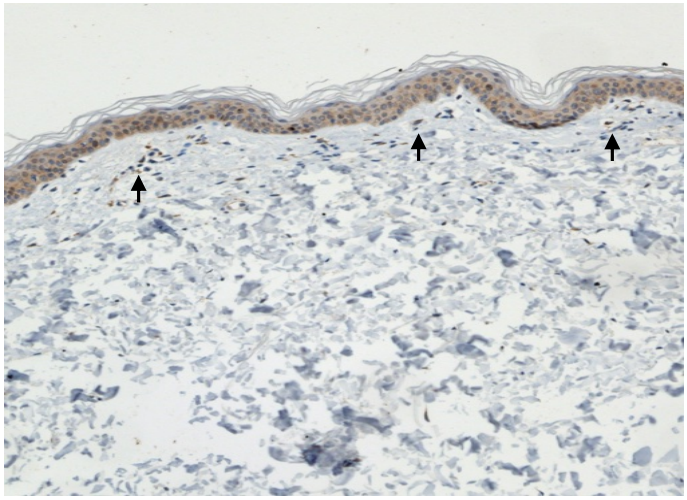
Izražaj molekule PRF-a u leziji i perilezijskoj koži pacijenata s vitiligom te u zdravoj koži ispitanika kontrolne skupine prikazan je na slikama 14 i 15. Imunohistokemijski izražaj navedene molekule analiziran je u epidermalnom i dermalnom odjeljku kože. PRF+ stanice uglavnom su uočene u dermalnom odjeljku lezije vitiliga, osobito u gornjim slojevima papilarnog dermisa, dok su u epidermisu bile prisutne rjeđe, pretežito u bazalnom i suprabazalnom sloju (slika 14A). Isti obrazac izražaja PRF+ stanica, ali u znatno manjoj mjeri, opažen je u perilezijskoj koži oboljelih, gdje PRF+ stanice također pretežno infiltriraju dermis, dok su u epidermisu prisutne u manjem broju (slika 14B). U kontrolnoj skupini ispitanika PRF+ stanice nisu uočene ni u epidermisu ni u dermisu (slika 14C).

Kvantitativnim istraživanjem izražaja PRF-a u epidermalnom odjeljku ispitivanih bioptata utvrđen je statistički značajno viši udio PRF+ stanica u epidermisu lezije u odnosu na epidermis perilezijske kože pacijenata s vitiligom ($p<0,01$), kao i u odnosu na epidermis zdrave kože kontrolne skupine ($p<0,01$) (slika 15A). Također je utvrđen statistički značajno viši udio PRF+ stanica u epidermisu perilezijske kože oboljelih u odnosu na epidermis zdrave kože kontrolne skupine ($p<0,0001$) (slika 15A). Analizom izražaja PRF-a u dermalnom odjeljku uočen je statistički značajno viši udio PRF+ stanica u dermisu lezije u odnosu na dermis perilezijske kože pacijenata s vitiligom ($p <0,001$), kao i u odnosu na dermis zdrave kože kontrolnih ispitanika ($p<0,0001$) (slika 15B). Također je utvrđen statistički značajno viši udio PRF+ stanica u dermisu perilezijske kože oboljelih u usporedbi s dermisom zdrave kože kontrolne skupine ($p < 0,001$) (slika 15B).

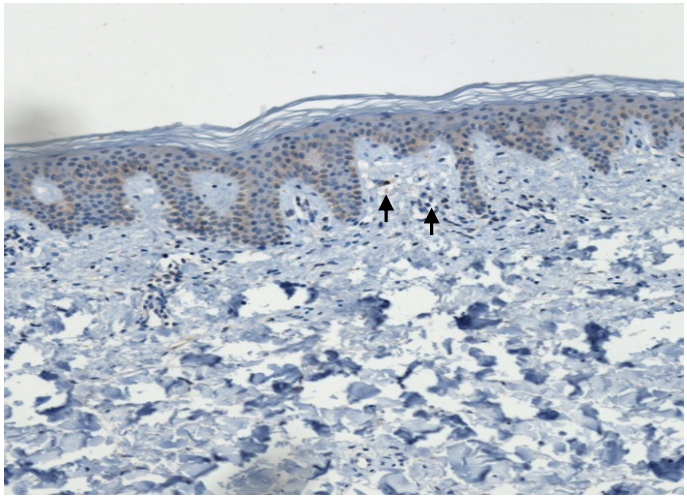
Kvantitativnom analizom ukupnog izražaja PRF-a u epidermisu i dermisu lezije i perilezijske kože pacijenata s vitiligom te zdrave kože kontrolne skupine utvrđen je statistički značajno viši postotak PRF+ stanica u lezijama u odnosu na perilezijsku kožu pacijenata s vitiligom ($p<0,0001$), kao i u odnosu na zdravu kožu kontrolne skupine ($p <0,0001$) (slika 15C). Također je uočen statistički značajno viši udio PRF+ stanica u perilezijskoj koži oboljelih u usporedbi sa zdravom kožom kontrolnih ispitanika ($p< 0,001$) (slika 15C).

PRF+

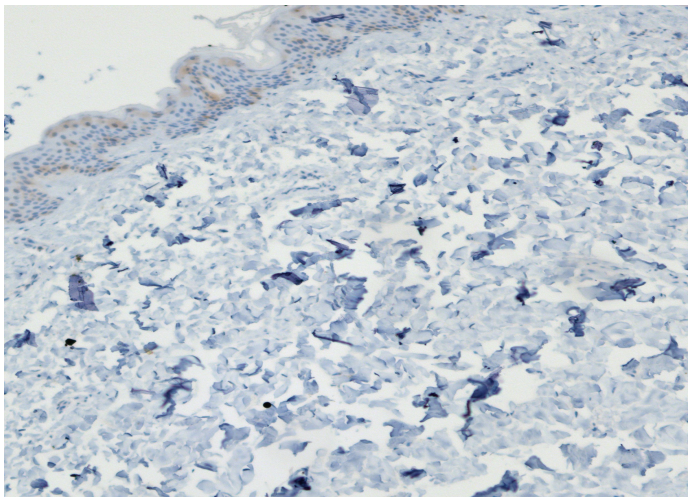
L



PL

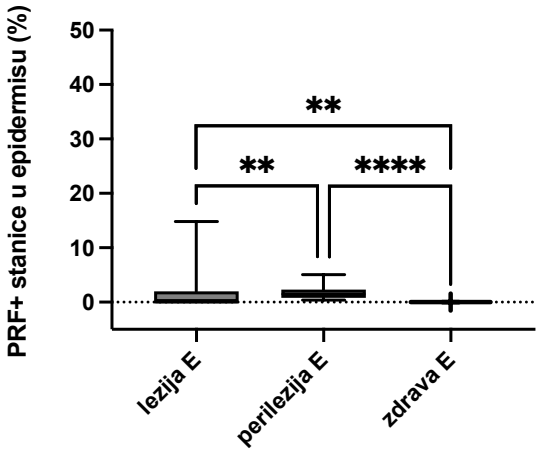


Z

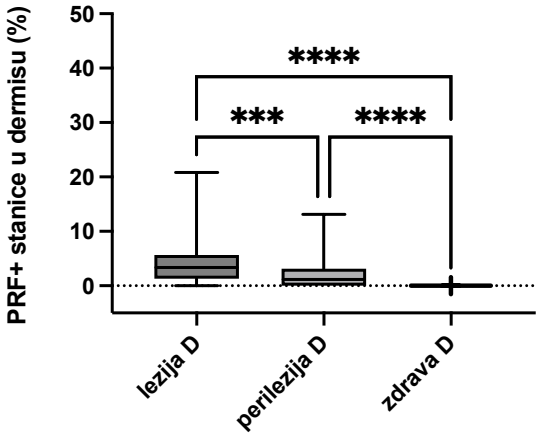


Slika 14. PRF+ stanice u: (A) leziji vitiliga, (B) perilezijskoj koži te u (C) zdravoj koži (povećanje 200x). PRF+ stanice su obilježene smeđom bojom. PRF+ stanice su bile najbrojnije u leziji vitiliga (A), malobrojne u perilezijskoj koži (B), dok u zdravoj koži kontrolne skupine PRF+ stanice nisu nađene (C). L-lezija, PL-perilezija, Z-zdrava koža

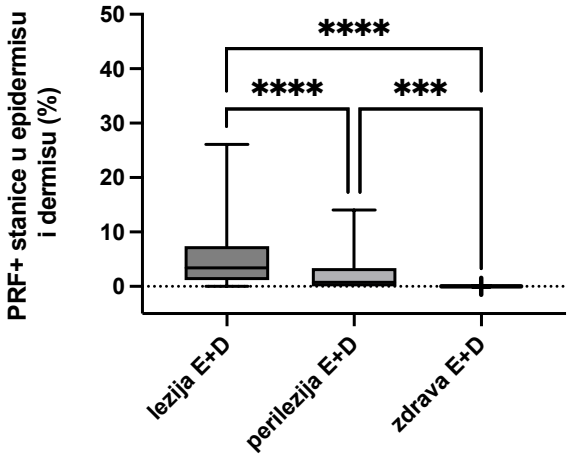
A



B



C



Slika 15. Postotak PRF+ stanica među stanicama: (A) epidermisa lezije i perilezijske kože vitiliga te zdrave kože; (B) dermisa lezije i perilezijske kože vitiliga te zdrave kože i (C) epidermisa i dermisa lezije i perilezije vitiliga te zdrave kože kontrolne skupine. **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001

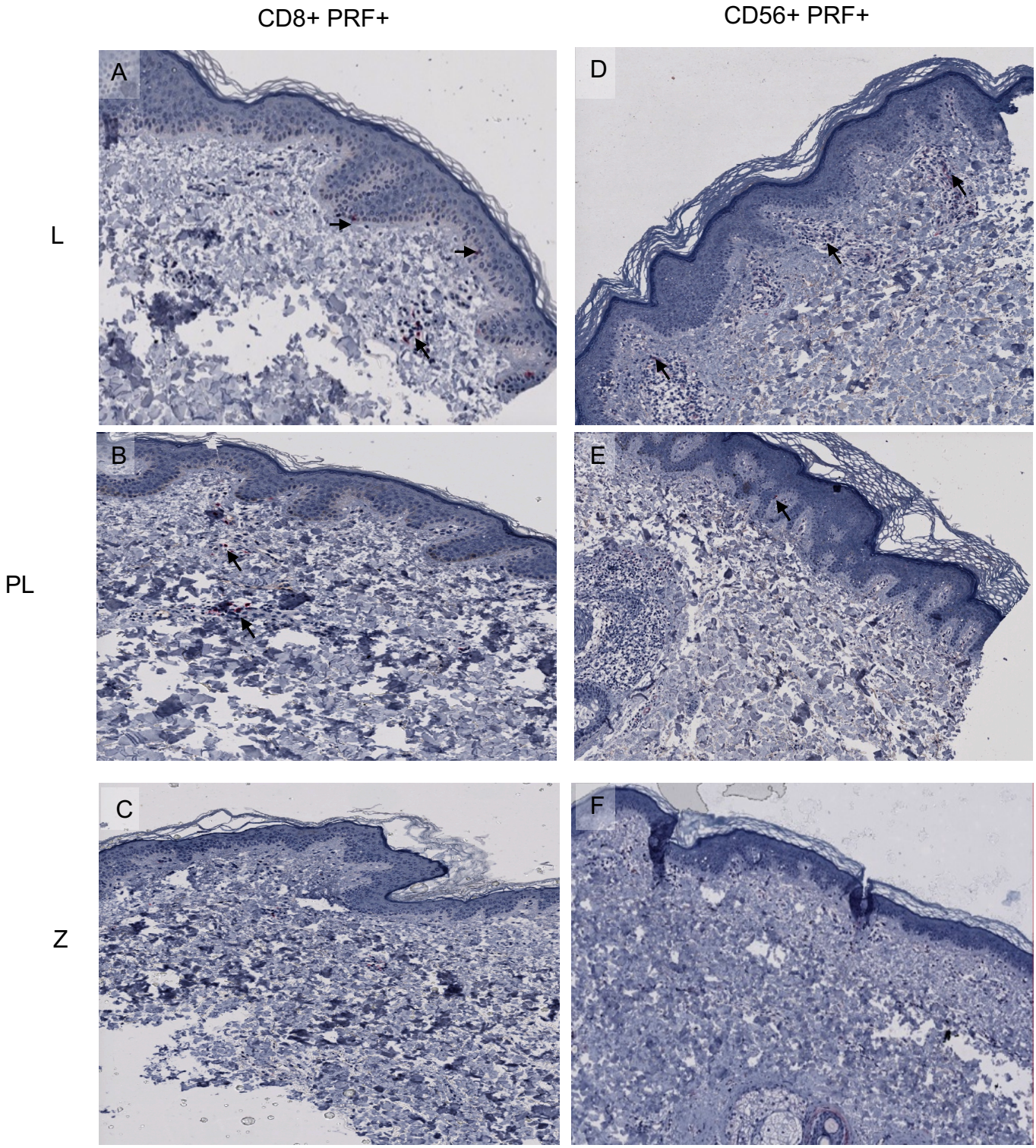
4.2.6. *Izražaj molekule perforina u subpopulaciji citotoksičnih CD8+ limfocita T i CD56+ stanica NK u leziji i perilezijskoj koži pacijenata s vitiligom u odnosu na zdravu kožu kontrolne skupine*

Jednostrukom je imunohistokemijom utvrđena povećana učestalost i karakteristična distribucija PRF+ stanica u lezijama kože pacijenata s vitiligom u odnosu na zdravu kožu kontrolne skupine, stoga je nadalje detaljno analizirano koje stanice upalnog infiltrata izražavaju perforin. Budući da PRF izražavaju upalne stanice s izraženim citotoksičnim učinkom, dvostrukom imunohistokemijom je utvrđen udio stanica koje, uz PRF, dodatno izražavaju CD8 i CD56 biljeg.

Izražaj CD8+PRF+ i CD56+PRF+ stanica istražen je u epidermalnom i dermalnom odjeljku lezije i perilezijske kože pacijenata s vitiligom te u zdravoj koži kontrolne skupine ispitanika (slika 16,17 i 18). Značajno veći broj CD8+PRF+ stanica uočen je u lezijama kože pacijenata s vitiligom u usporedbi s uzorcima zdrave kože kontrolne skupine (Slika 16A). Dvostruko pozitivne CD8+PRF+ stanice nađene su u značajno većem broju u dermalnom odjeljku lezija i to poglavito u gornjim dijelovima dermisa, a manjim dijelom u bazalnom sloju epidermisa (slika 16A). Gotovo sve CD8+ stanice u lezijama pacijenata s vitiligom izražavale su biljeg PRF+ (slika 16A).

Isti obrazac izražaja, ali u značajno manjoj mjeri, opažen je u perilezijskoj koži oboljelih od vitiliga (slika 16B). Značajno veće nakupljanje CD8+PRF+ stanica uočeno je u perilezijskoj koži pacijenata s vitiligom u usporedbi sa zdravom kožom (slika 16B). Većina CD8+PRF+ stanica smještena je u dermisu perilezijske kože u blizini melanocita (Slika 16B), dok ih u zdravoj koži uopće nema (Slika 16C).

U uzorcima kože pacijenata s vitiligom, dvostruko pozitivne CD56+PRF+ stanice uočene su u manjem broju u dermalnom infiltratu lezija, većinom u srednjem dijelu papilarnog dermisa, a manje u bazalnom sloju epidermisa (slike 16D). Iako je broj CD56+ NK-stanica koje izražavaju molekulu PRF u lezijama vitiliga malen, ipak je nešto veći u usporedbi s perilezijskom kožom oboljelih (slika 16E) i zdravom kožom kontrolne skupine (slika 16F). U perilezijskoj koži pacijenata s vitiligom utvrđen je sličan obrazac izražaja s vrlo oskudnim infiltratom CD56+PRF+ stanica koje su uglavnom smještene u srednjem sloju dermisa (slika 16E). U zdravoj koži CD56+PRF+ stanice nisu uočene (slika 16F).



Slika 16. CD8+PRF+ i CD56+PRF+ stanice u: (A,D) leziji vitiliga, (B,E) perilezijskoj koži te u (C,F) zdravoj koži kontrolne skupine (povećanje 200x). CD8+PRF+ i CD56+PRF+ stanice su obilježene smeđom i crvenom bojom. CD8+PRF+ i CD56+PRF+ stanice su bile najbrojnije u leziji vitiliga (A,D), malobrojne u perilezijskoj koži (B,E), dok u zdravoj koži kontrolne skupine CD8+PRF+ i CD56+PRF+ stanice nisu nađene (C,F). L-lezija, PL-perilezija, Z-zdrava koža

Kvantitativnom analizom epidermalnog odjeljka utvrđen je statistički značajno veći udio CD8+PRF+ stanica u epidermisu lezije u usporedbi s epidermisom zdrave kože kontrolne skupine ($p<0,0001$), ali ne i u usporedbi s epidermisom perilezijske kože oboljelih (slika 17A). Statistički značajno viši udio CD8+PRF+ stanica uočen je i u epidermisu perilezijske kože u odnosu na epidermis zdrave kože ($p<0,0001$) (slika 17A).

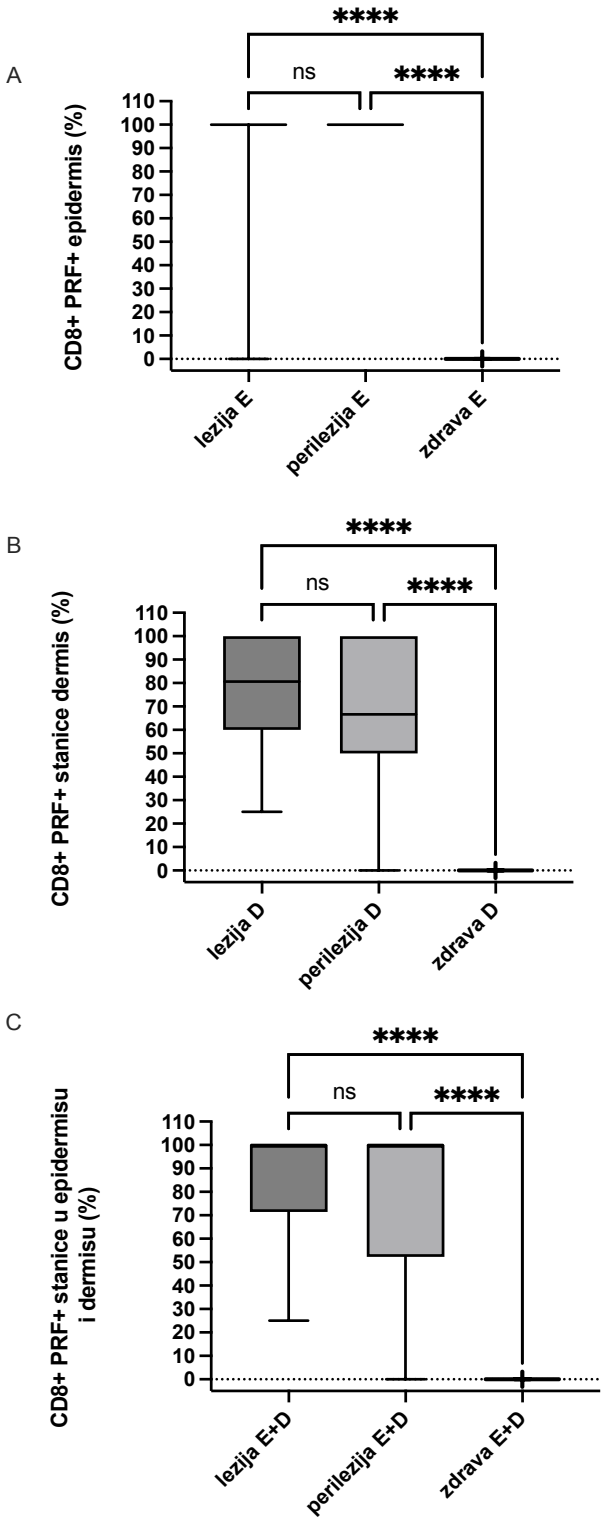
CD8+PRF+ stanice uočene su u statistički značajno većem postotku u dermisu lezije pacijenata s vitiligom u odnosu na dermis zdrave kože kontrolne skupine ($p<0,0001$), dok razlika u odnosu na dermis perilezijske kože oboljelih nije bila statistički značajna (slika 17B). Izražaj CD8+PRF+ stanica u dermisu perilezijske kože oboljelih bio je statistički značajno viši nego u dermisu zdrave kože kontrolne skupine ($p<0,0001$) (slika 17B).

Kvantitativnom analizom ukupnog izražaja dvostruko pozitivnih CD8+PRF+ stanica u epidermisu i dermisu utvrđena je statistički značajno viša učestalost CD8+PRF+ stanica u lezijama u odnosu na zdravu kožu kontrolne skupine ($p<0,0001$), dok razlika u odnosu na perilezijsku kožu oboljelih nije bila statistički značajna (slika 17C). Učestalost CD8+PRF+ stanica u epidermisu i dermisu perilezijske kože bila je također statistički značajno viša u usporedbi sa zdravom kožom kontrolnih ispitanika ($p< 0,0001$) (slika 17C).

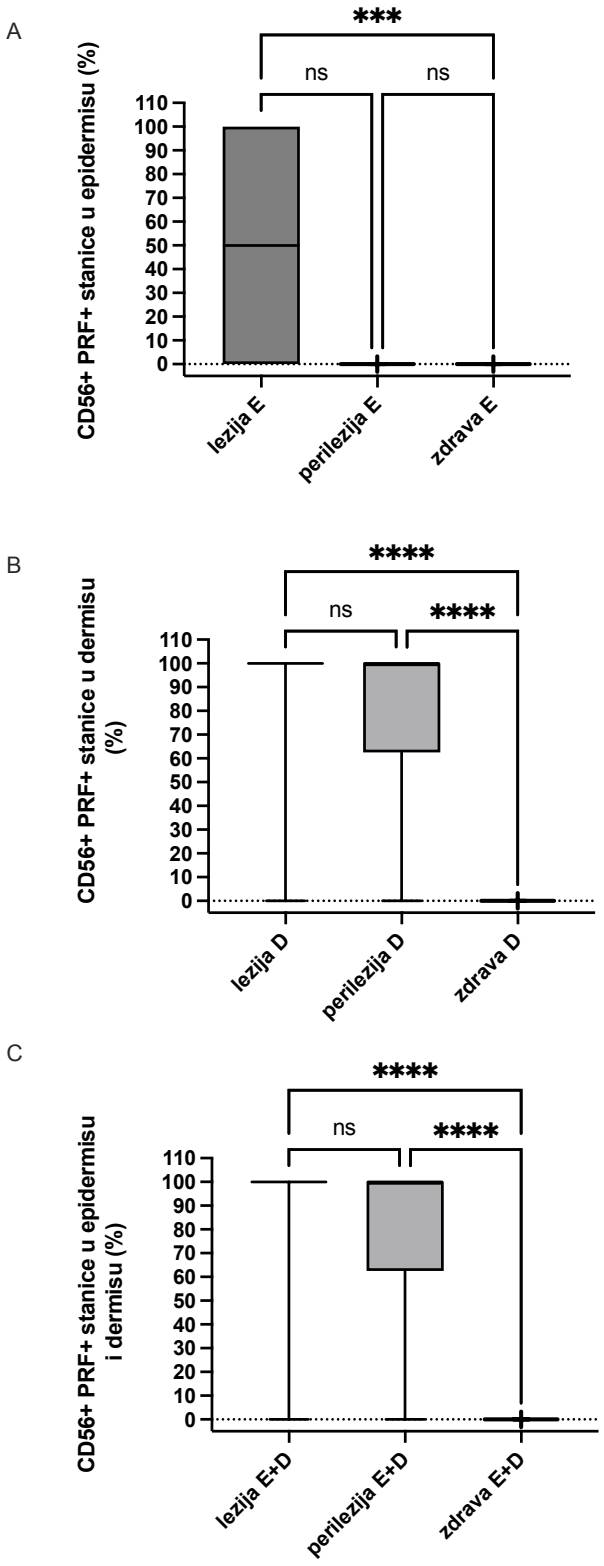
Kvantitativnom analizom učestalosti dvostruko pozitivnih CD56+PRF+ stanica u epidermalnom odjeljku utvrđen je statistički značajno veći udio CD56+PRF+ stanica u epidermisu lezije u usporedbi s epidermisom zdrave kože kontrolne skupine ($p< 0,001$), ali ne i u usporedbi s epidermisom perilezijske kože oboljelih od vitiliga (slika 18A).

Izražaj dvostruko pozitivnih CD56+PRF+ stanica u dermalnom odjeljku bio je statistički značajno viši u dermisu lezije pacijenata s vitiligom u odnosu na dermis zdrave kože kontrolne skupine ($p<0,0001$), dok razlika u odnosu na dermis perilezijske kože oboljelih nije bila statistički značajna (slika 18B). Usporedbom dermisa perilezijske kože oboljelih s dermisom zdrave kože kontrolnih ispitanika utvrđen je statistički značajno viši udio CD56+PRF+ stanica u perilezijskoj koži ($p<0,001$) (slika 18B).

Analizom ukupnog udjela CD56+PRF+ stanica u epidermisu i dermisu utvrđen je statistički značajno viši udio CD56+PRF+ stanica u lezijama u usporedbi sa zdravom kožom kontrolne skupine ($p<0,0001$), dok razlika u odnosu na perilezijsku kožu oboljelih nije bila statistički značajna (slika 18C). Također je utvrđen statistički značajno viši udio CD56+PRF+ stanica u perilezijskoj koži u usporedbi sa zdravom kožom kontrolnih ispitanika ($p<0,0001$) (slika 18C).



Slika 17. Udio CD8+PRF+ stanica unutar subpopulacije citotoksičnih limfocita T (CD3+CD8+) u: (A) epidermisu lezija vitiliga, perilezijskoj koži i zdravoj koži; (B) dermisu lezija vitiliga, perilezijskoj koži i zdravoj koži; (C) epidermisu i dermisu lezija vitiliga, perilezijske i zdrave kože. ****p<0,0001, ns-nije značajno

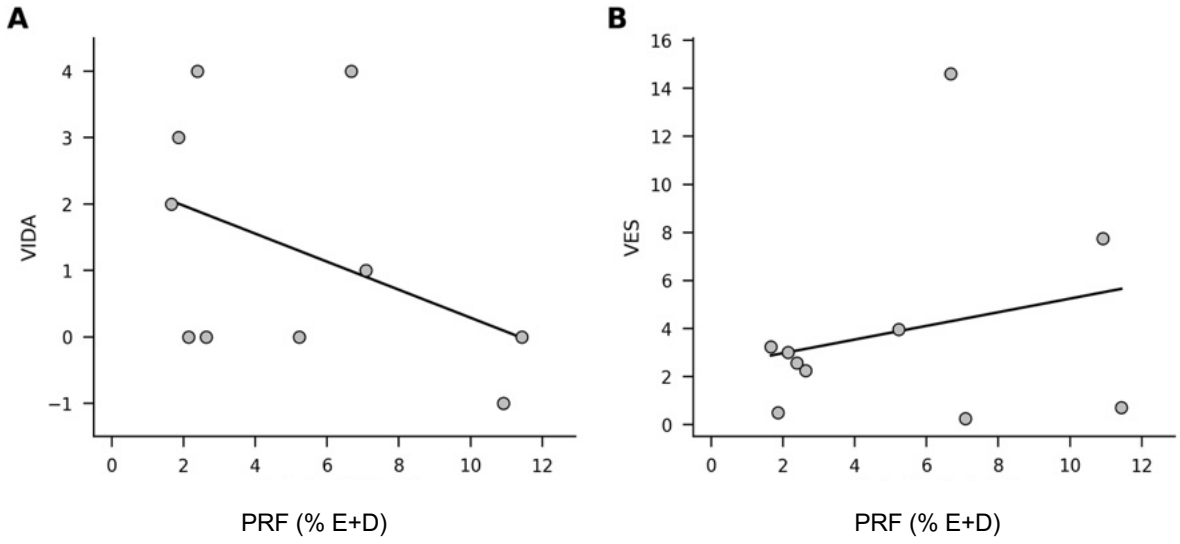


Slika 18. Udio CD56+PRF+ stanica unutar subpopulacije citotoksičnih stanica NK (CD3-CD56+) u: (A) epidermisu lezija vitiliga, perilezijske kože i zdrave kože; (B) dermisu lezija vitiliga, perilezijske kože i zdrave kože; (C) epidermisu i dermisu lezija vitiliga, perilezijske i zdrave kože. ***p<0,001 ****p<0,0001 , ns-nije značajno

4.2.7. *Korelacija izražaja PRF+ stanica u lezijama vitiliga s kliničkim pokazateljima aktivnosti i proširenosti vitiliga*

Istraživanje povezanosti udjela PRF+ stanica u lezijama pacijenata s vitiligom s kliničkim pokazateljima aktivnosti i proširenosti bolesti, VIDA i VES zbrojem, prikazano je na slici 19. Analiza korelacije VIDA zbroja s udjelom PRF+ stanica u lezijama oboljelih od vitiliga pokazala je negativan koeficijent korelacije (ρ=−0,43), no bez statističke značajnosti. U skladu s navedenim, udio PRF+ stanica u lezijama pacijenata s vitiligom nije značajno povezan s aktivnošću bolesti procijenjenom VIDA zbrojem (slika 19A).

Analizom korelacije VES zbroja s udjelom PRF+ stanica u lezijama uočena je slaba pozitivna povezanost, s koeficijentom korelacije ρ=0,24, koja također nije bila statistički značajna. Prema tome, udio PRF+ stanica u lezijama pacijenata s vitiligom nije značajno povezan s proširenošću bolesti procijenjenom VES zbrojem (slika 19B).



Slika 19. Korelacijski dijagrami povezanosti udjela PRF+ stanica u lezijama vitiliga s aktivnošću bolesti, (A) VIDA zbrojem i proširenošću bolesti, (B) VES zbrojem. (A) ρ = −0,43, ns; (B) ρ = 0,24, ns. ns – nije značajno.

4.2.8. *Izražaj molekule PRF-2 u lezijama i perilezijskoj koži bolesnika s vitiligom u odnosu na zdravu kožu kontrolne skupine*

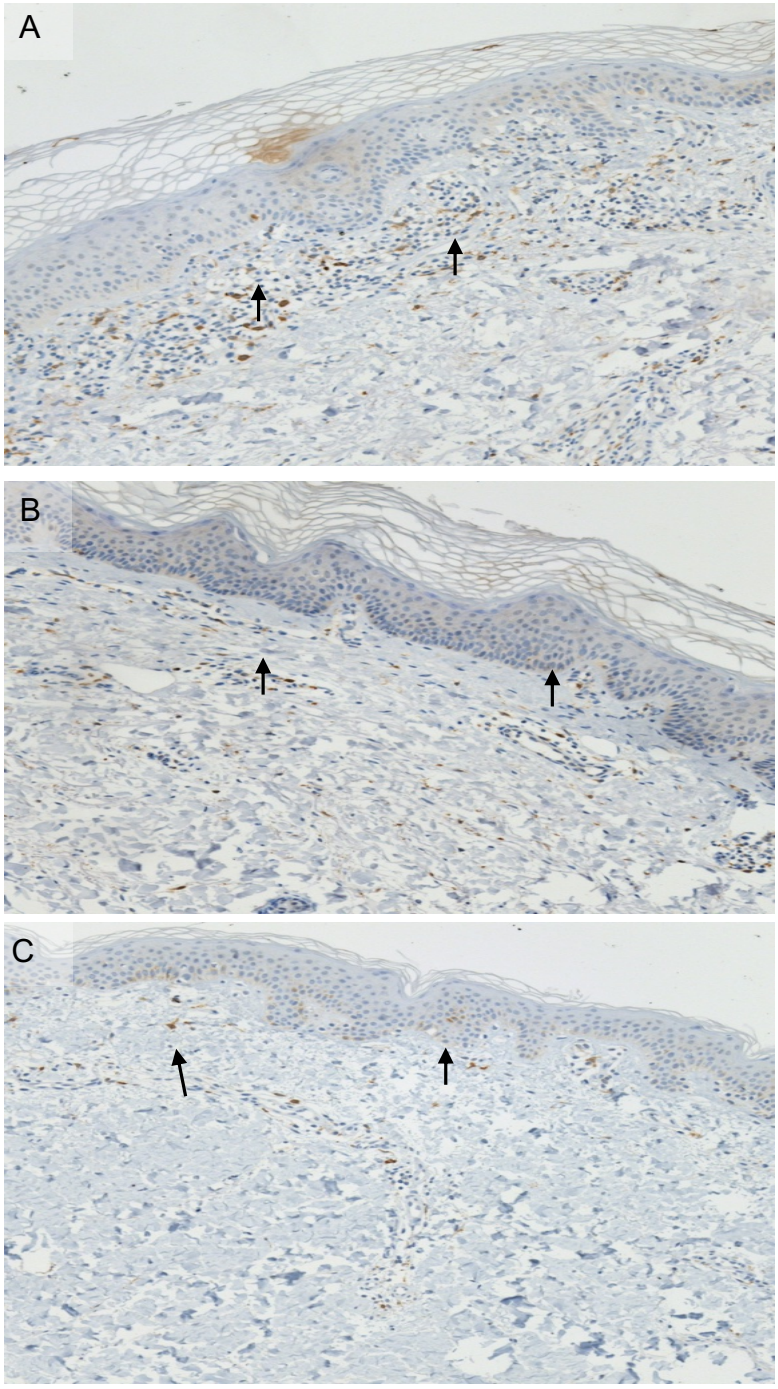
Kako bismo utvrdili postoje li značajne razlike izražaja molekule PRF-2 u istraživanim skupinama ispitanika, analizirali smo njegov izražaj u leziji i perilezijskoj koži oboljelih od vitiliga, uspoređujući ga s izražajem PRF-2 u zdravoj koži kontrolnih ispitanika (slika 20 i 21). PRF-2+ stanice su uočene u oba odjeljka kože lezije pacijenata s vitiligom (slika 20A). U epidermisu su PRF-2+ stanice bile rijetko raspoređene u bazalnom sloju, a glavnina PRF-2+ stanica uočena je u dermisu, poglavito u upalnim infiltratima papilarnog dermisa (slika 20A). Značajno veći broj PRF-2+ stanica nađen je u leziji oboljelih od vitiliga u odnosu na perilezijsku kožu i kožu zdravih ispitanika. PRF-2 je uočen i u epidermisu perilezijske kože pacijenata s vitiligom, s rijetkim stanicama smještenim u bazalnom sloju epidermisa, međutim u značajno manjem broju nego u leziji vitiliga (slika 20B). Većina PRF-2+ stanica u perilezijskoj koži oboljelih od vitiliga smještena je u papilarnom sloju dermisa (slika 20B). Slično je pokazala i analiza izražaja PRF-2 u zdravoj koži kontrolne skupine, u kojoj je u epidermisu uočeno tek nekoliko pozitivnih PRF-2+ stanica, dok je u dermisu nađen nešto veći broj PRF-2+ stanica u papilarnom dijelu dermalnog odjeljka (slika 20C).

Kvantitativnom analizom izražaja PRF-2+ stanica u epidermalnom odjeljku bioptata nije utvrđena statistički značajna razlika u udjelu PRF-2+ stanica između epidermisa lezije vitiliga, perilezijske kože i epidermisa zdrave kože kontrolne skupine (slika 21A).

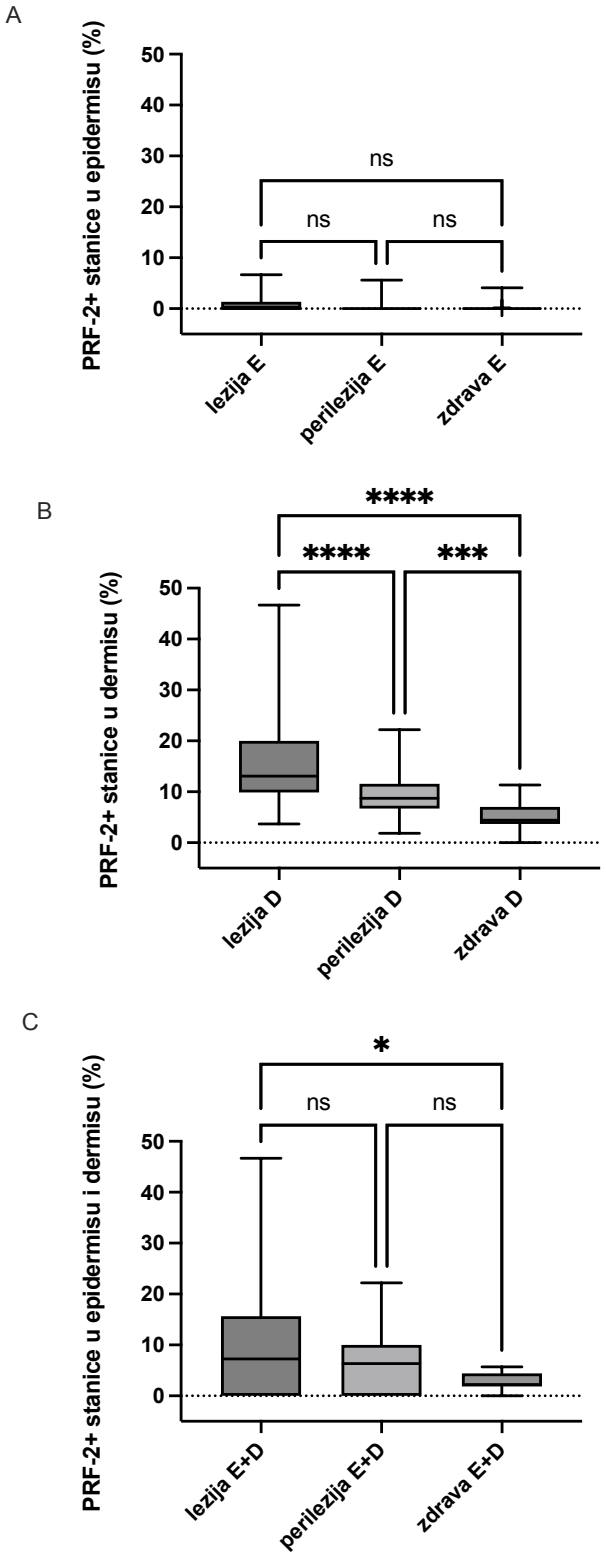
U dermalnom odjeljku lezija vitiliga utvrđen je statistički značajno veći udio PRF-2+ u usporedbi s dermisom perilezijske kože oboljelih, kao i u usporedbi s dermisom zdrave kože kontrolnih ispitanika ($p<0,0001$) (slika 21B). Također je zabilježen statistički značajno viši udio PRF-2+ stanica u dermisu perilezijske kože u odnosu na dermis zdrave kože ($p<0,001$) (slika 21B).

Kvantitativnom analizom ukupnog izražaja PRF-2+ stanica u epidermisu i dermisu utvrđen je statistički značajno veći udio PRF-2+ stanica u lezijama pacijenata s vitiligom, u odnosu na zdravu kožu kontrolne skupine ($p<0,05$), no ne i u odnosu na perilezijsku kožu oboljelih (slika 21C). Nije utvrđena statistički značajna razlika u ukupnom udjelu PRF-2+ stanica u perilezijskoj koži pacijenata s vitiligom u odnosu na zdravu kožu kontrolnih ispitanika (slika 21C).

PRF-2+



Slika 20. PRF-2+ stanice u: (A) leziji vitiliga, (B) perilezijskoj koži te u (C) zdravoj koži (povećanje 200x). PRF-2+ stanice su obilježene smeđom bojom. PRF-2+ stanice su bile najbrojnije u leziji vitiliga (A), malobrojne u perilezijskoj koži (B), kao i u zdravoj koži (C). L-lezija, PL-perilezija, Z-zdrava koža



Slika 21. Postotak PRF-2+ stanica među stanicama: (A) epidermisa lezije i perilezijske kože vitiliga te zdrave kože; (B) dermisa lezije i perilezijske kože vitiliga te zdrave kože i (C) epidermisa i dermisa lezije i perilezije vitiliga te zdrave kože kontrolne skupine. *p <0,05, ***p<0,001, ****p<0,0001; ns – nije značajno.

4.2.9. *Izražaj molekule PRF-2+ u subpopulaciji CD68+ makrofaga u leziji i perilezijskoj koži pacijenata s vitiligom u odnosu na zdravu kožu kontrolne skupine*

Jednostrukom imunohistokemijom opažena je povećana učestalost i karakteristična distribucija PRF-2+ stanica u lezijama kože pacijenata s vitiligom u odnosu na zdravu kožu kontrolne skupine, stoga je detaljno analizirano koje stanice upalnog infiltrata izražavaju PRF-2+. Budući da PRF-2+ izražavaju stanice monocitno-makrofagne linije upalnog infiltrata koje sudjeluju u pokretanju, održavanju, ali i regulaciji upale, dvostrukom je imunohistokemijom utvrđen udio stanica koje uz PRF-2+ dodatno izražavaju biljeg CD68.

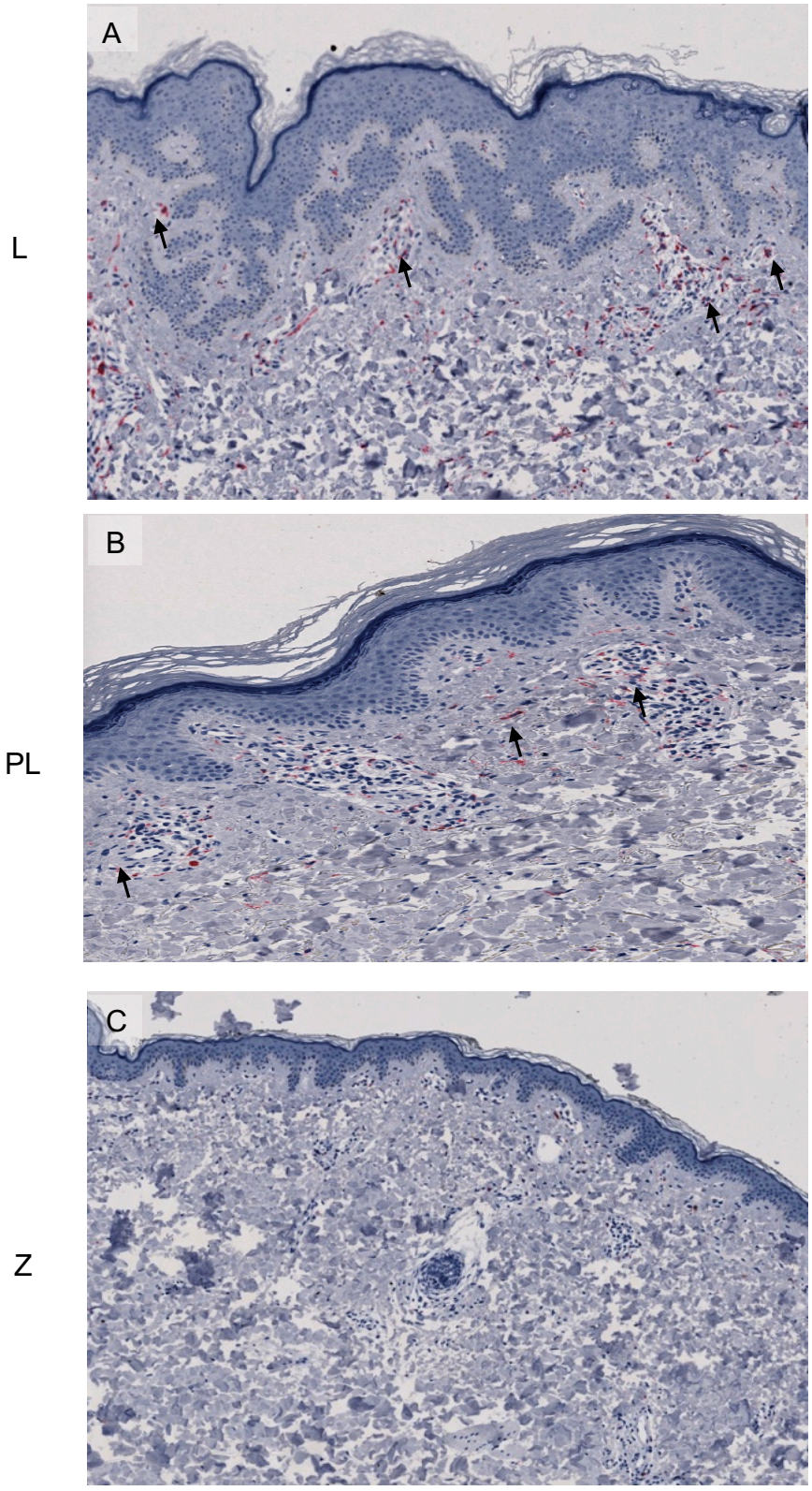
Izražaj CD68+PRF-2+ stanica istražen je u epidermalnom i dermalnom odjeljku lezije i perilezijske kože oboljelih te u zdravoj koži kontrolne skupine ispitanika (slika 22 i 23). Značajno veći broj CD68+PRF-2+ stanica uočen je u lezijama kože pacijenata s vitiligom u usporedbi s uzorcima zdrave kože (slika 22A). Dvostruko pozitivne CD68+PRF-2+ stanice nalazile su se pretežno u dermalnom odjeljku lezija, osobito u gornjim dijelovima dermisa, dok su u epidermisu bile zastupljene u manjoj mjeri (slika 22A). Većina CD68+ stanica u lezijama pacijenata s vitiligom izražavala je biljeg PRF-2+.

Isti obrazac izražaja, ali u značajno manjoj mjeri, opažen je u perilezijskoj koži oboljelih od vitiliga (slika 22B). Značajno veće nakupljanje CD68+PRF-2+ stanica uočeno je u perilezijskoj koži pacijenata s vitiligom u usporedbi sa zdravom kožom (slika 22B). CD68+PRF-2+ stanice bile su poglavito smještene u gornjem dijelu dermisa perilezijske kože, dok su u zdravoj koži bile gotovo odsutne (slika 22C).

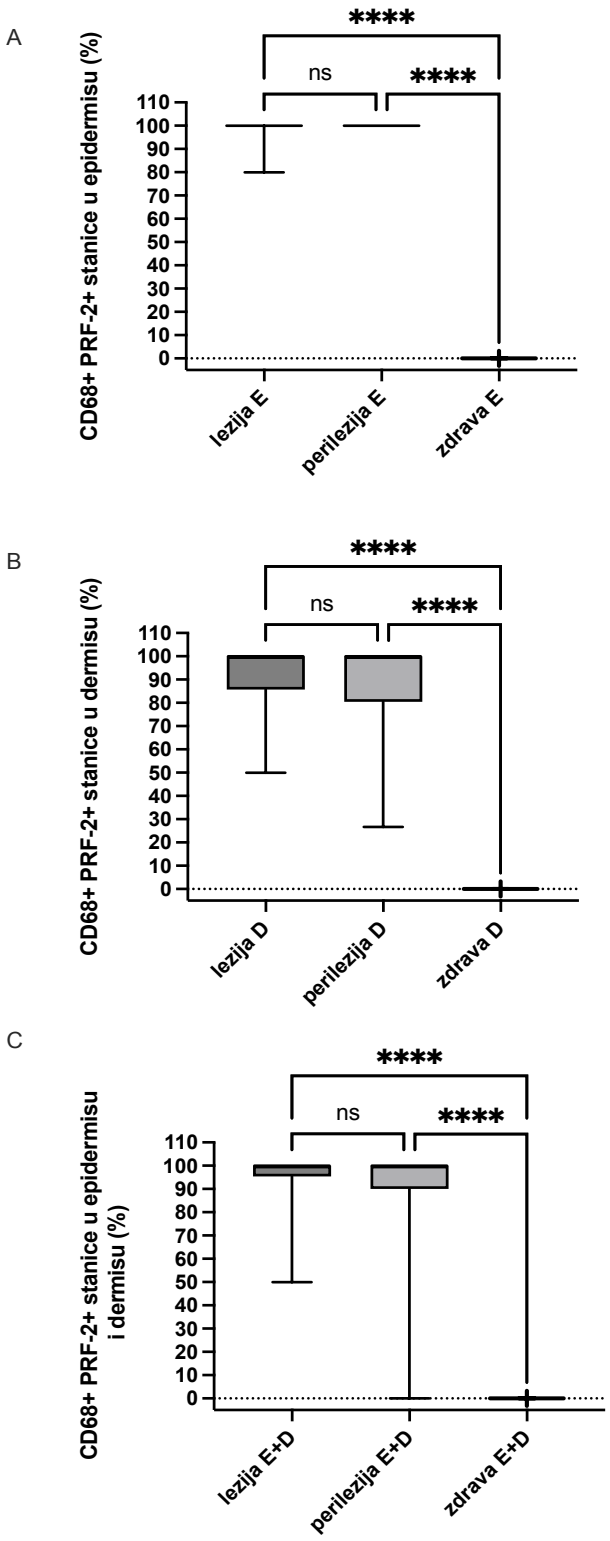
Kvantitativnom analizom epidermalnog odjeljka uočen je statistički značajno veći udio CD68+PRF-2+ stanica u leziji oboljelih nego u koži zdravih ispitanika kontrolne skupine ($p<0,0001$), ali ne i u odnosu na perilezijsku kožu pacijenata s vitiligom (slika 23A). Učestalost CD68+PRF-2+ stanica u epidermisu perilezijske kože bila je također statistički značajno veća u usporedbi sa zdravom kožom kontrolnih ispitanika ($p<0,0001$) (slika 23A). Dvostruko pozitivne CD68+PRF-2+ stanice nađene su u statistički značajno većem postotku u dermisu lezije pacijenata s vitiligom u odnosu na dermis zdrave kože kontrolne skupine ($p<0,0001$), ali ne i u usporedbi s dermisom

perilezijske kože oboljelih (slika 23B). Usporedbom izražaja CD68+PRF-2+ stanica u dermisu perilezijske kože oboljelih od vitiliga u odnosu na dermis zdrave kože također je uočena statistički značajno viša učestalost CD68+PRF-2+ stanica ($p<0,0001$) (slika 23B).

Kvantitativnom analizom ukupnog izražaja dvostruko pozitivnih CD68+PRF-2+ stanica u epidermisu i dermisu lezije te perilezijske kože pacijenata s vitiligom uočena je značajno viša učestalost CD68+PRF-2+ stanica u leziji pacijenata s vitiligom u odnosu na zdravu kožu kontrolne skupine ($p<0,0001$), ali ne i u odnosu na perilezijsku kožu oboljelih (slika 23C). Učestalost CD68+PRF-2+ stanica u oba odjeljka perilezijske kože bila je također statistički značajno veća u usporedbi sa zdravom kožom kontrolnih ispitanika ($p<0,0001$) (slika 23C).



Slika 22. CD68+PRF-2+ stanice u: (A) leziji vitiliga, (B) perilezijskoj koži te (C) u zdravoj koži kontrolne skupine (povećanje 200x). CD68+PRF-2+ stanice su obilježene smeđom i crvenom bojom. CD68+PRF-2+ stanice su bile najbrojnije u leziji vitiliga (A), malobrojne u perilezijskoj koži (B), te malobrojne u zdravoj koži kontrolne skupine (C). L-lezija, PL-perilezija, Z-zdrava koža

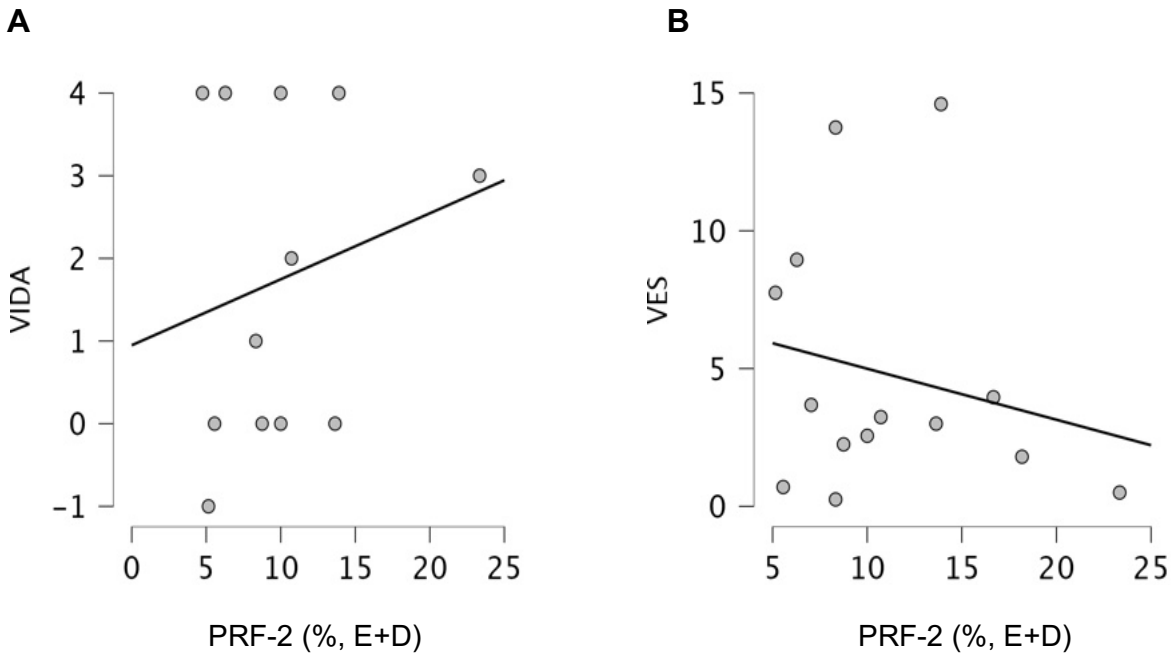


Slika 23. Udio CD68+PRF-2+ stanica unutar subpopulacije makrofaga (CD68+) u: (A) epidermisu lezija vitiliga, perilezijske kože i zdrave kože; (B) dermisu lezija vitiliga, perilezijske kože i zdrave kože; (C) epidermisu i dermisu lezija vitiliga, perilezijske i zdrave kože. ****p<0,0001, ns-nije značajno

4.2.10. *Korelacija izražaja PRF-2+ stanica s kliničkim pokazateljima težine bolesti*

Istraživanje povezanosti udjela PRF-2+ stanica u lezijama pacijenata s vitiligom s kliničkim pokazateljima aktivnosti i proširenosti bolesti, VIDA i VES zbrojem, prikazano je na slici 24. Analiza korelacije VIDA zbroja s udjelom PRF-2+ stanica u lezijama oboljelih od vitiliga pokazala je slabu pozitivnu korelaciju (ρ=0,171), bez statističke značajnosti. Prema tome, udio PRF-2+ stanica u lezijama pacijenata s vitiligom nije značajno povezan s aktivnošću bolesti procijenjenom VIDA zbrojem (slika 24A).

Analizom korelacije VES zbroja s udjelom PRF-2+ stanica uočena je slaba negativna korelacija (ρ=−0,187), koja također nije bila statistički značajna. Slijedom navedenog, udio PRF-2+ stanica u lezijama pacijenata s vitiligom nije značajno povezan s proširenošću bolesti procijenjenom VES zbrojem (slika 24B).



Slika 24. Korelacijski dijagrami povezanosti udjela PRF-2+ stanica u lezijama vitiliga s aktivnošću bolesti, (A) VIDA zbrojem i proširenošću bolesti, (B) VES zbrojem. (A) ρ= =0,171, ns; (B) ρ =-0,187, ns. ns-nije značajno

4.3. Izražaj citotoksičnih molekula granulizina, perforina i perforina-2 u leziji i perilezijskoj koži pacijenata s halo nevusom

S obzirom na to da su mehanizmi stanične citotoksičnosti posredovane molekulama granulizinom, perforinom i perforinom-2 u halo nevusu još uvijek nedovoljno istraženi, u ovom smo istraživanju krenuli od pretpostavke da navedene molekule imaju važnu ulogu u imunopatogenezi halo nevusa. S ciljem razjašnjavanja njihova doprinosa lokalnoj i perilezijskoj upalnoj kaskadi, istražili smo izražaj GNLY-a, PRF-a i PRF-2 u lezijama halo nevusa te u perilezijskoj koži oboljelih.

Kako bismo utvrdili postoje li razlike u lokalnom izražaju navedenih citotoksičnih molekula, analizirali smo njihov izražaj u tkivu lezija halo nevusa te u klinički nepromijenjenoj perilezijskoj koži, a dobivene rezultate usporedili smo s izražajem GNLY-a, PRF-a i PRF-2 u zdravoj koži ispitanika kontrolne skupine. Na taj smo način nastojali razjasniti sudjeluju li ove molekule u lokalnom citotoksičnom oštećenju nevomelanocita te imaju li perilezijska područja halo nevusa obilježja rane ili subkliničke imunološke aktivnosti koja prethodi razvoju karakterističnog depigmentiranog haloa.

Kako bismo precizno utvrdili koje stanice upalnog infiltrata izražavaju citotoksične molekule od interesa, proveli smo analizu njihova izražaja unutar određenih subpopulacija imunoloških stanica primjenom metode dvostruke imunohistokemije. Stoga smo ispitali izražaj GNLY-a i PRF-a u citotoksičnim CD8+ limfocitima T te CD56+ stanicama NK, dok je izražaj PRF-2 ispitan u CD68+ stanicama monocitno-makrofagne linije.

4.3.1. *Izražaj molekule granulizina u leziji i perilezijskoj koži bolesnika s halo nevusom u odnosu na zdravu kožu kontrolne skupine*

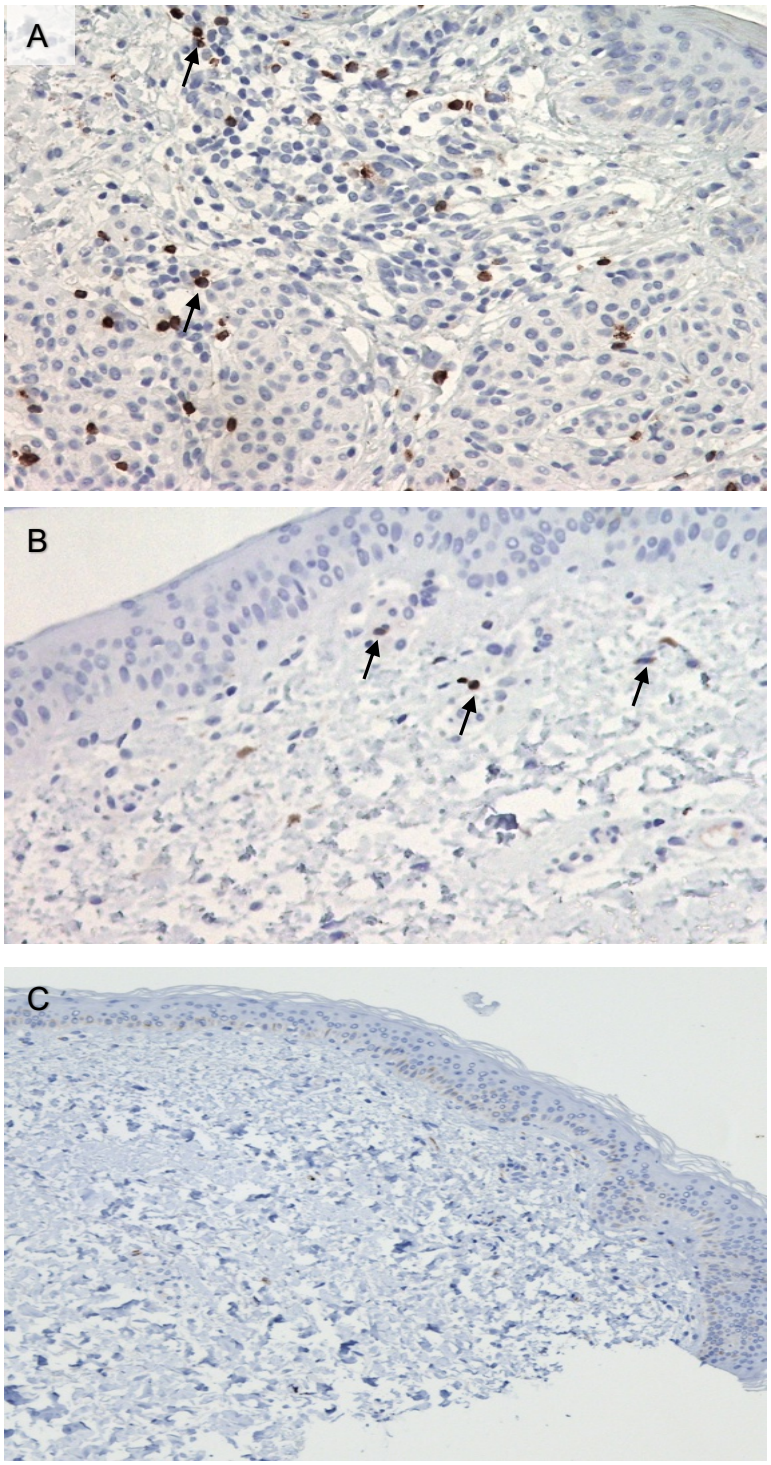
Izražaj GNLY u leziji i perilezijskoj koži pacijenata s halo nevusom te u zdravoj koži ispitanika kontrolne skupine prikazan je na slici 25 i 26. Imunohistokemijski izražaj GNLY-a analiziran je u oba odjeljka lezije i perilezijske kože halo nevusa te zdrave kože kontrolne skupine. GNLY+ stanice uočene su u epidermalnom i dermalnom odjeljku lezije halo nevusa, poglavito u gornjim slojevima papilarnog dermisa, a manje u bazalnom sloju epidermisa (slika 25A). Isti obrazac izražaja, ali u značajno manjoj

mjeri, opažen je u perilezijskoj koži pacijenata s halo nevusom gdje su GNLY+ stanice u podjednakom broju prisutne u dermisu te u bazalnom sloju epidermisa (slika 25B). U kontrolnoj skupini ispitanika GNLY+ nisu uočene, ni u dermisu niti u epidermisu (slika 25C).

Kvantitativnom analizom izražaja GNLY u epidermalnom odjeljku bioptata utvrđen je značajno viši udio GNLY+ stanica u epidermisu lezije u odnosu na epidermis perilezijske ($p<0,001$) kao i u odnosu na epidermis zdrave kože kontrolne skupine ($p<0,0001$) (slika 26A). Udio GNLY+ stanica također je bio značajno viši u epidermisu perilezijske u odnosu na epidermis zdrave kože ($p<0,01$) (slika 26A). Ispitivanjem izražaja GNLY u dermalnom odjeljku uočen je statistički značajno viši udio GNLY+ stanica u dermisu lezije u odnosu na dermis perilezijske kože ($p<0,0001$) te u odnosu na dermis zdrave kože kontrolne skupine ($p<0,0001$) (slika 26B). Statistički značajno veći izražaj GNLY+ stanica uotvrđen je u dermisu perilezijske kože u odnosu na dermis zdrave kože kontrolne skupine ($p<0,01$) (slika 26B).

Kvantitativnom analizom ukupnog izražaja GNLY u epidermalnom i dermalnom odjeljku lezije i perilezijske kože pacijenata s halo nevusom te zdrave kože kontrolne skupine, utvrđen je statistički značajno viši postotak GNLY+ stanica u lezijama u odnosu na perilezijsku ($p<0,0001$) te zdravu kožu kontrolne skupine ($p<0,0001$) (slika 26C). Statistički značajno viši udio GNLY+ stanica također je uočen u perilezijskoj koži halo nevusa u odnosu na zdravu kožu kontrolne skupine ($p<0,01$) (slika 26C).

GNLY+

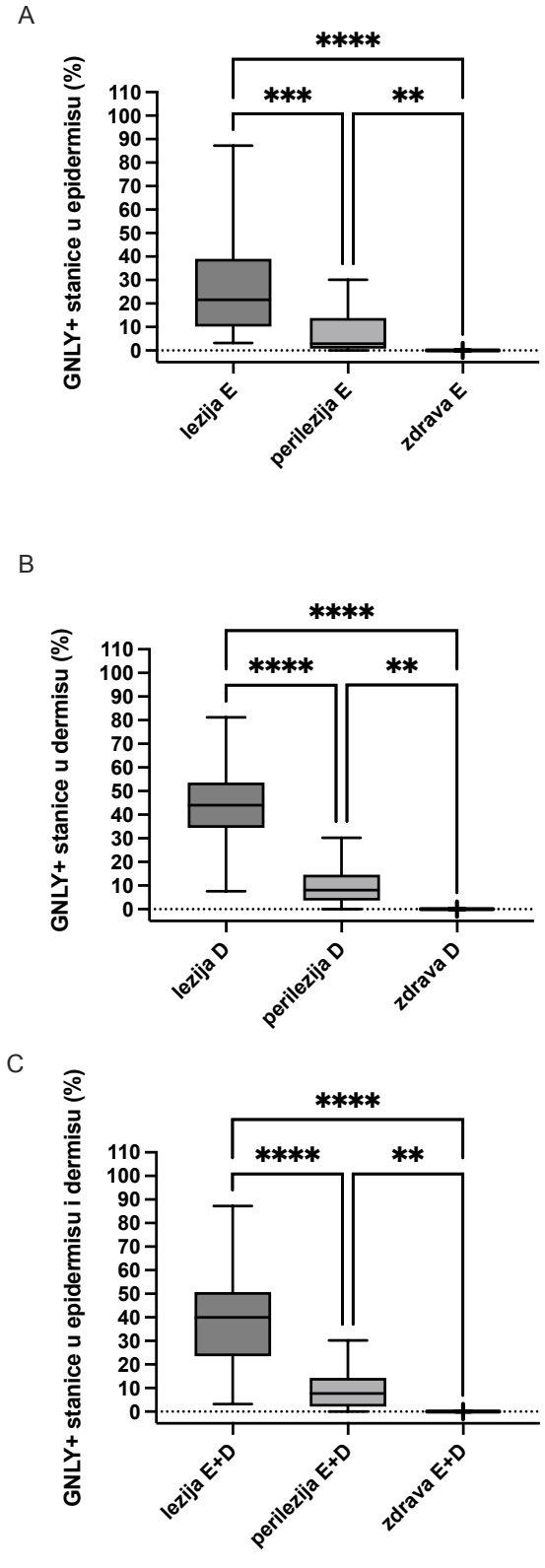


L

PL

Z

Slika 25. GNLY+ stanice u: (A) leziji halo nevusa, (B) perilezijskoj koži halo nevusa i (C) zdravoj koži kontrolne skupine (povećanje 200x). GNLY+ stanice su obilježene su smeđom bojom. GNLY+ stanice su najbrojnije u lezijama halo nevusa koži (A), u odnosu na perilezijsku kožu (B) te zdravu kožu (C). L-lezija, PL-perilezija, Z-zdrava koža



Slika 26. Postotak GNLY+ stanica među stanicama: (A) epidermisa lezije, perilezije halo nevusa i zdrave kože (B) dermisa lezije, perilezije halo nevusa i zdrave kože te (C) epidermisa i dermisa lezije, perilezije halo nevusa te zdrave kože. **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001

4.3.2. *Izražaj CD8+ i CD56+ stanica u leziji i perilezijskoj koži pacijenata s halo nevusom u odnosu na zdravu kožu kontrolne skupine*

Izražaj CD8+ limfocita T i CD56+ stanica NK analiziran je u epidermisu i dermisu lezije i perilezijske kože halo nevusa te u zdravoj koži ispitanika kontrolne skupine (slika 27 i 28). Izrazit upalni infiltrat CD8+ limfocita T u dermisu lezija halo nevusa okružuje gnijezda nevus stanica, a CD8+ stanice T smještene su u manjem broju i u blizini nevus stanica bazalnog sloja epidermisa (slika 27A). U lezijama halo nevusa zapažen je značajno veći broj CD8+ stanica u odnosu na perilezijsku kožu halo nevusa i zdravu kožu kontrolnih ispitanika (slika 27A). U perilezijskoj koži halo nevusa CD8+ stanice su nađene u epidermisu i dermisu, no u mnogo manjem broju nego u koži lezije (slika 27B). U epidermisu i dermisu zdrave kože kontrolne skupine nisu uočene CD8+ stanice (slika 27C).

Rjeđi upalni infiltrat CD56+ stanica NK uočen je u lezijama halo nevusa, no broj CD56+ stanica ipak je bio značajno veći u lezijama nego u perilezijskoj koži i koži zdravih ispitanika (Slika 27D). CD56+ stanice uglavnom su opažene u srednjim dijelovima papilarnog dermisa te manje u epidermisu lezija (slika 27D). U perilezijskoj koži pacijenata s halo nevusom uočen je manji broj CD56+ stanica NK rijetko raspoređenih poglavito u dermalnom odjeljku perilezijske kože, a manje u epidermisu perilezijske kože (slika 27E). U zdravoj koži nisu nađene CD56+ stanice NK (slika 27F).

Kvantitativnom analizom izražaja CD8+ limfocita T u epidermalnom odjeljku zapažen je značajno viši udio CD8+ stanica u epidermisu lezije u odnosu na epidermis perilezijske kože ($p<0,01$) te epidermis zdrave kože ($p<0,0001$) (slika 28A). Također je uočen značajno veći udio CD8+ stanica u epidermisu perilezijske kože u odnosu na epidermis zdrave kože ($p<0,001$) (slika 28A). U dermalnom odjeljku lezija halo nevusa zamijećen je statistički značajno viši udio CD8+ stanica u odnosu na dermis perilezijske kože pacijenata ($p<0,0001$) te dermis zdrave kože kontrolne skupine ($p< 0,0001$). Također je uočena povećana učestalost CD8+ stanica u perilezijskoj koži halo nevusa u usporedbi sa zdravom kožom ($p<0.01$) (slika 28B).

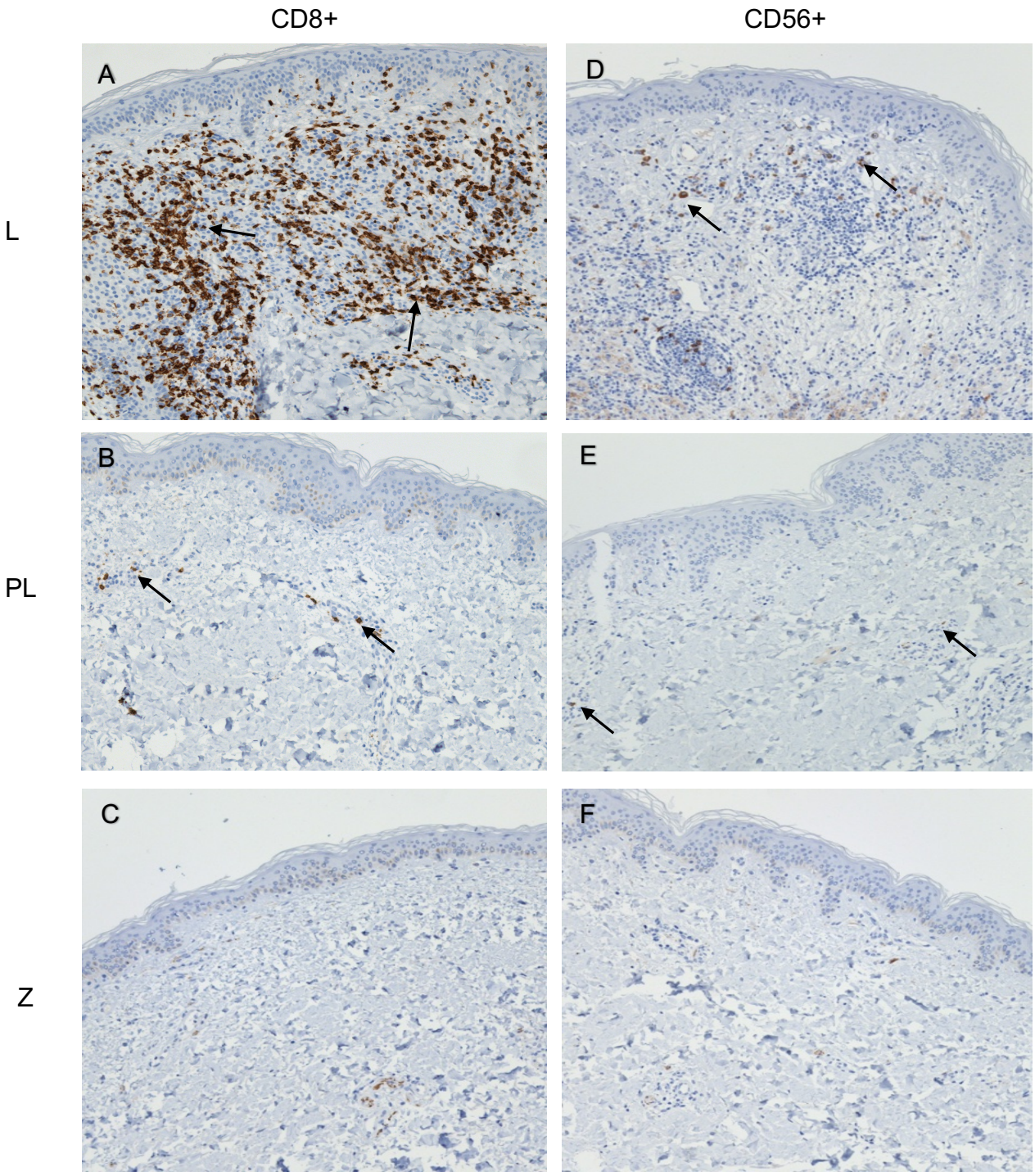
Kvantitativnom analizom ukupnog izražaja CD8+ limfocita T u epidermalnom i dermalnom odjeljku lezije i perilezijske kože pacijenata s halo nevusom te zdrave kože kontrolne skupine, utvrđen je statistički značajno viši udio CD8+ stanica u lezijama u

odnosu na perilezijsku kožu oboljelih ($p<0,0001$) te zdravu kožu kontrolne skupine ($p<0,0001$). (slika 28C). U perilezijskoj koži halo nevusa također je uočen statistički značajno viši udio CD8+ stanica u odnosu na zdravu kožu kontrolne skupine ($p<0,001$) (slika 28C).

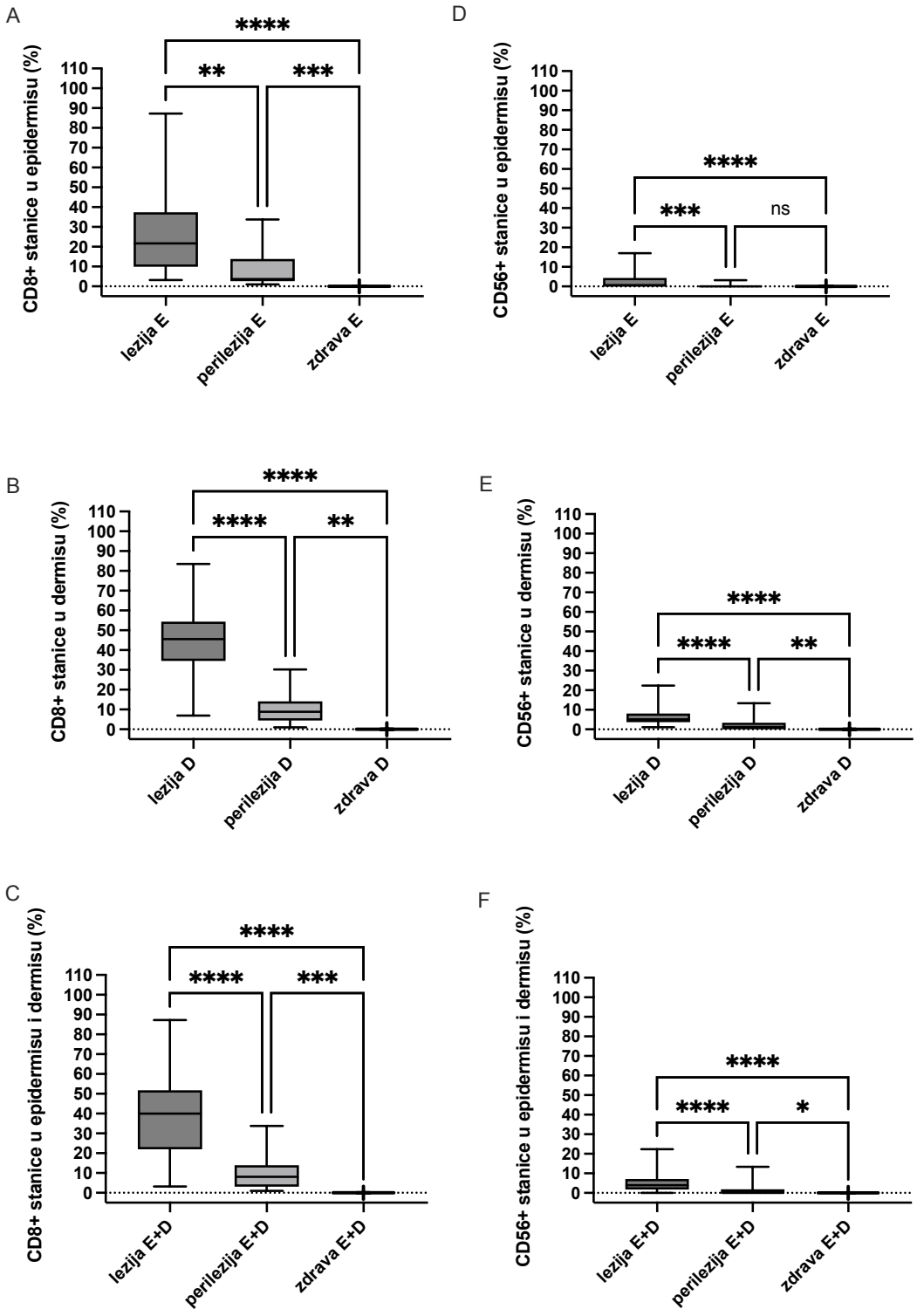
Kvantitativnim ispitivanjem izražaja CD56+ stanica u epidermisu lezija, uočena je statistički značajno veća ekspresija CD56+ stanica NK u lezijama halo nevusa, u odnosu na perilezijsku ($p<0,001$) i zdravu kožu ($p<0,0001$) (slika 28D). Nije bilo statistički značajne razlike u udjelu CD56+ stanica između epidermalnog odjeljka perilezijske kože halo nevusa te epidermisa zdrave kože (slika 28D).

Sličan obrazac uočen je i u dermalnom odjeljku lezija halo nevusa, gdje je udio CD56+ stanica bio statistički značajno veći u odnosu na perilezijsku ($p<0,0001$) i zdravu kožu ($p<0,0001$) (slika 28E). U dermisu perilezijske kože također je utvrđen statistički značajno povišen izražaj CD56+ stanica u odnosu na dermis zdrave kože ($p<0,01$) (slika 28E).

Kvantitativnom analizom ukupnog izražaja CD56+ stanica NK u epidermisu i dermisu lezije i perilezijske kože pacijenata s halo nevusom te zdrave kože kontrolne skupine, opažena je statistički značajna razlika u izražaju CD56+ stanica u lezijama u odnosu na perilezijsku kožu pacijenata s halo nevusom ($p<0,0001$) te zdravu kožu kontrolnih ispitanika ($p<0,0001$) (slika 28F). Također je utvrđen statistički značajno veći udio CD56+ stanica NK u perilezijskoj koži oboljelih u usporedbi s kožom zdravih ispitanika kontrolne skupine ($p<0,05$) (slika 28F).



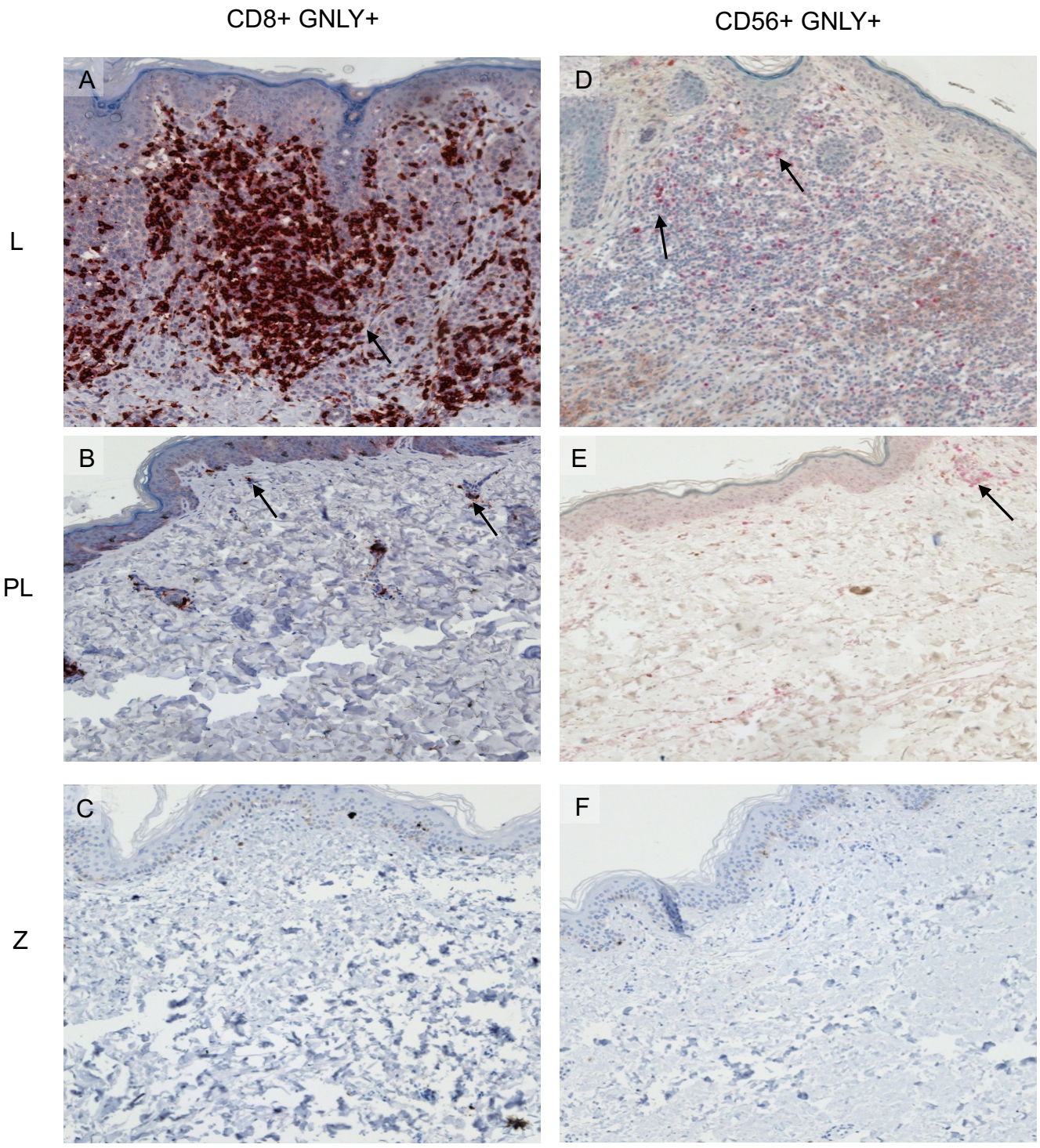
Slika 27. CD8+ i C56+ stanice u: (A,D) leziji halo nevusa, (B,E) perilezijskoj koži te (C,F) u zdravoj koži kontrolne skupine (povećanje 200x). CD8+ i CD56+ stanice su obilježene smeđom bojom. CD8+ i CD56+ stanice su bile najbrojnije u leziji halo nevusa (A,D), malobrojne u perilezijskoj koži (B,E), dok u zdravoj koži kontrolne skupine CD8+ i CD56+ stanice nisu nađene (C,F). L-lezija, PL-perilezija, Z-zdrava koža



Slika 28. Postotak CD8+ i CD56+ stanica među stanicama: (A,D) epidermisa lezija halo nevusa, perilezijske kože i zdrave kože; (B,E) dermisa lezija halo nevusa, perilezijske kože i zdrave kože; (C,F) epidermisa i dermisa lezija halo nevusa, perilezijske i zdrave kože. *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001, ns-nije značajno

4.3.3. *Izražaj molekule granulizina u subpopulaciji citotoksičnih CD8+ limfocita T i CD56+ stanica NK u leziji i perilezijskoj koži bolesnika s halo nevusom u odnosu na zdravu kožu kontrolne skupine*

Jednostrukom imunohistokemijom utvrđena je ushodna regulacija GNLY+ stanica u lezijama i perilezijskoj koži pacijenata s halo nevusom u odnosu na zdravu kožu kontrolnih ispitanika. Stoga je u daljnjem tijeku istraživanja analizirano koje stanice upalnog infiltrata u halo nevusu izražavaju molekulu GNLY. Dakle, dvostrukom imunohistokemijom je utvrđen udio stanica koje, uz GNLY, dodatno izražavaju CD8 i CD56 biljeg. Izražaj dvostruko pozitivnih CD8+GNLY+ i CD56+GNLY+ stanica istražen je u epidermalnom i dermalnom odjeljku lezije i perilezijske kože pacijenata s halo nevusom te u zdravoj koži kontrolne skupine (slika 29, 30 i 31). Gust infiltrat i značajno veći broj CD8+GNLY+ stanica nađen je u lezijama kože pacijenata s halo nevusom u usporedbi s bioptatima zdrave kože kontrolne skupine (Slika 29A). Dvostruko pozitivne CD8+GNLY+ stanice nađene su u značajno većem broju u dermalnom odjeljku lezija i to uglavnom u gornjim dijelovima papilarnog dermisa, a manjim dijelom u bazalnom sloju epidermisa (slika 29A). Glavnina CD8+ stanica u lezijama pacijenata s halo nevusima izražavaju biljeg GNLY+ (slika 29A). Sličan obrazac izražaja uočen je u perilezijskoj koži pacijenata s halo nevusom, iako je broj dvostruko pozitivnih CD8+GNLY+ limfocita T ipak značajno manji u usporedbi s kožom lezije halo nevusa (slika 29B). Međutim, značajno veće nakupljanje CD8+GNLY+ stanica opaženo je u perilezijskoj koži pacijenata s halo nevusom u usporedbi sa zdravom kožom (slika 29B). Većina CD8+GNLY+ stanica smještena je u dermisu perilezijske kože u blizini gnijezda nevus stanica (Slika 29B). U zdravoj koži nisu uočene dvostruko pozitivne CD8+GNLY+ stanice (slika 29C). U bioptatima kože pacijenata s halo nevusom uočen je manji broj dvostruko pozitivnih CD56+GNLY+ stanica u lezijama, a glavnina tih stanica smještena je u srednjem dijelu dermisa (slika 29D). Iako je izražaj CD56+GNLY+ NK-stanica u lezijama halo nevusa malen, ipak je značajno veći u usporedbi s perilezijskom kožom halo nevusa i zdravom kožom kontrolne skupine (slika 29D). U perilezijskoj koži pacijenata s halo nevusom utvrđen je sličan obrazac izražaja CD56+GNLY+ stanica s oskudnim infiltratom dvostruko pozitivnih stanica koje su uglavnom smještene u srednjem sloju dermisa, dok ih nema u bazalnom sloju epidermisa (slika 29E). U zdravoj koži dvostruko pozitivne stanice NK, CD56+GNLY+ nisu nađene (slika 29F).



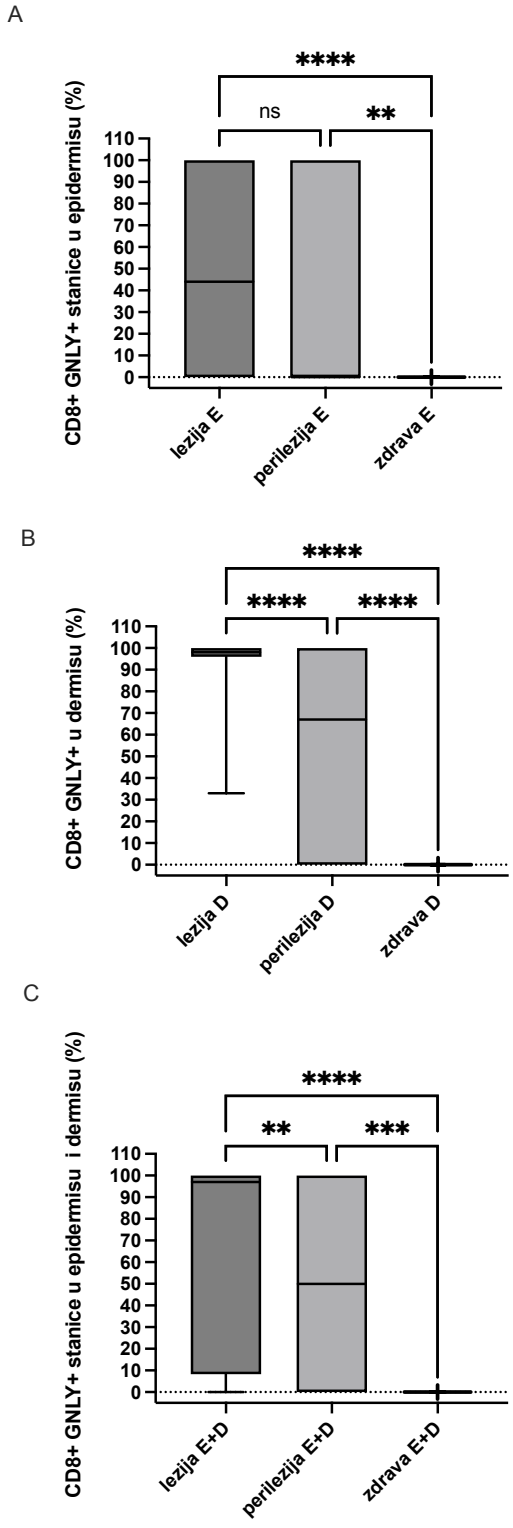
Slika 29. CD8+GNLY+ i CD56+GNLY+ stanice u: (A,D) leziji halo nevusa; (B,E) perilezijskoj koži; (C,F) u zdravoj koži (povećanje 200x). CD8+GNLY+ i CD56+GNLY+ stanice su obilježene smeđom i crvenom bojom. CD8+GNLY+ i CD56+GNLY+ stanice su bile najbrojnije u leziji halo nevusa (A,D), malobrojne u perilezijskoj koži (B,E), dok u zdravoj koži CD8+GNLY+ i CD56+GNLY+ stanice nisu uočene(C,F). L-lezija, PL-perilezija, Z-zdrava koža

Kvantitativnom analizom epidermalnog odjeljka utvrđen je statistički značajno veći udio CD8+GNLY+ stanica u epidermisu lezije u usporedbi s epidermisom zdrave kože kontrolne skupine ($p<0,0001$), ali ne i perilezijske kože oboljelih (slika 30A). U epidermisu perilezijske kože uočen je statistički značajno veći udio CD8+GNLY+ stanica u usporedbi s perilezijom zdrave kože kontrolnih ispitanika ($p<0,005$) (slika 30A). Dvostruko pozitivni citotoksični limfociti T, CD8+GNLY+ stanice, nađeni su u statistički značajno većem udjelu u dermisu lezije pacijenata s halo nevusom u usporedbi s dermisom zdrave kože ($p<0,0001$), kao i s dermisom perilezijske kože ($p<0,0001$) (slika 30B). U dermisu perilezijske kože utvrđen je statistički značajno veći udio dvostruko pozitivnih CD8+GNLY+ stanica u usporedbi s dermisom zdrave kože ($p<0,0001$) (slika 30B).

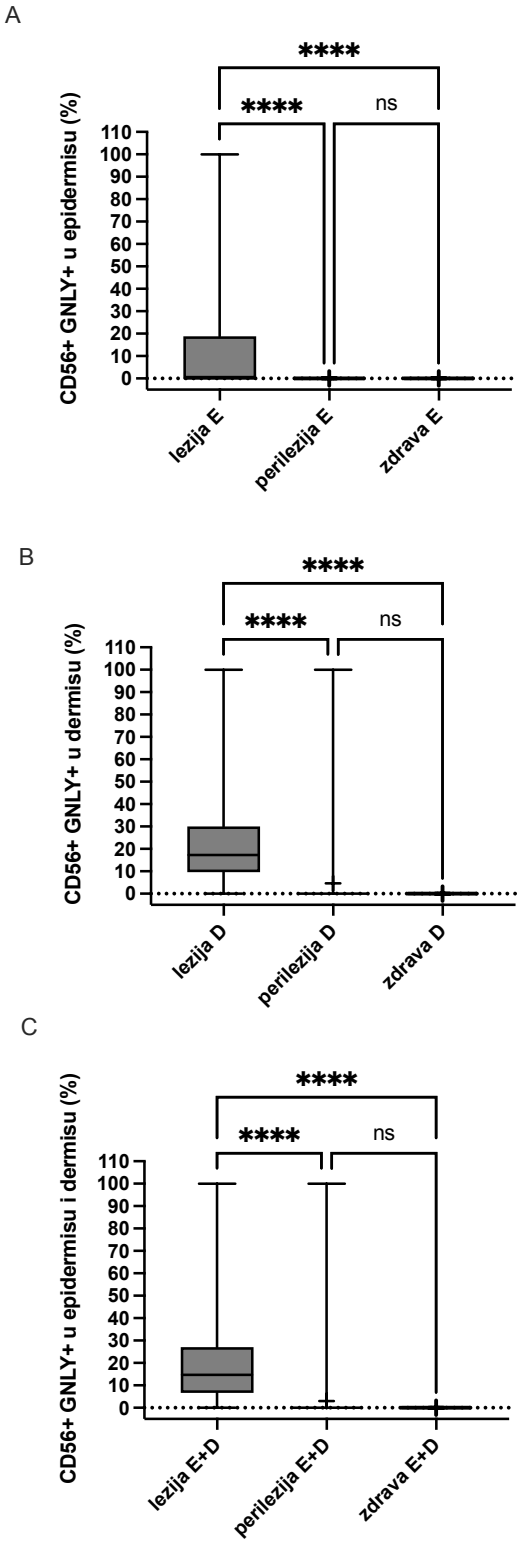
Kvantitativnom analizom ukupnog izražaja CD8+GNLY+ stanica zapažena je veća učestalost dvostruko pozitivnih citotoksičnih limfocita T koji su ujedno i GNLY+ u leziji pacijenata s halo nevusom u usporedbi s perilezijskom kožom ($p<0,01$) (slika 30C). Udio CD8+GNLY+ stanica bio je statistički značajno veći u leziji halo nevusa u odnosu na zdravu kožu ($p<0,0001$). U perilezijskoj koži pacijenata s halo nevusom utvrđen je značajno viši udio dvostruko pozitivnih CD8+GNLY+ stanica u usporedbi sa zdravom kožom kontrolnih ispitanika ($p<0,001$) (slika 30C).

Kvantitativnom analizom učestalosti dvostruko pozitivnih citotoksičnih stanica NK u epidermalnom odjeljku, utvrđen je statistički značajno veći izražaj CD56+GNLY+ stanica u epidermisu lezije pacijenata s halo nevusom u odnosu na epidermis perilezijske kože ($p<0,0001$) te epidermis zdrave kože ($p<0,0001$) (slika 31A). U epidermisu perilezijske kože pacijenata s halo nevusom te u epidermisu zdrave kože kontrolnih ispitanika nisu nađene dvostruko pozitivne CD56+GNLY+ stanice (slika 31A). Kvantitativnom analizom izražaja CD56+GNLY+ stanica u dermalnom odjeljku uočen je statistički značajno veći udio dvostruko pozitivnih stanica u dermisu lezije pacijenata s halo nevusom u odnosu na dermis perilezijske ($p<0,0001$) i zdrave kože kontrolne skupine ($p<0,0001$) (slika 31B). Iako je veći broj ovih stanica nađen u dermisu perilezijske kože pacijenata s halo nevusom u odnosu na dermis zdrave kože, statistički značajna razlika u učestalosti dvostruko pozitivnih CD56+GNLY+ stanica NK između ove dvije skupine ispitanika nije utvrđena (slika 31B).

Kvantitativnom istraživanjem ukupnog udjela stanica NK koje su istovremeno pozitivne na GNLY u lezijama pacijenata s halo nevusom, perilezijskoj koži te zdravoj koži kontrolnih ispitanika, uočen je statistički značajno veći udio CD56+GNLY+ stanica u leziji u odnosu na perilezijsku kožu pacijenata s halo nevusom ($p<0,0001$) te u odnosu na zdravu kožu kontrolne skupine ($p<0,0001$) (slika 31C). Usporedbom ukupnog udjela CD56+GNLY+ stanica u epidermisu i dermisu perilezijske kože pacijenata s halo nevusom i zdrave kože kontrolne skupine nije utvrđena statistički značajna razlika (slika 31C).



Slika 30. Udio CD8+GNLY+ stanica unutar subpopulacije citotoksičnih stanica T (CD3+CD8+) u: (A) epidermisu lezija halo nevusa, perilezijske kože i zdrave kože; (B) dermisu lezija halo nevusa, perilezijske kože i zdrave kože; (C) epidermisu i dermisu lezija halo nevusa, perilezijske i zdrave kože. **p<0,01,***p<0,001, ****p<0,0001; ns-nije značajno.



Slika 31. Udio CD56+GNLY+ stanica unutar subpopulacije citotoksičnih stanica NK (CD3-CD56+) u: (A) epidermisu lezija halo nevusa, perilezijske kože i zdrave kože; (B) dermisu lezija halo nevusa, perilezijske kože i zdrave kože; (C) epidermisu i dermisu lezija halo nevusa, perilezijske i zdrave kože. ****p<0,0001, ns-nije značajno

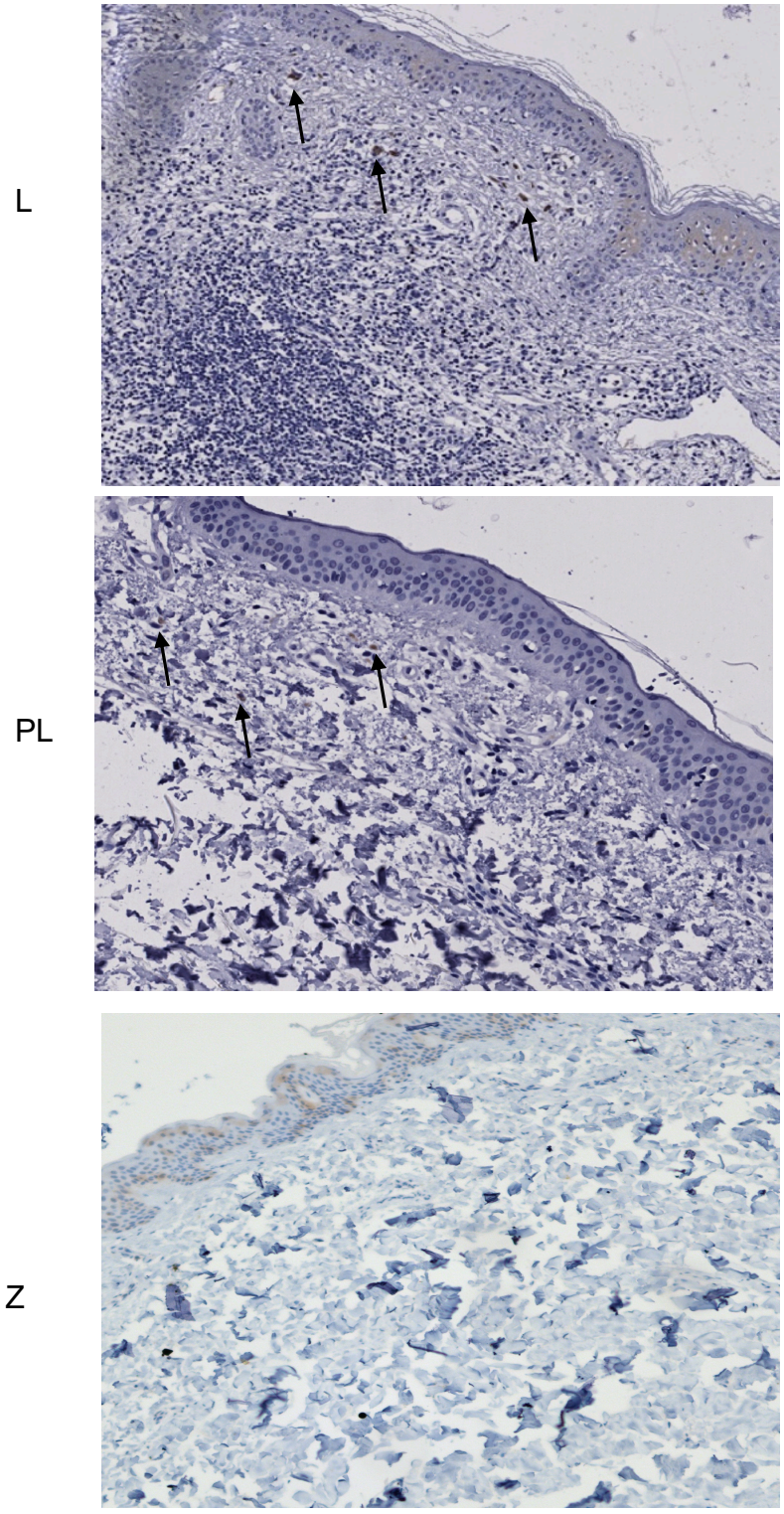
4.3.4. *Izražaj molekule perforina u lezijama i perilezijskoj koži pacijenata s halo nevusom u odnosu na zdravu kožu kontrolne skupine*

Izražaj molekule perforina u leziji i perilezijskoj koži pacijenata s halo nevusom te u zdravoj koži ispitanika kontrolne skupine prikazan je na slici 32 i 33. Imunohistokemijski izražaj navedene molekule analiziran je u oba odjeljka kože, odnosno u epidermisu i dermisu. PRF+ stanice uočene su u dermalnom odjeljku lezije halo nevusa, poglavito u gornjim slojevima papilarnog dermisa, a uopće ih nema u epidermalnom sloju lezije (slika 32A). Isti obrazac izražaja PRF+ stanica, ali u značajno manjoj mjeri, opažen je u perilezijskoj koži pacijenata s halo nevusom gdje PRF+ stanice također većinom infiltriraju dermis, a nema ih u epidermisu (slika 32B). U kontrolnoj skupini ispitanika PRF+ stanica uopće nema (slika 32C).

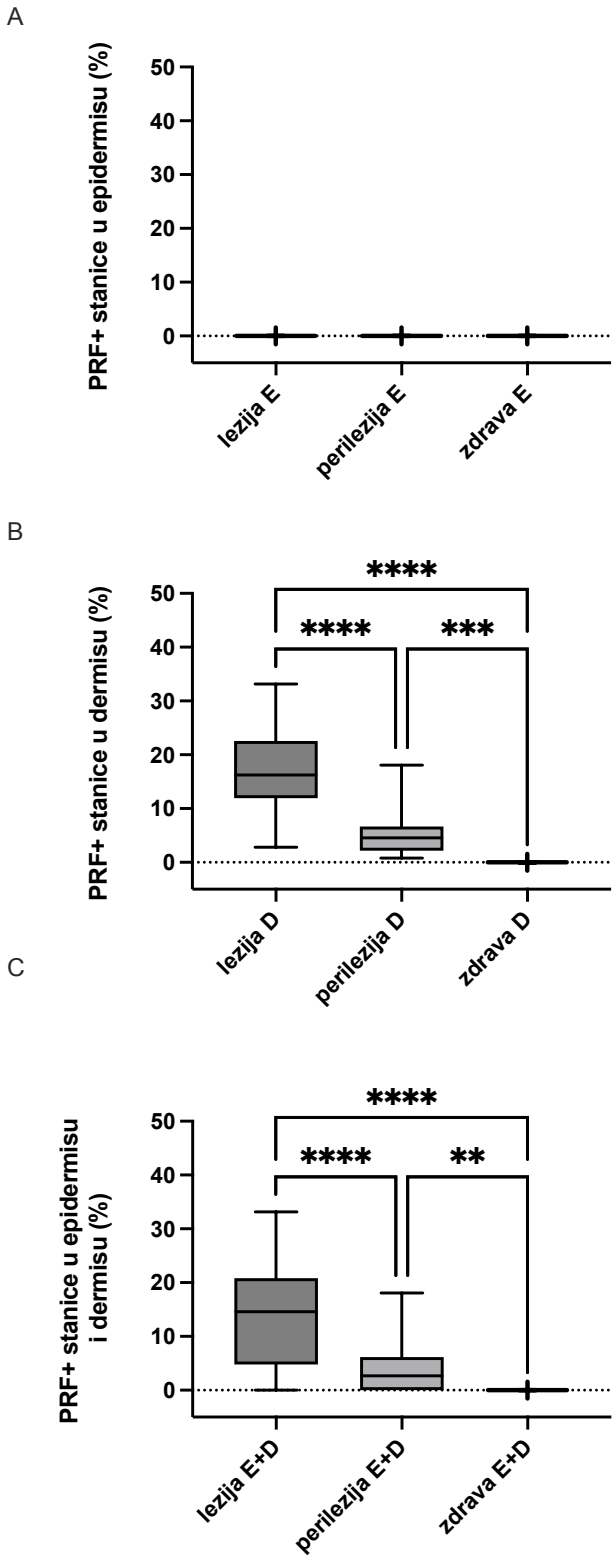
Kvantitativna analiza epidermalnog odjeljka lezije halo nevusa, perilezijske te zdrave kože kontrolne skupine pokazala je da niti u jednoj skupini ispitanika nisu uočene PRF+ stanice u epidermalnom sloju kože (slika 33A). Ispitivanjem izražaja perforina u dermalnom odjeljku uočen je statistički značajno viši udio PRF+ stanica u dermisu lezije u odnosu na dermis perilezijske kože pacijenata s halo nevusom ($p<0,0001$) te također u usporedbi s dermisom zdrave kože kontrolnih ispitanika ($p<0,0001$) (slika 33B). Statistički značajno viši udio PRF+ stanica također je zapažen u perilezijskoj koži halo nevusa u odnosu na kožu ispitanika kontrolne skupine ($p<0,001$) (slika 33B).

Kvantitativnom analizom ukupnog izražaja perforina u epidermalnom i dermalnom odjeljku lezije i perilezijske kože pacijenata s halo nevusom te zdrave kože kontrolne skupine, utvrđen je statistički značajno viši postotak PRF+ stanica u lezijama u odnosu na perilezijsku kožu pacijenata s halo nevusom ($p<0,0001$) te zdravu kožu kontrolne skupine ($p<0,0001$) (slika 33C). Također je uočen statistički značajno viši udio PRF+ stanica u perilezijskoj koži oboljelih u odnosu na kožu ispitanika kontrolne skupine ($p<0,01$) (slika 33C).

PRF+



Slika 32. PRF+ stanice u: (A) leziji halo nevusa, (B) perilezijskoj koži te u (C) zdravoj koži (povećanje 200x). PRF+ stanice su obilježene smeđom bojom. PRF+ stanice su bile najbrojnije u leziji halo nevusa (A), malobrojne u perilezijskoj koži (B), dok u zdravoj koži kontrolne skupine PRF+ stanice nisu nađene (C). L-lezija, PL-perilezija, Z-zdrava koža



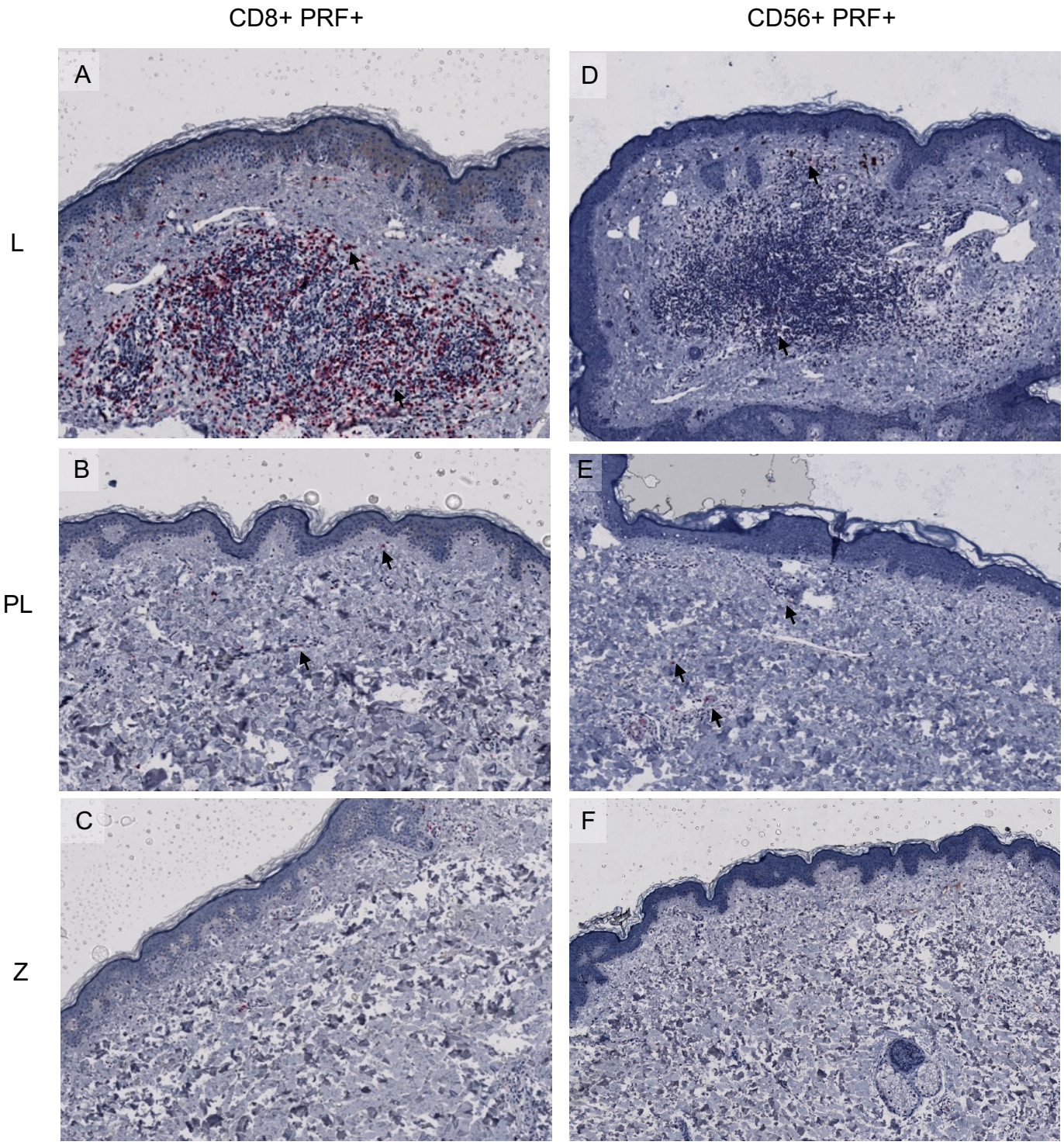
Slika 33. Postotak PRF+ stanica među stanicama: (A) epidermisa lezije i perilezijske kože halo nevusa te zdrave kože; (B) dermisa lezije i perilezijske kože halo nevusa te zdrave kože i (C) epidermisa i dermisa lezije te perilezijske kože halo nevusa i zdrave kože kontrolne skupine. **p<0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001

4.3.5. *Izražaj molekule perforina u subpopulaciji citotoksičnih CD8+ limfocita T i CD56+ stanica NK u leziji i perilezijskoj koži pacijenata s halo nevusom u odnosu na zdravu kožu kontrolne skupine*

Jednostrukom je imunohistokemijom uočena povećana učestalost i karakteristična distribucija PRF+ stanica u lezijama kože pacijenata s halo nevusom u odnosu na zdravu kožu kontrolne skupine, stoga je detaljno analizirano koje stanice upalnog infiltrata izražavaju molekulu perforina. Budući da PRF izražavaju upalne stanice s izraženim citotoksičnim učinkom, dvostrukom imunohistokemijom je utvrđen udio stanica koje, uz PRF, dodatno izražavaju CD8 i CD56 biljeg.

Izražaj CD8+PRF+ i CD56+PRF+ stanica istražen je u epidermalnom i dermalnom odjeljku lezije i perilezijske kože pacijenata s halo nevusom te u zdravoj koži kontrolne skupine (slika 34,35 i 36). Značajno veći broj CD8+PRF+ stanica uočen je u lezijama kože pacijenata s halo nevusom u usporedbi s uzorcima zdrave kože kontrolne skupine (Slika 34A). Dvostruko pozitivne CD8+PRF+ stanice nađene su u značajno većem broju u dermalnom odjeljku lezija i to uglavnom u gornjim dijelovima dermisa, a uopće ih nema u epidermisu (slika 34A). Gotovo sve CD8+ stanice u lezijama pacijenata s halo nevusom izražavale su biljeg PRF+ (slika 34A). Isti obrazac izražaja, ali u značajno manjoj mjeri, opažen je u perilezijskoj koži pacijenata s halo nevusom (slika 16B). Značajno veće nakupljanje CD8+PRF+ stanica uočeno je u perilezijskoj koži pacijenata s halo nevusom u usporedbi sa zdravom kožom (slika 34B). Većina CD8+PRF+ stanica smještena je u dermisu perilezijske kože u blizini gnijezda halo nevusa (Slika 34B), dok ih u zdravoj koži uopće nema (Slika 34C).

U uzorcima kože pacijenata s halo nevusom, dvostruko pozitivne CD56+PRF+ stanice uočene su u manjem broju u dermalnom infiltratu lezija, većinom u srednjem dijelu papilarnog dermisa (slike 34D). Iako je broj CD56+ NK-stanica koje izražavaju molekulu PRF u lezijama halo nevusa malen, ipak je nešto veći u usporedbi s perilezijskom kožom oboljelih (slika 34E) i zdravom kožom kontrolne skupine (slika 34F). U perilezijskoj koži pacijenata s halo nevusom utvrđen je sličan obrazac izražaja s vrlo oskudnim infiltratom CD56+PRF+ stanica koje su uglavnom smještene u srednjem sloju dermisa, a nema ih u epidermisu (slika 34E). U zdravoj koži kontrolne skupine dvostruko pozitivne stanice NK, CD56+PRF+ stanice nisu uočene (slika 34F).



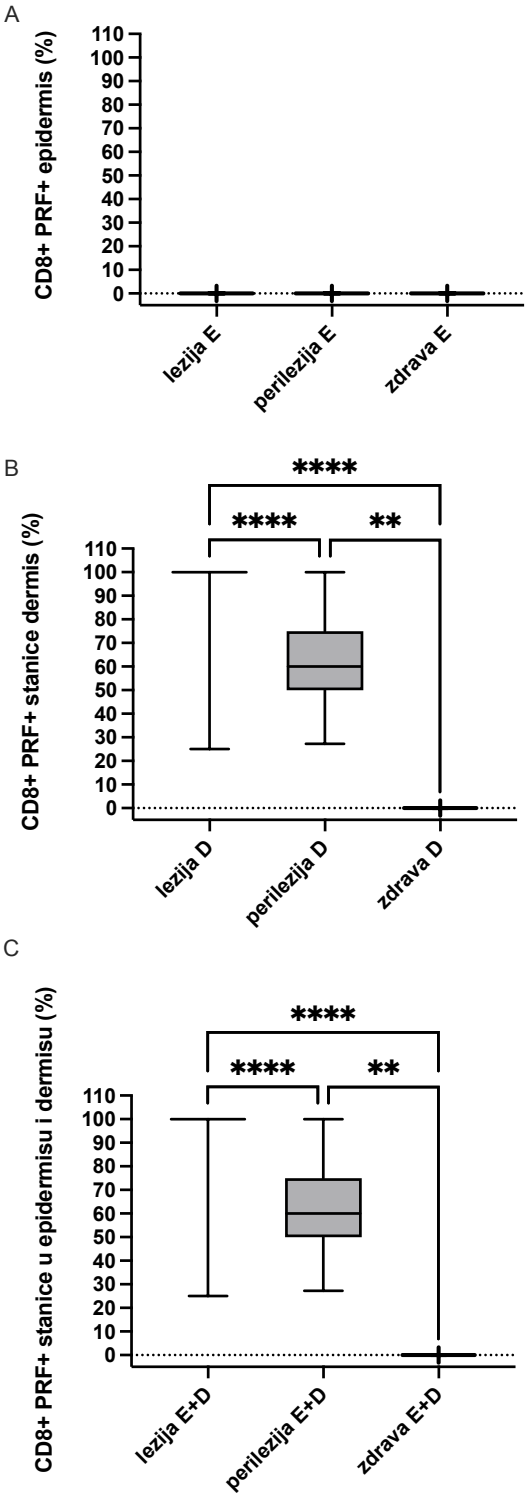
Slika 34. CD8+PRF+ i CD56+PRF+ stanice u: (A,D) leziji halo nevusa, (B,E) perilezijskoj koži te (C,F) u zdravoj koži kontrolne skupine (povećanje 200x). CD8+PRF+ i CD56+PRF+ stanice su obilježene smeđom i crvenom bojom. CD8+PRF+ i CD56+PRF+ stanice su bile najbrojnije u leziji halo nevusa (A,D), malobrojne u perilezijskoj koži (B,E), dok u zdravoj koži kontrolne skupine CD8+PRF+ i CD56+PRF+ stanice nisu nađene (C,F). L-lezija, PL-perilezija, Z-zdrava koža

Kvantitativnom analizom epidermalnog odjeljka lezije i perilezijske kože halo nevusa te zdrave kože kontrolne skupine ispitanika, CD8+PRF+ stanice uopće nisu nađene (slika 35A). Dvostruko pozitivni CD8+PRF+ limfociti T, uočeni su u statistički značajno većem postotku u dermisu lezije pacijenata s halo nevusom u odnosu na dermis perilezijske ($p<0,0001$) i zdrave kože kontrolne skupine ($p<0,0001$) (slika 35B). Usporedbom izražaja CD8+PRF+ stanica u dermisu perilezijske kože pacijenata s halo nevusom u odnosu na dermis zdrave kože nađena je statistički značajno viša učestalost CD8+PRF+ stanica u dermisu perilezijske kože ($p<0,01$) (slika 35B).

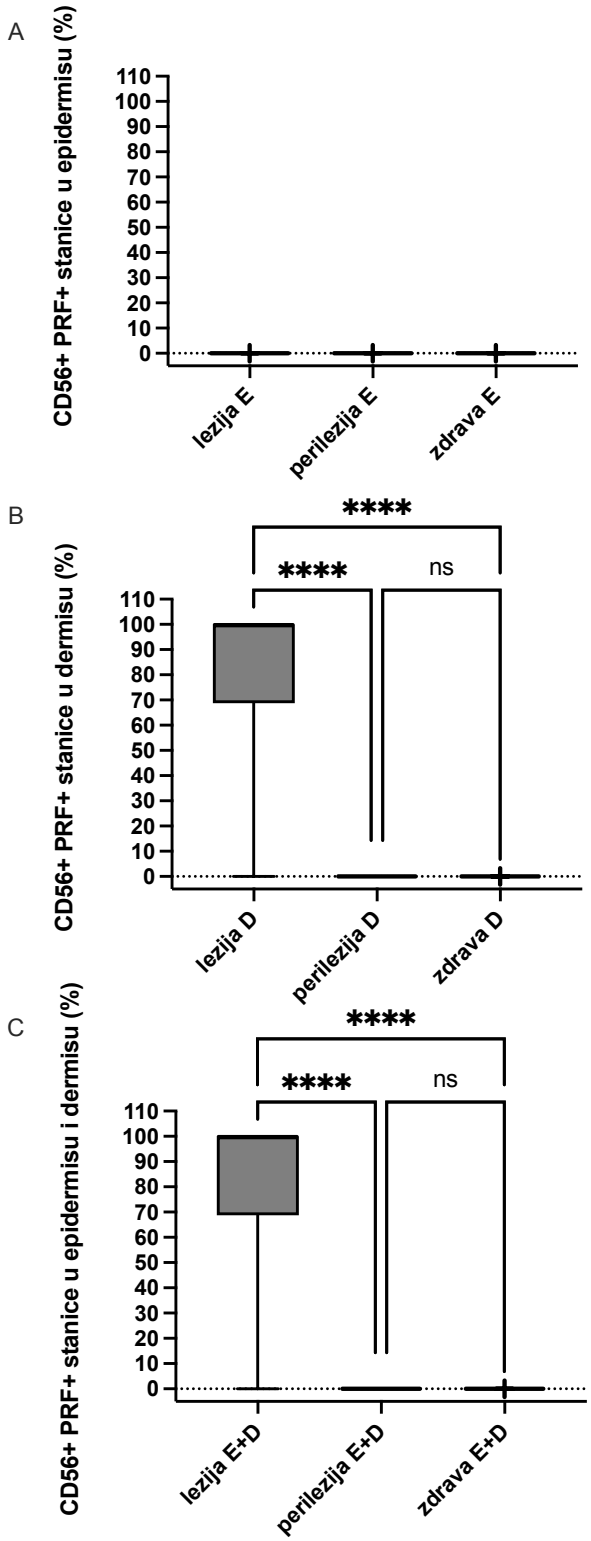
Kvantitativnom analizom ukupnog izražaja dvostruko pozitivnih CD8+PRF+ stanica u epidermisu i dermisu lezije te perilezijske kože pacijenata s halo nevusom uočena je značajno viša učestalost CD8+PRF+ u leziji halo nevusa u odnosu na perilezijsku kožu oboljelih ($p<0,0001$) te u usporedbi s zdravom kožom kontrolne skupine ($p<0,0001$), (slika 35C). Učestalost CD8+PRF+ stanica u oba odjeljka perilezijske kože bila je također značajno veća u usporedbi s zdravom kožom kontrolnih ispitanika ($p<0,01$) (slika 35C).

Dvostruko pozitivne citotoksične stanice NK, CD56+PRF+ stanice, nisu utvrđene u epidermalnom odjeljku ni lezije, ni perilezijske kože oboljelih niti u epidermisu zdrave kože kontrolne skupine (slika 36A). Izražaj dvostruko pozitivnih CD56+PRF+ stanica u dermalnom odjeljku bio je statistički značajno veći u dermisu lezije pacijenata s halo nevusom u odnosu na dermis perilezijske kože oboljelih ($p<0,0001$) i zdrave kože kontrolne skupine ($p<0,0001$) (slika 36B). Usporedbom izražaja CD56+PRF+ stanica u dermisu perilezijske kože pacijenata s halo nevusom u odnosu na dermis zdrave kože utvrđena je viša učestalost CD56+PRF+ stanica u dermisu perilezijske kože, ali bez statističke značajnosti (slika 36B).

Kvantitativnom istraživanjem ukupnog udjela stanica NK koje su istovremeno pozitivne na perforin u lezijama i perilezijskoj koži pacijenata s halo nevusom te zdravoj koži kontrolnih ispitanika, uočen je statistički značajno veći udio CD56+PRF+ stanica u leziji u usporedbi s perilezijskom ($p<0,0001$) i zdravom kožom ($p<0,0001$) (slika 36C). Viša učestalost CD56+PRF+ stanica u epidermisu i dermisu perilezijske kože u odnosu na ukupan udio tih stanica u zdravoj koži nije bila statistički značajna (slika 36C).



Slika 35. Udio CD8+PRF+ stanica unutar subpopulacije citotoksičnih limfocita T (CD3+CD8+) u: (A) epidermisu lezija halo nevusa, perilezijskoj koži i zdravoj koži; (B) dermisu lezija halo nevusa, perilezijskoj koži i zdravoj koži; (C) epidermisu i dermisu lezija halo nevusa, perilezijske i zdrave kože. **p<0,01, ****p<0,0001.



Slika 36. Udio CD56+PRF+ stanica unutar subpopulacije citotoksičnih stanica NK (CD3-CD56+) u: (A) epidermisu lezija halo nevusa, perilezijske kože i zdrave kože; (B) dermisu lezija halo nevusa, perilezijske kože i zdrave kože; (C) epidermisu i dermisu lezija halo nevusa, perilezijske i zdrave kože. ****p<0,0001 ns- nije značajno.

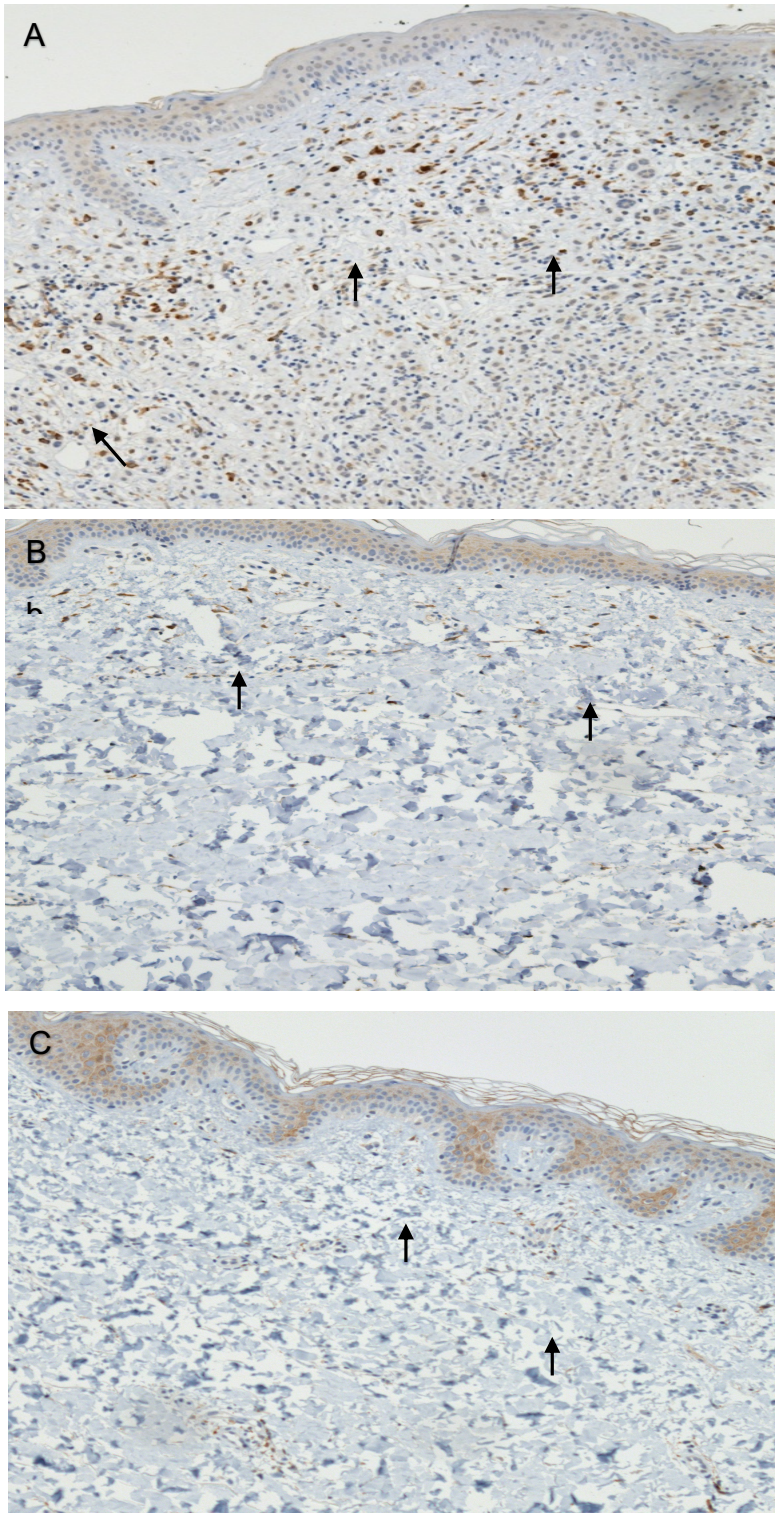
4.3.6. *Izražaj molekule PRF-2 u lezijama i perilezijskoj koži pacijenata s halo nevusom u odnosu na zdravu kožu kontrolne skupine*

Izražaj molekule PRF-2 u leziji i perilezijskoj koži pacijenata s halo nevusom te u zdravoj koži ispitanika kontrolne skupine prikazan je na slici 37 i 38. Imunohistokemijski izražaj navedene molekule analiziran je u oba odjeljka kože, odnosno u epidermisu i dermisu. PRF-2+ stanice uglavnom su uočene u dermalnom odjeljku lezije halo nevusa, poglavito u gornjim slojevima papilarnog dermisa, a vrlo su rijetke u bazalnom sloju epidermisa (slika 37A). Sličan obrazac izražaja PRF-2+ stanica, ali u značajno manjoj mjeri, opažen je u perilezijskoj koži pacijenata s halo nevusom gdje PRF-2+ stanice također većinom infiltriraju dermis, a u epidermisu ih uopće nema (slika 37B). U kontrolnoj skupini ispitanika PRF-2+ stanice uopće nema u epidermisu, a kao i u perilezijskoj koži poglavito se nalaze u gornjem dijelu dermisa (slika 37C).

Kvantitativnim istraživanjem izražaja molekule PRF-2 u epidermalnom odjeljku ispitivanih bioptata utvrđen je značajno viši udio PRF-2+ stanica u epidermisu lezije u odnosu na epidermis perilezijske kože pacijenata s halo nevusom ($p<0,001$), kao i u odnosu na epidermis zdrave kože kontrolne skupine ($p<0,0001$) (slika 38A). Ispitivanjem izražaja PRF-2 u dermalnom odjeljku uočen je statistički značajno viši udio PRF-2+ stanica u dermisu lezije u odnosu na dermis perilezijske kože pacijenata s halo nevusom ($p<0,0001$) te u odnosu na dermis zdrave kože kontrolnih ispitanika ($p<0,0001$) (slika 38B). Nije bilo statistički značajne razlike u udjelu PRF-2+ stanica u dermisu perilezijske i zdrave kože (slika 38B).

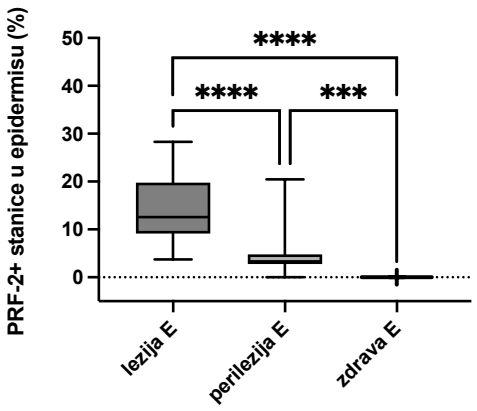
Kvantitativnom analizom ukupnog izražaja PRF-2 u epidermalnom i dermalnom odjeljku lezije i perilezijske kože pacijenata s halo nevusom te zdrave kože kontrolne skupine, utvrđen je statistički značajno viši postotak PRF-2+ stanica u lezijama u odnosu na perilezijsku kožu pacijenata s halo nevusom ($p<0,0001$) te zdravu kožu kontrolne skupine ($p<0,0001$) (slika 38C). Uočen viši ukupni udio PRF-2+ stanica u perilezijskoj koži oboljelih u odnosu na kožu ispitanika kontrolne skupine nije bio statistički značajan (slika 38C).

PRF-2+

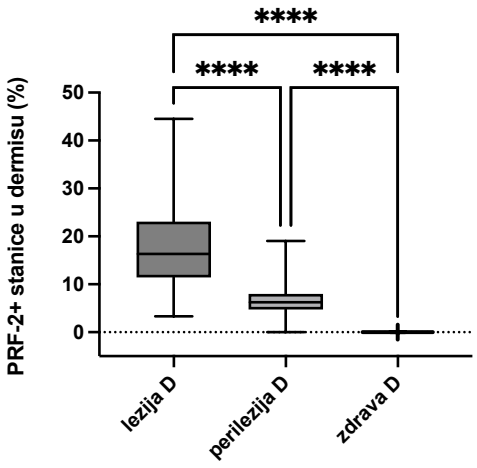


Slika 37. PRF-2+ stanice u: (A) leziji halo nevusa, (B) perilezijskoj koži te u (C) zdravoj koži (povećanje 200x). PRF-2+ stanice su obilježene smeđom bojom. PRF-2+ stanice su bile najbrojnije u leziji halo nevusa (A), malobrojne u perilezijskoj koži (B), kao i u zdravoj koži kontrolne skupine (C). L-lezija, PL-perilezija, Z-zdrava koža

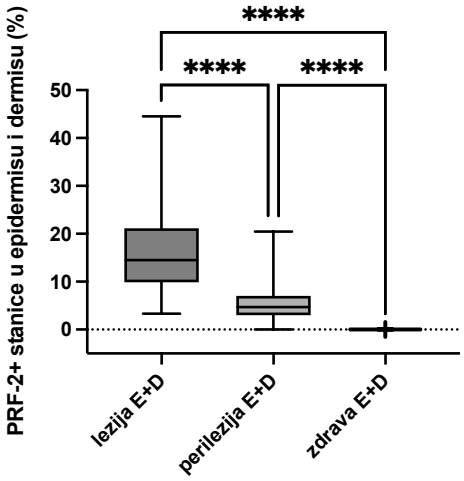
A



B



C



Slika 38. Postotak PRF-2+ stanica među stanicama: (A) epidermisa lezije i perilezijske kože halo nevusa te zdrave kože; (B) dermisa lezije i perilezijske kože halo nevusa te zdrave kože i (C) epidermisa i dermisa lezije te perilezije halo nevusa i zdrave kože kontrolne skupine. ***p<0,001; ****p<0,0001.

4.3.7. *Izražaj molekule PRF-2+ u subpopulaciji CD68+ makrofaga u leziji i perilezijskoj koži pacijenata s halo nevusom u odnosu na zdravu kožu kontrolne skupine*

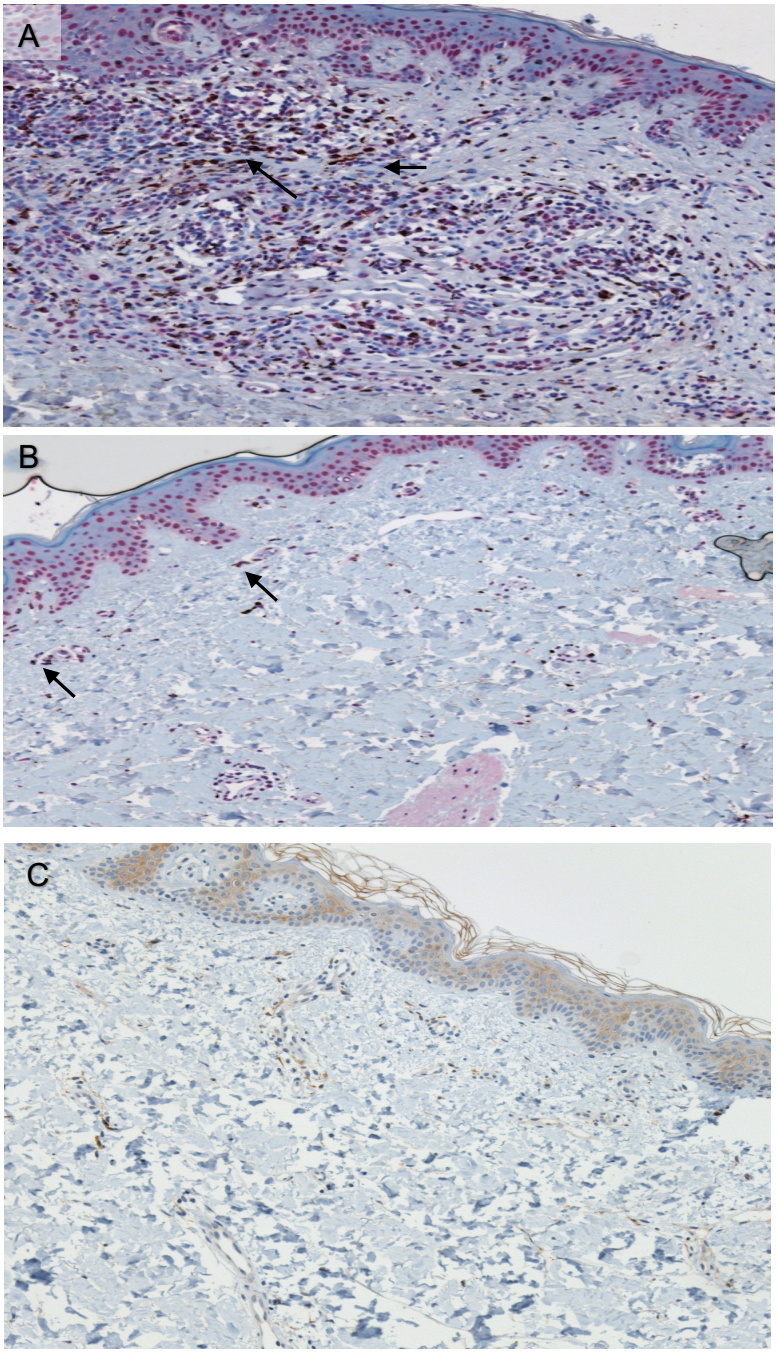
Jednostrukom je imunohistokemijom opažena povećana učestalost i karakteristična distribucija PRF-2+ stanica u lezijama kože pacijenata s halo nevusom u odnosu na zdravu kožu kontrolne skupine, stoga je detaljno analizirano koje stanice upalnog infiltrata izražavaju PRF-2+. Budući da PRF-2+ izražavaju stanice monocitno-makrofagne linije, dvostrukom je imunohistokemijom utvrđen udio stanica koje, uz PRF-2+, dodatno izražavaju CD68 biljeg u upalnom infiltratu.

Izražaj CD68+PRF-2+ stanica istražen je u epidermalnom i dermalnom odjeljku lezije i perilezijske kože oboljelih te u zdravoj koži kontrolne skupine ispitanika (slika 39 i 40). Značajno veći broj CD68+PRF-2+ stanica uočen je u lezijama kože pacijenata s halo nevusom u usporedbi s uzorcima zdrave kože (Slika 39A). Dvostruko pozitivne CD68+PRF-2+ stanice nađene su u značajno većem broju u dermalnom odjeljku lezija i to uglavnom u gornjim dijelovima dermisa te također u bazalnom sloju epidermisa blizu gnijezda nevus stanica (slika 39A). Gotovo sve CD68+ stanice u lezijama pacijenata s halo nevusom izražavale su biljeg PRF-2+ (slika 39A).

Značajno veće nakupljanje CD68+PRF-2+ stanica uočeno je također u perilezijskoj koži pacijenata s halo nevusom u usporedbi sa zdravom kožom (slika 39B). CD68+PRF-2+ stanice poglavito su smještene u gornjem dijelu dermisa perilezijske kože (Slika 39B), dok u zdravoj koži nisu uočene (Slika 39C).

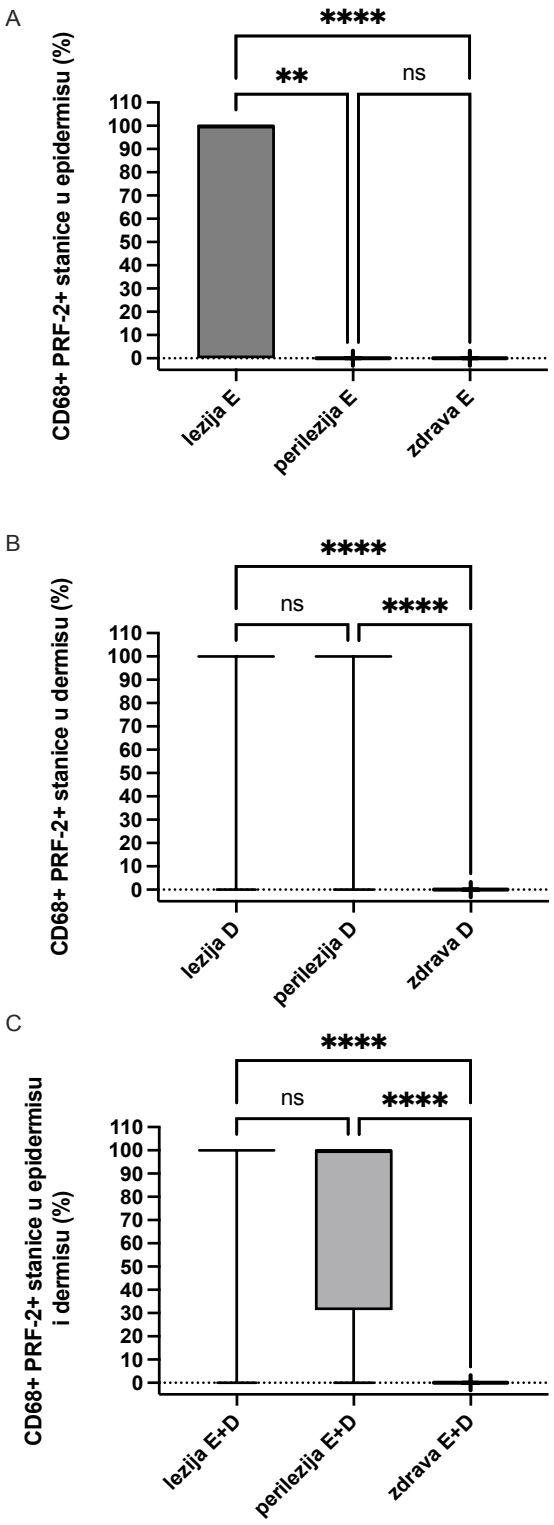
Kvantitativnom analizom epidermalnog odjeljka uočena je statistički značajno viša učestalost CD68+PRF-2+ stanica u leziji halo nevusa nego u perilezijskoj koži oboljelih ($p<0,01$) i zdravoj koži kontrolnih ispitanika ($p<0,0001$) (slika 40A). Dvostruko pozitivne CD68+PRF-2+ stanice nađene su u statistički značajno većem postotku u dermisu lezije pacijenata s halo nevusom u odnosu na dermis zdrave kože kontrolne skupine ($p<0,0001$), ali ne i u usporedbi s dermisom perilezijske kože oboljelih (slika 40B). Usporedbom izražaja CD68+PRF-2+ stanica u dermisu perilezijske kože halo nevusa u odnosu na dermis zdrave kože nađena je također statistički značajno viša učestalost CD68+PRF-2+ stanica u dermisu perilezijske kože ($p<0,0001$) (slika 40B).

CD68+ PRF-2



Slika 39. CD68+PRF-2+ stanice u: (A) leziji halo nevusa, (B) perilezijskoj koži te (C) u zdravoj koži kontrolne skupine (povećanje 200x). CD68+PRF-2+ stanice su obilježene smeđom i crvenom bojom. CD68+PRF-2+ stanice su bile najbrojnije u leziji halo nevusa (A), malobrojne u perilezijskoj koži (B), dok su u zdravoj koži kontrolne skupine CD68+PRF-2+ stanice također malobrojne (C). L-lezija, PL-perilezija, Z-zdrava koža

Kvantitativnom analizom ukupnog izražaja dvostruko pozitivnih CD68+PRF-2+ stanica u epidermisu i dermisu lezije te perilezijske kože pacijenata s halo nevusom uočena je značajno viša učestalost CD68+PRF-2+ u leziji u odnosu na zdravu kožu kontrolne skupine ($p<0,0001$), ali ne u odnosu na perilezijsku kožu oboljelih (slika 40C). Ukupna učestalost dvostruko pozitivnih CD68+PRF-2+ stanica u oba odjeljka perilezijske kože bila je također statistički značajno veća u usporedbi sa zdravom kožom kontrolnih ispitanika ($p<0,0001$) (slika 40C).



Slika 40. Udio CD68+PRF-2+ stanica unutar subpopulacije makrofaga (CD68+) u: (A) epidermisu lezija halo nevusa, perilezijskoj koži i zdravoj koži; (B) dermisu lezija halo nevusa, perilezijskoj koži i zdravoj koži; (C) epidermisu i dermisu lezija halo nevusa, perilezijske i zdrave kože. **p<0,01; ****p<0,0001, ns-nije značajno

4.4. Usporedba izražaja citotoksičnih molekula granulizina, perforina i perforina-2 u lezijama i perilezijskoj koži vitiliga i halo nevusa

Nakon provedene pojedinačne analize izražaja citotoksičnih molekula GNLY, PRF i PRF-2, kao i subpopulacija citotoksičnih limfocita i makrofaga koje izražavaju navedene citotoksične proteine, u lezijama vitiliga i halo nevusa u odnosu na perilezijsku i zdravu kožu, provedena je usporedba njihova ukupnog izražaja između vitiliga i halo nevusa. Ukupni izražaj svake molekule i pripadajućih staničnih populacija procijenjen je objedinjeno za epidermis i dermis, čime je omogućena izravna usporedba intenziteta citotoksične aktivnosti između dviju bolesti.

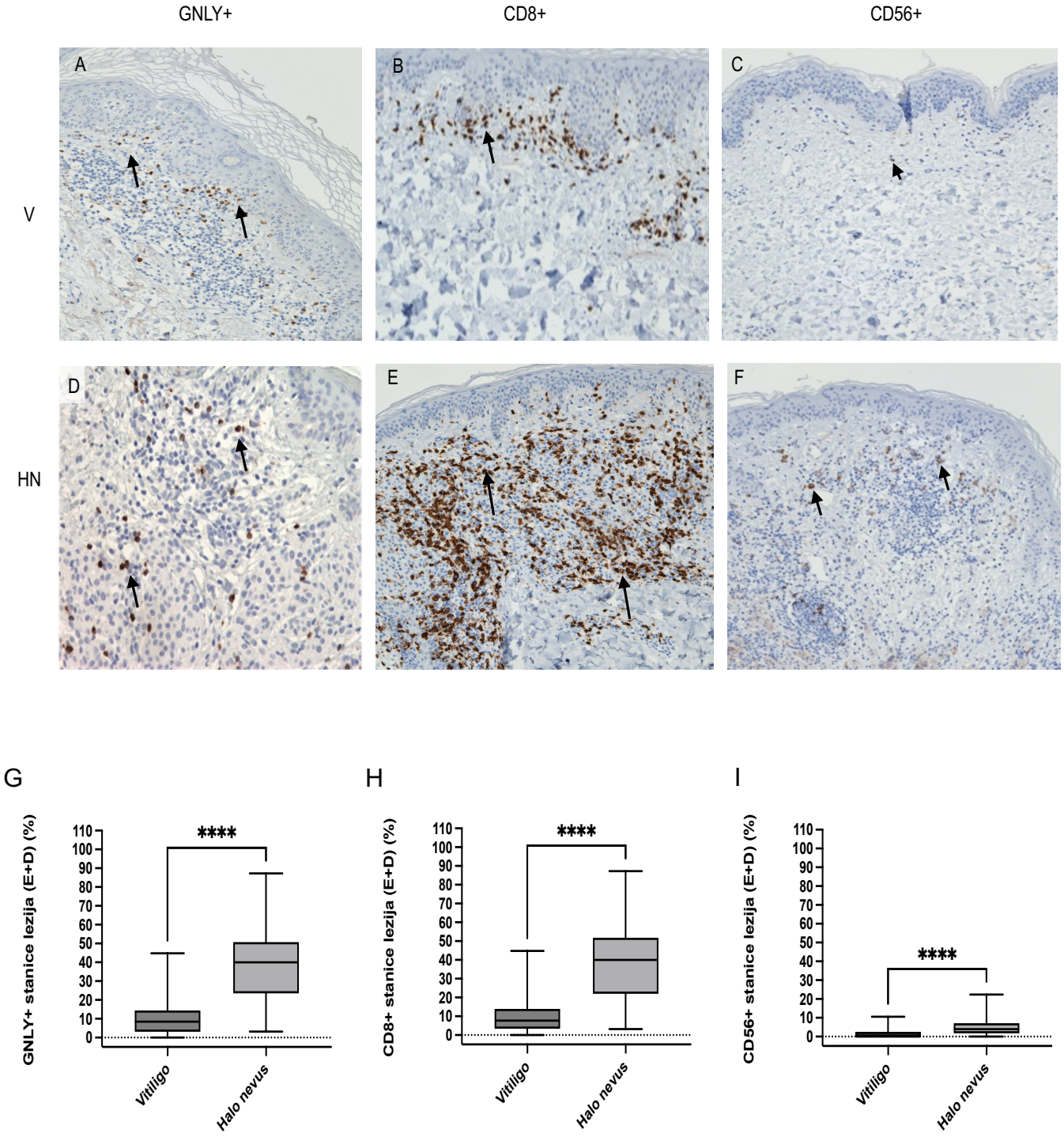
Ovakav pristup omogućio je usporedbu citotoksične imunološke aktivnosti između vitiliga i halo nevusa, uzimajući u obzir da se radi o bolestima s različitom prostornom organizacijom i dinamikom imunološkog odgovora. Posebna je pozornost posvećena analizi perilezijskih područja, s ciljem utvrđivanja postoje li razlike u opsegu subkliničke imunološke aktivnosti između vitiliga, kao difuzne i progresivne imunosno posredovane bolesti, i halo nevusa, koji predstavlja ograničenu leziju.

Nakon usporedbe jednostrukog izražaja citotoksičnih molekula provedena je i analiza dvostruko pozitivnih staničnih populacija kako bi se razjasnile uočene razlike u citotoksičnom odgovoru. Stoga su analizirane CD8+GNLY+ i CD56+GNLY+ stanice, kao i CD8+PRF+ i CD56+PRF+ stanice, pri čemu je izražaj svake populacije procijenjen kao ukupni zbroj stanica prisutnih u epidermisu i dermisu lezija i perilezijske kože vitiliga i halo nevusa.

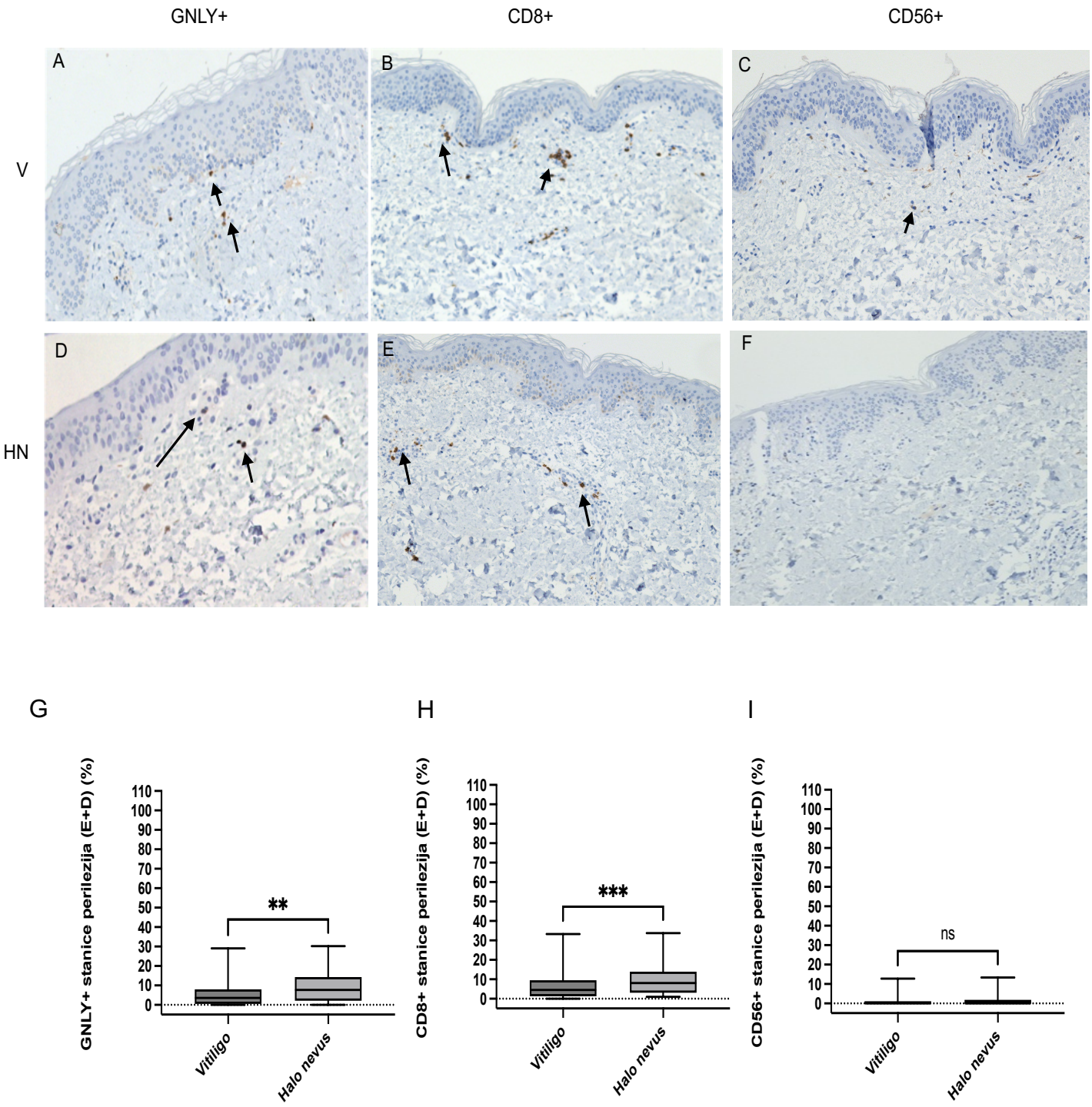
Dodatno je analiziran i ukupni izražaj CD68+PRF-2+ stanica u lezijama i perilezijskoj koži vitiliga i halo nevusa, s ciljem procjene uloge stanica monocitno-makrofagne linije u lokalnim imunološkim zbivanjima. Ovakav integrirani pristup omogućio je sveobuhvatnu usporedbu izvršnih citotoksičnih mehanizama u vitiligu i halo nevusu, uzimajući u obzir ukupni izražaj citotoksičnih molekula i njihovu staničnu pripadnost unutar upalnog infiltrata.

4.4.1. *Usporedba ukupnog izražaja molekule GNLY, CD8+ i CD56+ stanica u lezijama i perilezijskoj koži vitiliga i halo nevusa*

Nakon pojedinačne analize izražaja citotoksičnih molekula te stanica upalnog infiltrata koje ujedno ispoljavaju ispitivane citotoksične molekule u lezijama vitiliga i halo nevusa u odnosu na perilezijsku i zdravu kožu, uslijedila je usporedba izražaja molekule GNLY, CD8+ i CD56+ stanica u lezijama i perilezijskoj koži vitiliga i halo nevusa. Izražaj molekule GNLY, CD8+ limfocita T i CD56+ stanica NK analiziran je u epidermisu i dermisu lezija i perilezijske kože vitiliga i halo nevusa (slika 41 i 42). U lezijama vitiliga je u odnosu na halo nevus opažen značajno manji broj GNLY+ stanica koje su pretežno smještene u papilarnom sloju dermisa, a rjeđe su u bazalnom sloju epidermisa (slika 41A i D). Izrazito jak upalni infiltrat CD8+ limfocita T uočen je u dermisu lezija halo nevusa gdje okružuje gnijezda nevus stanica, dok je u lezijama vitiliga upalni infiltrat CD8+ limfocita T nešto rjeđi (slika 41B i E). U lezijama halo nevusa zapažen je i veći broj CD56+ stanica u odnosu na kožu lezija vitiliga (slika 41C i F). Usporedbom kvantitativnog izražaja GNLY+ stanica u leziji pacijenata s vitiligom i halo nevusom, uočen je statistički značajno veći udio GNLY+ stanica u leziji halo nevusa u odnosu na leziju vitiliga ($p<0,0001$) (slika 41G). Sličan obrazac uočen je i usporedbom izražaja CD8+ stanica, gdje je veći udio CD8+ limfocita T zapažen u leziji halo nevusa u odnosu na leziju vitiliga ($p<0,0001$) (slika 41H). Udio CD56+ stanica također je bio statistički značajno veći u leziji halo nevusa u odnosu na leziju vitiliga ($p<0,0001$) (slika 42I). Slične razlike u izražaju molekule GNLY, CD8+ i CD56+ stanica, no ipak u mnogo manjoj mjeri, uočene su i usporedbom perilezijske kože halo nevusa i vitiliga. U perilezijskoj koži vitiliga uočen je značajno manji broj GNLY+ (slika 42A i D) i CD8+ (slika 42B i E) stanica u odnosu na perilezijsku kožu halo nevusa. Rijedak upalni infiltrat CD56+ stanica utvrđen je u perilezijskoj koži vitiliga i halo nevusa (slika 42C i F). Usporedbom kvantitativnog izražaja GNLY+ stanica perilezijske kože vitiliga s perilezijskom kožom halo nevusa, uočen je statistički značajno veći udio GNLY+ stanica u perilezijskoj koži halo nevusa u odnosu na perilezijsku kožu vitiliga ($p<0,01$) (slika 42G). Sličan obrazac uočen je i usporedbom izražaja CD8+ stanica, gdje je veći udio CD8+ limfocita T nađen u perilezijskoj koži halo nevusa u odnosu na perilezijsku kožu vitiliga ($p<0,001$) (slika 42H). Udio CD56+ stanica također je bio nešto veći u perilezijskoj koži halo nevusa u odnosu na perilezijsku kožu vitiliga, no bez statistički značajne razlike (slika 42I).



Slika 41. Imunohistokemijski prikaz GNLY+, CD8+ i CD56+ stanice u: (A, B, C) leziji vitiliga, (D,E,F) leziji halo nevusa (povećanje 200x). GNLY+, CD8+ i CD56+ stanice su obilježene smeđom bojom. GNLY+, CD8+ i CD56+ stanice su bile brojnije u leziji halo nevusa (D), nego u leziji vitiliga (A). **Kvantitativna analiza izražaja (G) GNLY+, (H) CD8+ i (I) CD56+ stanica u leziji vitiliga i halo nevusa.** ****p<0,0001

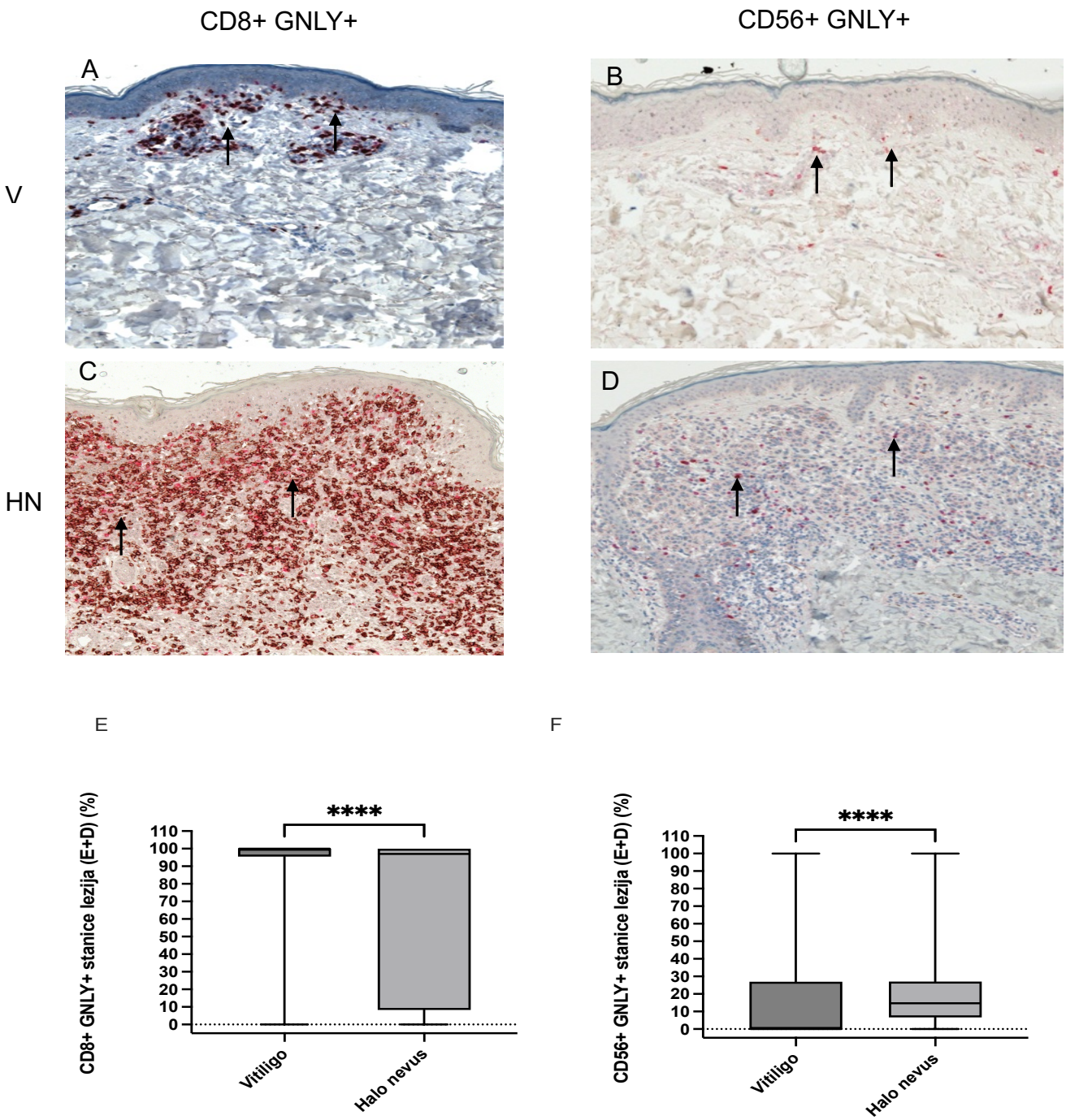


Slika 42. GNLY+, CD8+ i CD56+ stanice u: (A, B, C) perilezijskoj koži vitiliga, (D,E,F) perilezijskoj koži halo nevusa (povećanje 200x). GNLY+, CD8+ i CD56+ stanice su obilježene smeđom bojom. GNLY+, CD8+ i CD56+ stanice bile su brojnije u perilezijskoj koži halo nevusa (D,E,F), nego u perilezijskoj koži vitiliga (A,B,C). **Kvantitativna analiza izražaja (G) GNLY+, (H) CD8+ i (I) CD56+ stanica u perileziji vitiliga i halo nevusa.** ***p<0,001, **p<0,01**,** ns-nije značajno

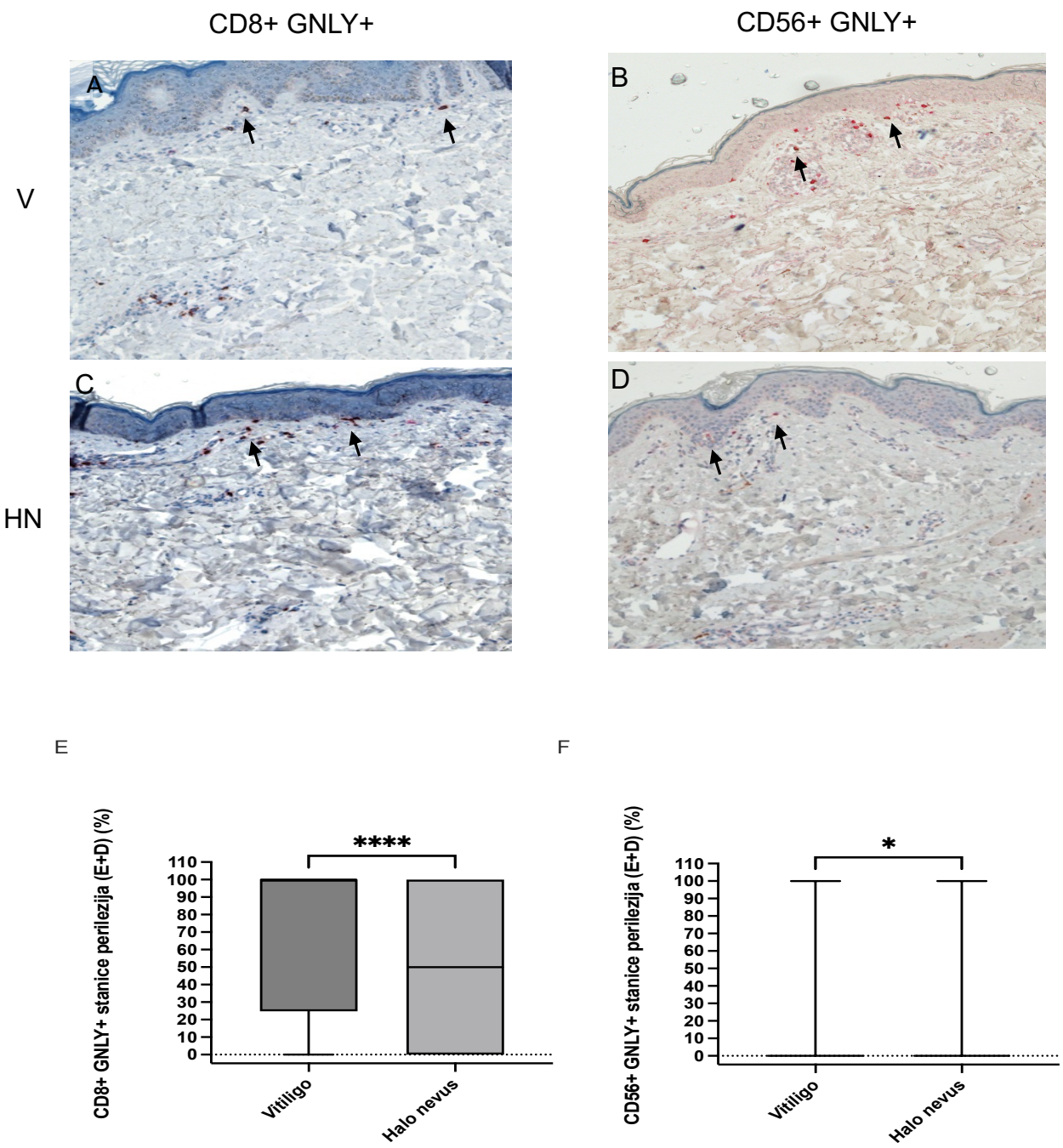
4.4.2. *Usporedba izražaja dvostruko pozitivnih CD8+GNLY+ i CD56+GNLY+ stanica u lezijama i perilezijskoj koži vitiliga i halo nevusa*

Nakon usporedbe izražaja citotoksičnih molekula te stanica upalnog infiltrata u lezijama i perilezijskoj koži vitiliga i halo nevusa uslijedila je usporedba izražaja dvostruko pozitivnih CD8+GNLY+ i CD56+GNLY+ stanica u lezijama i perilezijskoj koži vitiliga i halo nevusa. Usporedba izražaja dvostruko pozitivnih CD8+GNLY+ i CD56+GNLY+ stanica uključila je epidermis i dermis lezija te perilezijske kože vitiliga i halo nevusa (slika 43 i 44). Iako je u lezijama vitiliga uočen manji broj GNLY+ i CD8+ stanica u odnosu na lezije halo nevusa, broj dvostruko pozitivnih CD8+GNLY+ stanica bio je veći u lezijama vitiliga nego u lezijama halo nevusa (slika 43A i C). Suprotno je uočeno analizom udjela CD56+GNLY+ stanica koje su u značajno većem broju zastupljene u lezijama halo nevusa u odnosu na lezije vitiliga (slika 43B i D). Usporedbom sveukupnog kvantitativnog izražaja dvostruko pozitivnih CD8+GNLY+ stanica u leziji pacijenata s vitiligom i halo nevusom, uočen je statistički značajno veći udio CD8+GNLY+ stanica u leziji vitiliga u odnosu na leziju halo nevusa ($p<0,0001$) (slika 43E). Suprotno tome, analizom izražaja CD56+GNLY+ stanica opažen je veći udio CD56+GNLY+ stanica u leziji halo nevusa u odnosu na leziju vitiliga ($p<0,0001$) (slika 43F).

U perilezijskoj koži vitiliga uočeno je nešto više CD8+GNLY+ stanica u odnosu na perilezijsku kožu halo nevusa (slika 44A i C). Rjeđi, no ipak izraženiji upalni infiltrat CD56+GNLY+ stanica uočen je u perilezijskoj koži vitiliga u odnosu na perilezijsku kožu halo nevusa (Slika 44B i D). Usporedbom kvantitativnog izražaja CD8+GNLY+ stanica perilezijske kože vitiliga s perilezijskom kožom halo nevusa, uočen je statistički značajno veći udio CD8+GNLY+ stanica u perilezijskoj koži vitiliga nego u perilezijskoj koži halo nevusa ($p<0,0001$) (slika 44E). Sličan obrazac uočen je i usporedbom izražaja CD56+GNLY+ u perilezijskoj koži obje skupine ispitanika gdje je veći udio CD56+GNLY+ stanica nađen u perilezijskoj koži vitiliga u odnosu na perilezijsku kožu halo nevusa ($p<0,05$) (slika 44F).



Slika 43. CD8+GNLY+ i CD56+GNLY+ stanica u (A,B) leziji vitiliga i (C,D) halo nevusa (povećanje 200x). CD8+GNLY+ i CD56+ GNLY + stanice su obilježene smeđom i crvenom bojom. CD8+GNLY+ i CD56+GNLY+ stanice su bile brojnije u leziji vitiliga, nego u leziji halo nevusa. **Postotak CD8+GNLY+ i CD56+GNLY+ stanica među stanicama: (E,F) epidermisa i dermisa lezije vitiliga i halo nevusa.** ****p<0,0001

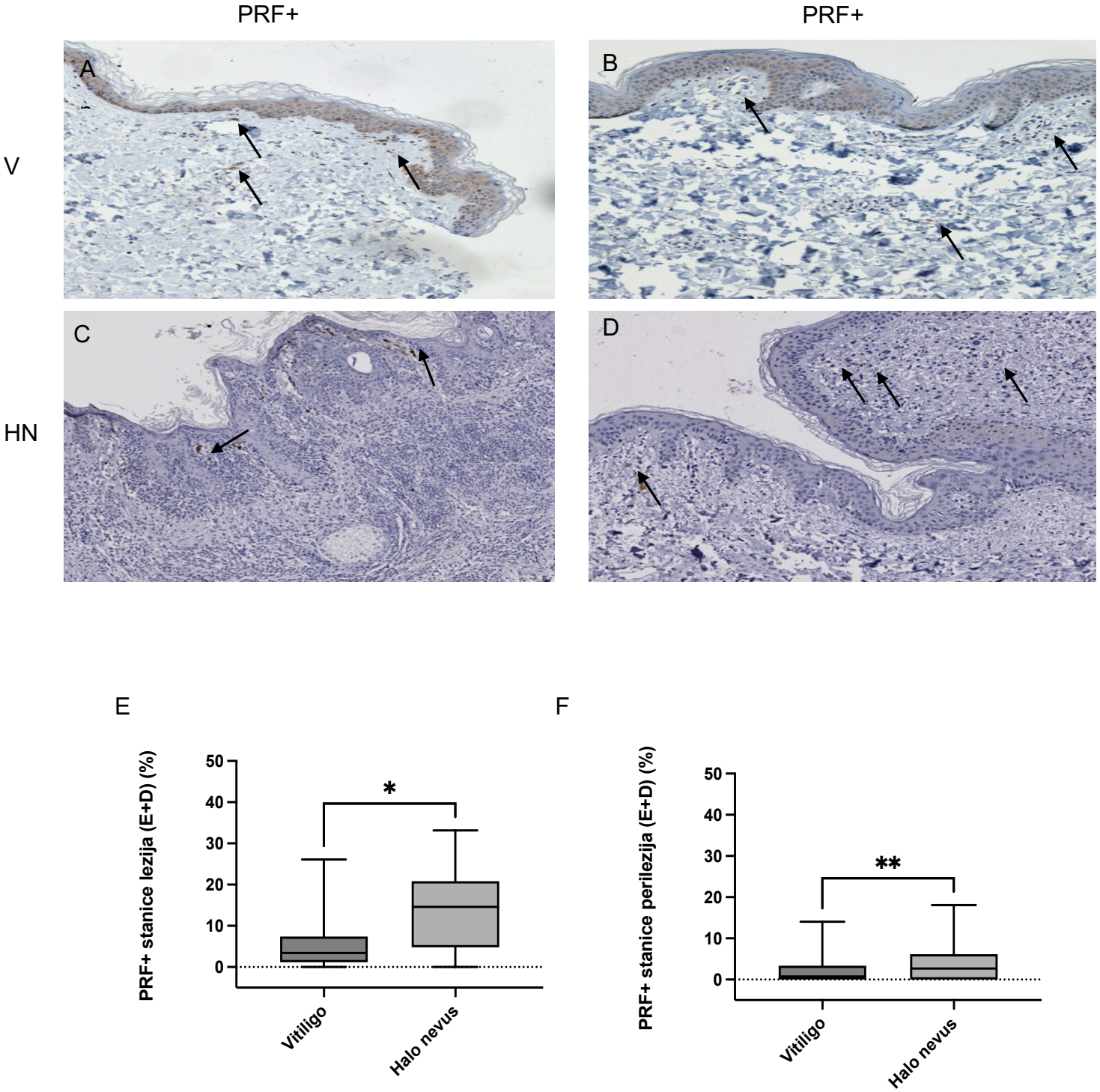


Slika 44. (A,C) CD8+GNLY+ i (B,D) CD56+GNLY+ stanica u perilezijskoj koži vitiliga i halo nevusa (povećanje 200x). CD8+ GNLY + i CD56+ GNLY + stanice su obilježene preklapanjem crvene i smeđe boje. CD8+GNLY+ i CD56+GNLY+ stanice su bile brojnije u perileziji vitiliga, nego u perileziji halo nevusa. **Kvantitativna analiza prikazana je u (E) kao postotak CD8+GNLY+ stanica unutar CD8+ subpopulacije te u (F) kao postotak CD56+GNLY+ stanica unutar CD56+ subpopulacije u epidermisu i dermisu perilezijske kože vitiliga i halo nevusa.******p<0,0001; *p<0,05.

4.4.3. *Usporedba izražaja molekule perforina u lezijama i perilezijskoj koži vitiliga i halo nevusa*

Nakon pojedinačne analize izražaja molekule perforina te stanica upalnog infiltrata koje istodobno ispoljavaju ispitivanu citotoksičnu molekulu u lezijama i perilezijskoj koži vitiliga i halo nevusa, provedena je usporedba izražaja perforina između ovih dviju bolesti (slika 45). U lezijama vitiliga, u usporedbi s lezijama halo nevusa, utvrđen je statistički značajno manji broj PRF+ stanica, koje su pretežno bile smještene u papilarnom sloju dermisa (slika 45A i C). Sličan obrazac izražaja molekule perforina uočen je i u perilezijskoj koži, pri čemu je udio PRF+ stanica bio manji u perilezijskoj koži vitiliga u odnosu na perilezijsku kožu halo nevusa (slika 45B i D).

Usporedbom ukupnog kvantitativnog izražaja PRF+ stanica u lezijama pacijenata s vitiligom i halo nevusom utvrđen je statistički značajno veći udio PRF+ stanica u lezijama halo nevusa u odnosu na leziju vitiliga ($p<0,05$) (slika 45E). Također, usporedbom kvantitativnog izražaja PRF+ stanica u perilezijskoj koži vitiliga i halo nevusa, zabilježen je statistički značajno veći udio PRF+ stanica u perilezijskoj koži halo nevusa u odnosu na perilezijsku kožu vitiliga ($p<0,01$) (slika 45F).



Slika 45. PRF+ stanice u: (A,C) leziji vitiliga i halo nevusa, (B,D) perilezijskoj koži vitiliga i halo nevusa (povećanje 200x). PRF+ stanice su obilježene smeđom bojom. PRF+ stanice su bile brojnije u leziji halo nevusa (C), nego u leziji vitiliga (A). U perilezijskoj koži halo nevusa (D) značajno je veći postotak PRF+ stanica u odnosu na perilezijsku kožu vitiliga (B). **Postotak PRF+ stanica među stanicama: (E) epidermisa i dermisa lezije vitiliga i halo nevusa; (F) epidermisa i dermisa perilezijske kože vitiliga i halo nevusa.** *p<0,05, **p<0,01

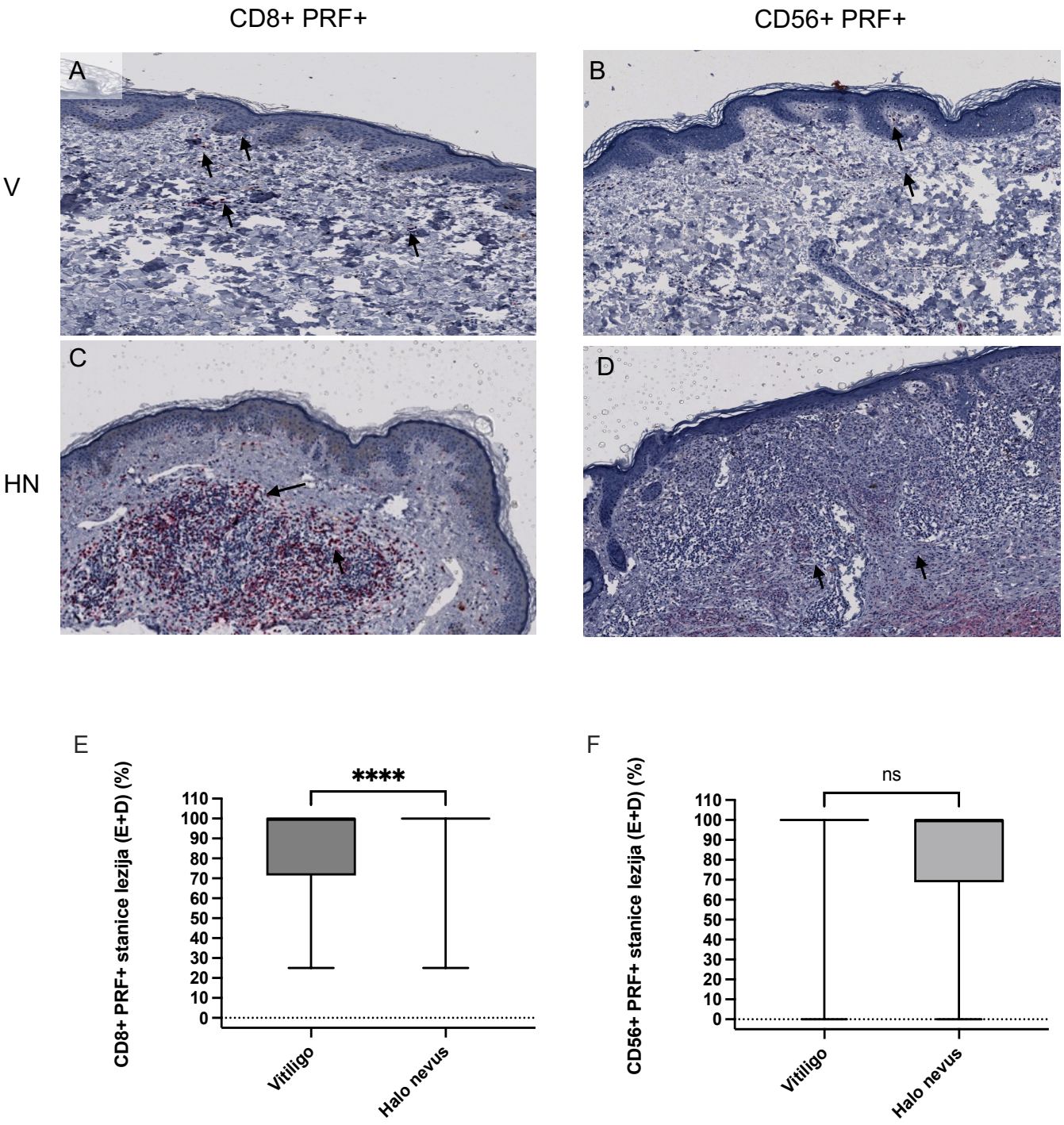
4.4.4. *Usporedba izražaja dvostruko pozitivnih CD8+PRF+ i CD56+PRF+ stanica u lezijama i perilezijskoj koži vitiliga i halo nevusa*

Nakon usporedbe izražaja perforina u lezijama i perilezijskoj koži vitiliga i halo nevusa uslijedila je usporedba izražaja dvostruko pozitivnih CD8+PRF+ i CD56+PRF+ stanica u lezijama i perilezijskoj koži oboljelih (slike 46 i 47). U lezijama vitiliga uočen je slabije izražen upalni infiltrat PRF+ i CD8+ stanica u odnosu na lezije halo nevusa, međutim udio dvostruko pozitivnih CD8+PRF+ stanica bio je viši u lezijama vitiliga nego u lezijama halo nevusa (slika 46A i 46C). Analizom izražaja dvostruko pozitivnih CD56+PRF+ stanica u lezijama vitiliga i halo nevusa nije utvrđena razlika u udjelu CD56+PRF+ stanica između dviju ispitivanih skupina (slika 46B i D).

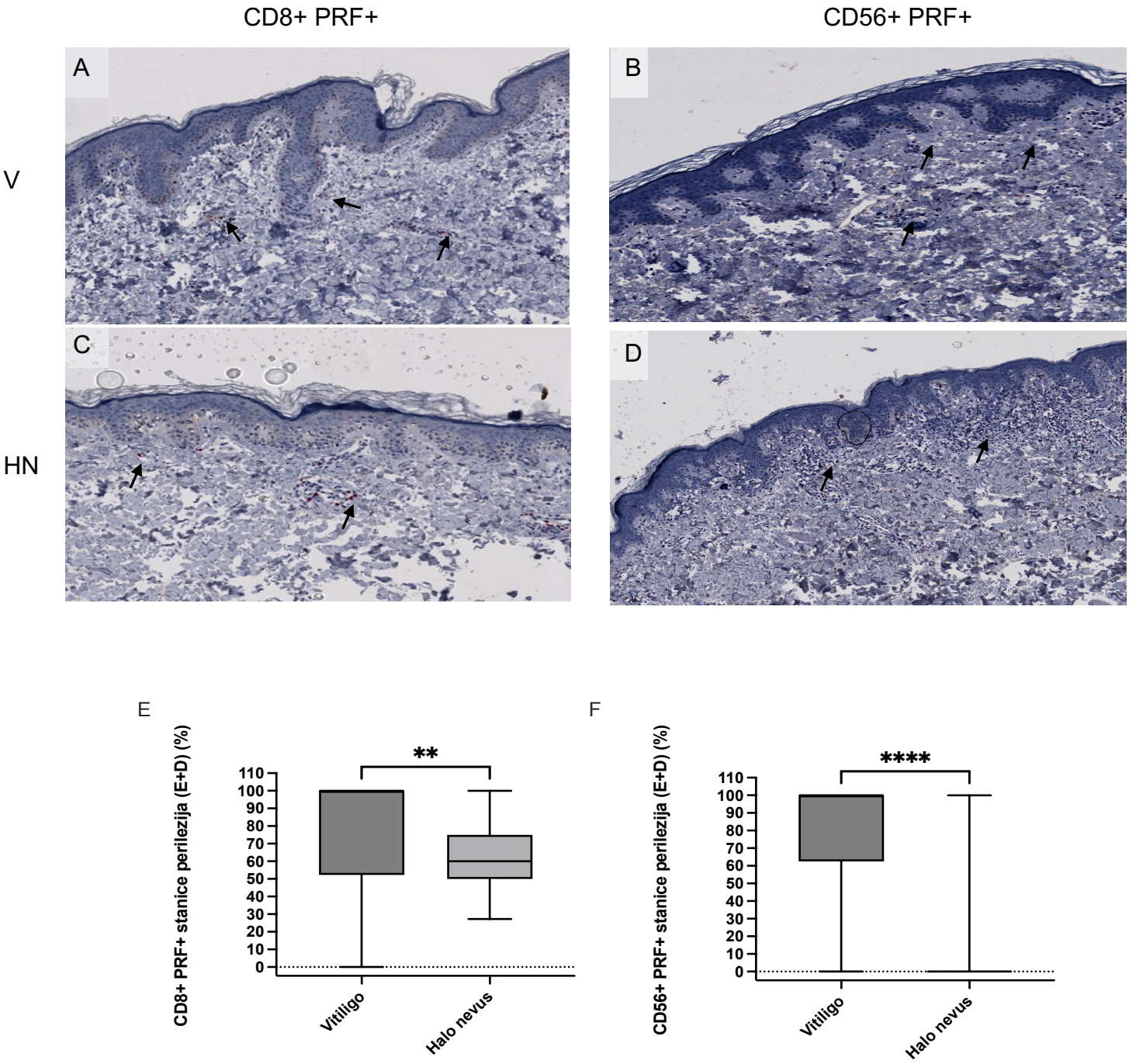
Kvantitativnom analizom ukupnog izražaja ispitivanih stanica u lezijama pacijenata s vitiligom i halo nevusom, utvrđen je statistički značajno veći udio CD8+PRF+ stanica u lezijama vitiliga u usporedbi s lezijama halo nevusa ($p<0,0001$) (slika 46E). Suprotno tome, kvantitativnom analizom dvostruko pozitivnih CD56+PRF+ stanica u lezijama vitiliga i halo nevusa nije utvrđena statistički značajna razlika u njihovu udjelu između dviju ispitivanih skupina (slika 46F).

U perilezijskoj koži vitiliga uočen je izraženiji upalni infiltrat dvostruko pozitivnih CD8+PRF+ stanica u usporedbi s perilezijskom kožom halo nevusa (slika 47A i C). Sličan obrazac uočen je i analizom dvostruko pozitivnih CD56+PRF+ stanica u perilezijskoj koži, gdje je u perilezijskoj koži vitiliga zabilježen izraženiji upalni infiltrat u usporedbi s perilezijskom kožom halo nevusa (slika 47B i D).

Kvantitativnom analizom perilezijske kože u obje skupine, potvrđen je statistički značajno veći udio CD8+PRF+ stanica u perilezijskoj koži vitiliga u odnosu na perilezijsku kožu halo nevusa ($p<0,01$) (slika 47E). Sličan obrazac uočen je i analizom dvostruko pozitivnih CD56+PRF+ stanica gdje je u perilezijskoj koži vitiliga zabilježen statistički značajno veći upalni infiltrat CD56+PRF+ u usporedbi s perilezijskom kožom halo nevusa ($p<0,0001$) (slika 47F).



Slika 46. CD8+PRF+ i CD56+PRF+ stanice u: (A,B) leziji vitiliga i (C,D) halo nevusa. CD8+PRF+ i CD56+PRF+ stanice pokazuju preklapanje crvene (CD8 ili CD56, Fast Red) i smeđe (PRF, DAB) boje. Dvostruko pozitivne CD8+PRF+ stanice su bile brojnije u leziji vitiliga, nego u leziji halo nevusa. **Kvantitativna analiza prikazana je u (E) za CD8+PRF+ stanice te u (F) za CD56+PRF+ stanice u epidermisu i dermisu lezije vitiliga i halo nevusa.** ****p<0,0001, ns-nije značajno

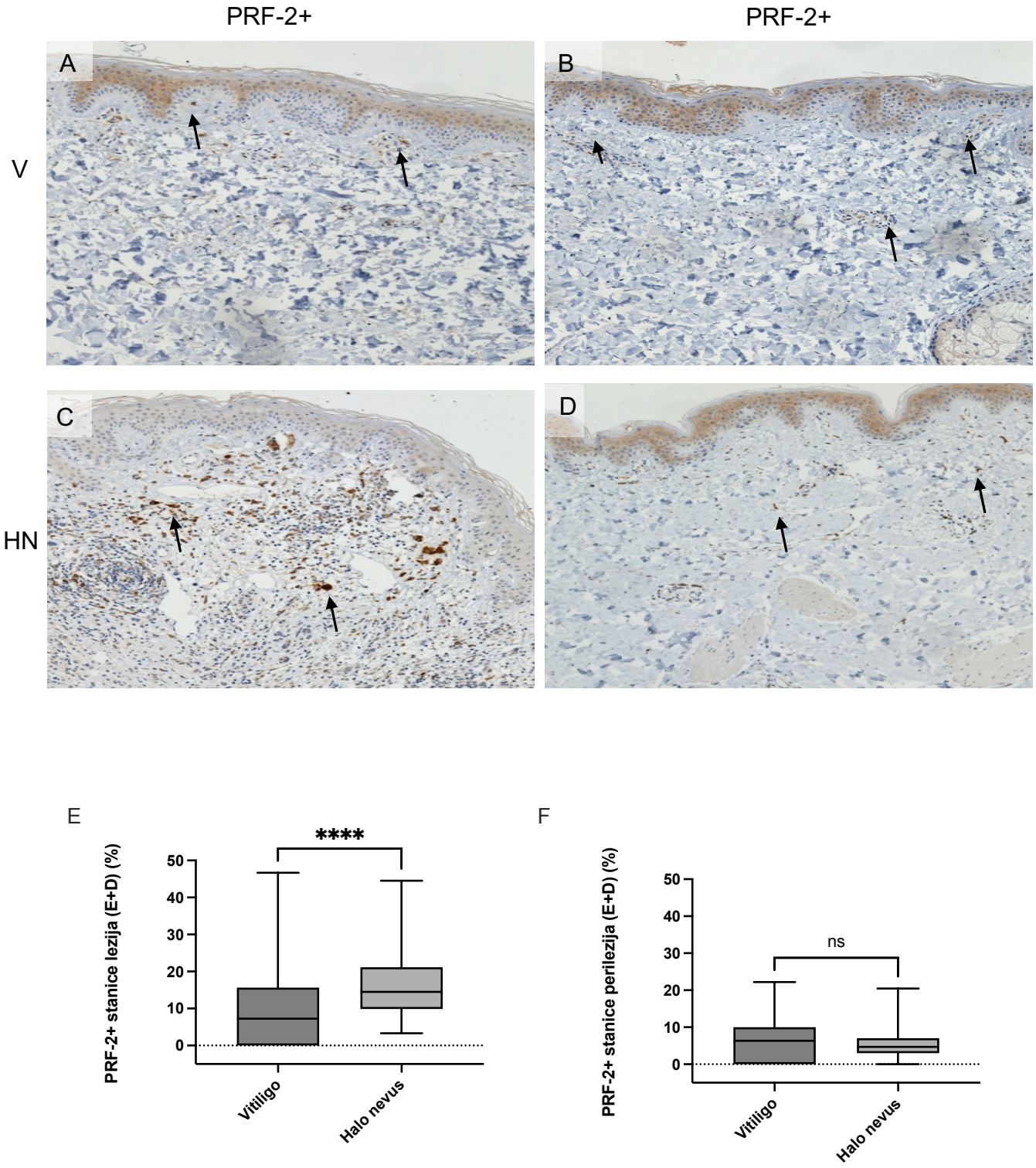


Slika 47. (A,C) CD8+PRF+ stanice u perilezijskoj koži vitiliga i halo nevusa te (B,D) CD56+PRF+ stanice u perilezijskoj koži vitiliga i halo nevusa (povećanje 200x). CD8+PRF+ i CD56+PRF+ stanice obilježene su preklapanjem crvene (CD8 ili CD56, Fast Red) i smeđe (PRF, DAB) boje. Utvrđen je statistički značajno viši postotak CD8+PRF+ i CD56+PRF+ stanica u perileziji vitiliga, nego u perileziji halo nevusa. **Postotak CD8+PRF+ unutar CD8+ subpopulacije: (E) epidermisa i dermisa u perilezijskoj koži vitiliga i halo nevusa; postotak CD56+PRF+ stanica unutar CD56+ subpopulacije (F) epidermisa i dermisa perilezijske kože vitiliga i halo nevusa.** **p<0,01, ****p<0,0001

4.4.5. *Usporedba izražaja molekule PRF-2 u lezijama i perilezijskoj koži vitiliga i halo nevusa*

Nakon pojedinačne analize izražaja molekule PRF-2 te stanica upalnog infiltrata koje ujedno ispoljavaju tu molekulu u lezijama vitiliga i halo nevusa, uspoređen je njezin izražaj u lezijama i perilezijskoj koži obje skupine ispitanika (slika 48). U lezijama vitiliga je u odnosu na halo nevus opažen značajno manji broj PRF-2+ stanica koje su poglavito smještene u papilarnom sloju dermisa (slika 48A i C). Suprotan obrazac u izražaju molekule PRF-2 uočen je usporedbom perilezijske kože halo nevusa i vitiliga. U perilezijskoj koži vitiliga uočen je nešto veći broj PRF-2+ stanica u odnosu na perilezijsku kožu halo nevusa (slika 48B i D).

Kvantitativnom analizom ukupnog izražaja PRF-2+ stanica u leziji pacijenata s vitiligom i halo nevusom, uočen je statistički značajno veći udio PRF-2+ stanica u leziji halo nevusa u odnosu na leziju vitiliga ($p<0,0001$) (slika 48E). Usporedbom kvantitativnog izražaja PRF-2+ stanica perilezijske kože vitiliga i halo nevusa, uočen je veći udio PRF-2+ stanica u perilezijskoj koži vitiliga u odnosu na perilezijsku kožu halo nevusa, međutim ta razlika nije bila statistički značajna (slika 48F).

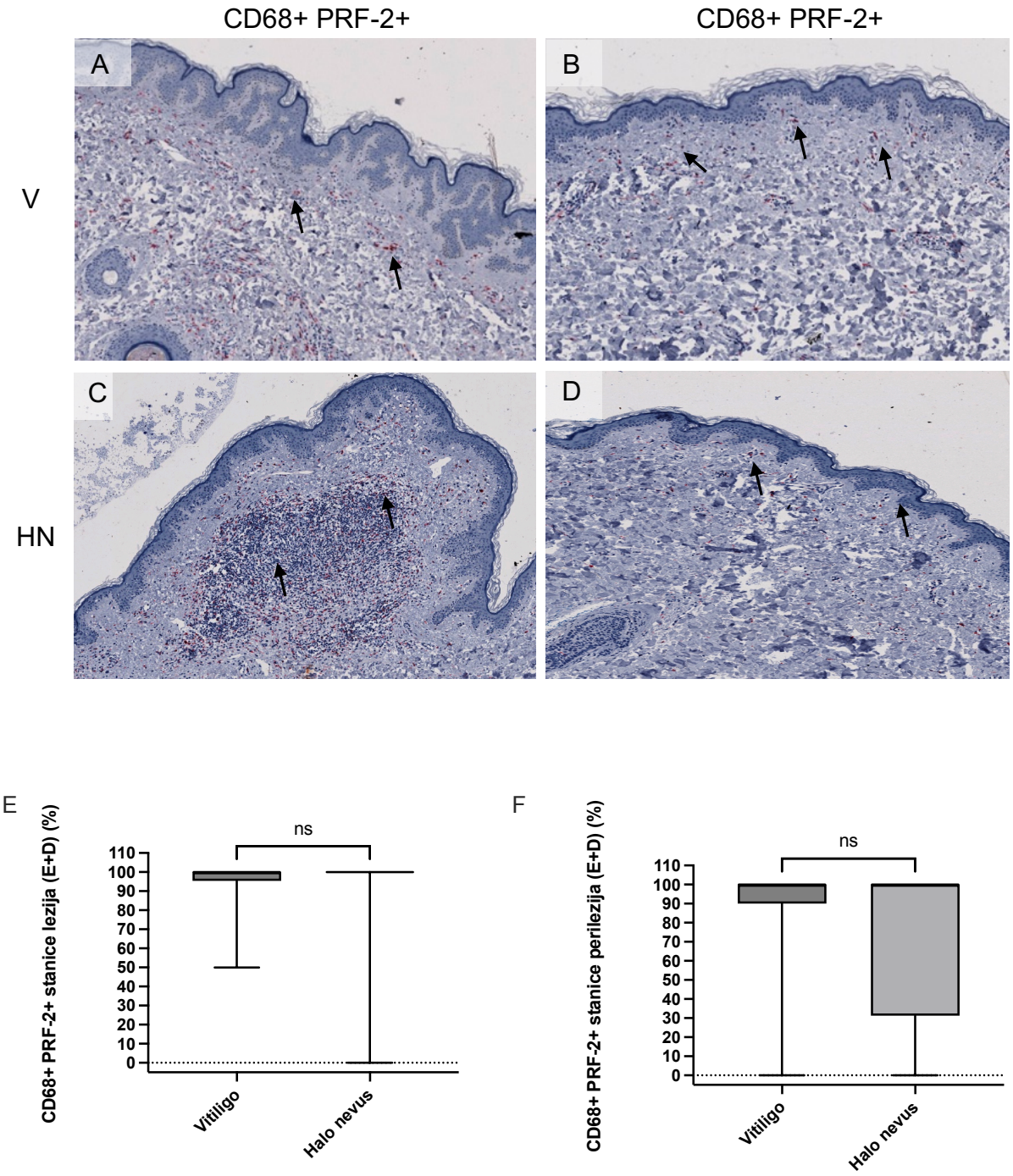


Slika 48. PRF-2+ stanice u: (A,C) leziji vitiliga i halo nevusa, (B,D) perilezijskoj koži vitiliga i halo nevusa (povećanje 200x). PRF-2+ stanice su obilježene smeđom bojom. U lezijama halo nevusa utvrđen je statistički značajno viši postotak PRF-2+ stanica u odnosu na lezije vitiliga. **Postotak PRF-2+ stanica među stanicama: (E) epidermisa i dermisa lezije vitiliga i halo nevusa; (F) epidermisa i dermisa perilezijske kože vitiliga i halo nevusa.** ****p<0,0001; ns-nije značajno

4.4.6. *Usporedba izražaja dvostruko pozitivnih CD68+PRF-2+ stanica u lezijama i perilezijskoj koži vitiliga i halo nevusa*

Nakon usporedbe izražaja molekule PRF-2 u lezijama i perilezijskoj koži vitiliga i halo nevusa, provedena je i usporedba izražaja dvostruko pozitivnih CD68+PRF-2+ stanica u lezijama i perilezijskoj koži oboljelih (slika 51). Usporedbom lezija vitiliga i halo nevusa nije utvrđena statistički značajna razlika u udjelu CD68+PRF-2+ stanica između ovih skupina (slika 51A i C). Sličan obrazac uočen je i analizom perilezijske kože, gdje također nije bilo razlike u udjelu CD68+PRF-2+ stanica između perilezijske kože vitiliga i halo nevusa (slika 51B i D).

Usporedbom ukupnog kvantitativnog izražaja dvostruko pozitivnih CD68+PRF-2+ stanica u lezijama pacijenata s vitiligom i halo nevusom nije utvrđena statistički značajna razlika u učestalosti CD68+PRF-2+ stanica između ovih dviju skupina (slika 51E). Također, nije utvrđena statistički značajna razlika u ukupnom udjelu CD68+PRF-2+ stanica u perilezijskoj koži vitiliga u usporedbi s perilezijskom kožom halo nevusa (slika 51F).



Slika 49. CD68+PRF-2+ u: (A,C) leziji vitiliga i halo nevusa, (B,D) perilezijskoj koži vitiliga i halo nevusa (povećanje 200x). Dvostruko pozitivne CD68+PRF-2+ stanice vidljive su kao kombinacija smeđe (PRF-2) i crvene (CD68) boje. **Kvantitativna analiza ukupnog izražaja CD68+PRF-2+ stanica unutar subpopulacije makrofaga (CD68+) u (E) epidermisu i dermisu lezije vitiliga i halo nevusa; (F) epidermisu i dermisu perilezijske kože vitiliga i halo nevusa.** ns-nije značajno

5. RASPRAVA

Vitiligo je kronična, upalna, imunosno posredovana bolest kože od koje boluje oko 0,5-2% svjetske populacije, a klinički se očituje pojavom oštro ograničenih depigmentiranih makula. Iako se javlja podjednako u oba spola, bolest se najčešće pojavljuje u dječjoj i mlađoj odrasloj dobi (1,4,161). Bolest može imati značajan utjecaj na kvalitetu života oboljelih, te pacijenti često doživljavaju stigmatizaciju, socijalnu izolaciju i imaju nisko samopoštovanje (3). Etiopatogenetski, riječ je o multifaktorijalnoj bolesti koja nastaje složenim međudjelovanjem genetičkih i okolišnih čimbenika (161,162). Dosadašnjim je istraživanjima otkriven velik broj gena povezanih s razvojem vitiliga, ponajprije onih uključenih u regulaciju urođenog i stečenog imunosnog odgovora, melanogenezu i procese programirane stanične smrti, što snažno podupire hipotezu o imunosno posredovanoj citotoksičnoj destrukciji melanocita kao središnjem patogenetskom mehanizmu bolesti (62,162). Također je sve jasnije da razaranje melanocita nije posljedica jednog izoliranog mehanizma, nego rezultat koordinirane aktivacije različitih imunosnih putova (23,33).

Središnje mjesto u imunopatogenezi vitiliga zauzima IFN-γ–ovisna upalna os, koja povezuje urođeni i stečeni imunosni odgovor. Aktivacija dendritičkih stanica, stanica NK i ILC-1 dovodi do pojačanog lučenja IFN-γ, što potiče izražaj kemokina CXCL9 i CXCL10 koji privlače i usmjeravaju autoreaktivne CD8+ stanice u kožu (18,23,163). Nadalje, CXCL10, osim svoje kemotaktičke uloge, može izravno potaknuti apoptozu melanocita putem receptora CXCR3B, čime dodatno doprinosi uništavanju melanocita (40,42,164,165). Pojačana prisutnost CD56+ stanica NK u lezijama vitiliga, ali i u perilezijskoj koži, uočena u našim istraživanjima (slika 8 i 9), upućuje na značajnu ulogu urođenog imunološkog odgovora u ranim fazama bolesti i nastanku klinički vidljivih promjena. Ovi rezultati su u skladu s istraživanjima drugih autora koja opisuju povišenu sustavnu i lokalnu aktivnost stanica NK u vitiligu (41,42), koja se očituje povećanim izražajem receptora stanica NK i lučenjem proupalnih medijatora u perilezijskoj koži (60) (42,65). Stoga naši rezultati, u skladu s nalazima drugih autora, podupiru pretpostavku da je i perilezijska koža, a ne samo lezija, područje pojačane aktivnosti urođenog imunološkog sustava, ključne za širenje bolesti te razumijevanje i rane faze vitiliga.

Kod pacijenata s vitiligom uočen je povišen izražaj kemokina CXCL9 i CXCL10 te njima pridruženog receptora CXCR3. Također je pokazano da su razine CXCL9 i CXCL10 u korelaciji s aktivnošću bolesti, a izražaj CXCL10 povezan je i s težinom bolesti (40,68). Do sada je poznato da, kao odgovor na oksidativni stres i DAMP molekule poput HSP70 i HMGB1, stanice NK u pacijenata s vitiligom pojačano luče IFN-γ, što uzrokuje aktivaciju keratinocita i melanocita te potiče lučenje proupalnih kemokina CXCL9, CXCL10, CXCL11 i dodatnog IFN-γ. Ovaj proupalni mikrookoliš bogat kemokinima potiče privlačenje i aktivaciju ostalih citotoksičnih CD8+ limfocita T u lezijama vitiliga, čime se pokreće snažan protumelanocitni imunosni odgovor (42).

Smještaj CD56+ stanica NK, poglavito u papilarnom dermisu te manje u epidermisu lezija vitiliga (slika 8), upućuje na njihovu moguću ulogu u regulaciji lokalnog upalnog odgovora i interakciji s drugim imunosnim i neimunosnim stanicama kože. Međutim naše spoznaje o povećanoj učestalosti citotoksičnih CD56+ stanica NK zabilježenoj i u epidermalnom odjeljku u blizini melanocita upućuju na moguću izravnu citotoksičnu aktivnost ovih stanica prema melanocitima u ranoj fazi vitiliga (slika 9).

Infiltrati limfocita T, poglavito CD8+ fenotipa nađeni su u lezijama kože pacijenata s vitiligom (67,90) uz povećan izražaj citotoksičnih biljega, uključujući granzim B, PRF, FasL, IFN-γ i TNF-α (69,70). Nedavno je također utvrđeno da se nakon stimulacije specifičnim melanocitnim antigenom, CD8+ limfociti T aktiviraju u lezijama vitiliga što je praćeno uzlaznom regulacijom citolitičkih molekula, granzima B i PRF-a (70). U našem smo istraživanju također uočili povećan udio CD8+ limfocita T u lezijama i perilezijskoj koži pacijenata s vitiligom. Gust upalni infiltrat CD8+ limfocita T opažen je u dermisu lezija vitiliga, većinom u papilarnom sloju i u vršcima dermalnih papila, a manje u bazalnom sloju epidermisa. U lezijama vitiliga uočen je značajno veći broj CD8+ stanica nego u perilezijskoj koži pacijenata s vitiligom gdje je utvrđen sličan obrazac izražaja, ali ipak s manjim udjelom CD8+ limfocita T smještenih poglavito u papilarnom sloju dermisa. Dakle, naši rezultati ukazuju na to da CD8+ limfociti T ne djeluju isključivo u središtu lezija, već je i perilezijska koža imunološki aktivna i može sudjelovati u ranoj fazi širenja autoimunog upalnog odgovora.

Aktivirani CD8+ limfociti T i CD56+ NK stanice, kao ključne izvršne stanice u patogenezi vitiliga, putem stanične citotoksičnosti posreduju programiranu staničnu smrt melanocita (18,67). Citotoksičnost ovisna o granulama omogućava im sintezu i

oslobađanje citolitičkih molekula, uključujući PRF granzime i GNLY, čime se potiče apoptoza ciljnih stanica (108). Osim PRF-a i GNLY-a, PRF-2 se također ubraja u skupinu proteina koji stvaraju pore u membranama te služe kao izvršne molekule u posredovanju stanične smrti (108,166).

GNLY je konstitutivno izražen u gotovo svim podskupinama stanica NK, CD8+ limfocita T, NKT stanica i Vδ2+ γδ stanica T, dok je u CD4+ stanicama T prisutan u manjoj mjeri (120). U citotoksičnim je stanicama GNLY pohranjen u obliku dviju izoforma, 9 kDa i 15 kDa, koje imaju različite uloge. GNLY 9 kDa vrši klasičnu citotoksičnu i antimikrobnu funkciju, dok 15 kDa GNLY utječe na sazrijevanje antigen-predočnih stanica i migraciju imunoloških populacija, a njegov mogući citotoksični učinak još nije u potpunosti razjašnjen (120). GNLY sudjeluje u imunološkom odgovoru na različite patogene, uključujući bakterije, parazite, gljive i protozoe, ali također ima višestruke regulatorne uloge (123). Primjerice, GNLY se koristi kao biomarker za odbacivanje transplantata, a serumske koncentracije GNLY-a u korelaciji su s težinom reakcije presatka protiv domaćina (122).

Molekula GNLY također je uključena u patogenezu brojnih kožnih bolesti, uključujući Stevens-Johnsonov sindrom, alopeciju areatu, lichen planus i psorijazu (122,124,125). U lezijama lichen planusa GNLY pokazuje citotoksični učinak te ima ključnu ulogu u pokretanju apoptoze bazalnih keratinocita (167). U pacijenata s alopecijom areatom zabilježena je povišena razina GNLY-a u serumu koja korelira s težinom bolesti, stoga GNLY može predstavljati biološki biljeg aktivnosti bolesti (14). Vičić i sur. nedavno su pokazali ushodnu regulaciju GNLY+ stanica u perifernoj krvi i lezijama pacijenata sa psorijazom, uz pozitivnu korelaciju s težinom bolesti (125).

U perifernoj krvi pacijenata s vitiligom također je zabilježena povišena razina GNLY (40), no u literaturi ne postoje podaci o lokalnom, *in situ* izražaju GNLY-a u koži tih bolesnika. Stoga naši rezultati o prisutnosti i raspodjeli GNLY-a u lezijama i perilezijskoj koži pacijenata s vitiligom, predstavljaju prvi korak prema razumijevanju uloge GNLY-a u patogenezi ove bolesti.

U našem smo istraživanju po prvi put ispitali lokalni izražaj GNLY-a u lezijama i perilezijskoj koži pacijenata s vitiligom kako bi odgovorili na pitanje posreduju li GNLY+ stanice apoptozu melanocita u ovoj bolesti. Također smo pokazali značajno veći udio

GNLY+ stanica u dermalnom odjeljku lezija, ali i perilezijskoj koži vitiliga (slika 6 i 7) u odnosu na zdravu kožu kontrolnih ispitanika (slika 7), i to poglavito u gornjim slojevima papilarnog dermisa u neposrednoj blizini melanocita, a manje u bazalnom sloju epidermisa. Takva prostorna distribucija i nakupljanje GNLY+ stanica u neposrednoj blizini melanocita, podupire potencijalnu ključnu ulogu GNLY-a u citotoksičnom razaranju melanocita i izvršnom koraku imunološke kaskade razvoja vitiliga. Nadalje, s obzirom na to da perilezijska koža također u velikoj mjeri izražava GNLY molekulu, to ukazuje na snažnu imunološku aktivnost u klinički nepromijenjenoj okolnoj koži. Dakle, ovi rezultati predstavljaju nov i značajan doprinos razumijevanju patogeneze vitiliga, jer prvi put povezuju lokalnu prisutnost GNLY+ stanica u lezijama vitiliga s potencijalnom citotoksičnom aktivnošću prema melanocitima, te ukazuju na mogućnost da perilezijska koža djeluje kao rana zona imunološke aktivnosti koja prethodi klinički vidljivoj depigmentaciji.

Našim je istraživanjem po prvi put razjašnjeno koje subpopulacije upalnih stanica u lezijama vitiliga lokalno izražavaju molekulu GNLY. Primjenom metode dvostruke imunohistokemije pokazali smo da su citotoksični CD8+ limfociti T koji ujedno izražavaju GNLY (CD8+GNLY+), kao i stanice NK koje izražavaju GNLY (CD56+GNLY+), značajno zastupljeniji u lezijama u usporedbi s perilezijskom kožom pacijenata i zdravom kožom kontrolne skupine (slike 11 i 12). CD8+GNLY+ stanice statistički značajno dominiraju u oba kožna odjeljka lezija vitiliga, epidermisu i dermisu, poglavito u papilarnom dermisu u odnosu na dermis perilezijske i zdrave kože, dok CD56+GNLY+ stanice nisu uočene u epidermalnom odjeljku (slike 11 i 12). Ovakva raspodjela dodatno naglašava papilarni dermis kao ključno mjesto izvršne imunološke aktivnosti u vitiligu. Unatoč povećanoj prisutnosti obje populacije dvostruko pozitivnih stanica, u lezijama vitiliga su ipak prevladavale dvostruko pozitivne CD8+GNLY+ stanice T, što snažno upućuje na njihovu središnju ulogu u patogenezi bolesti. Može se pretpostaviti da upravo ove stanice, otpuštanjem većih količina GNLY-a, ostvaruju snažan proupalni i kemotaktični učinak, čime doprinose održavanju lokalne upalne mikrookoline i potiču daljnju regrutaciju imunoloških stanica. Takav mehanizam mogao bi imati osobitu važnost u završnoj, izvršnoj fazi bolesti, koja rezultira razaranjem melanocita i pojavom klinički vidljivih depigmentacija.

Osim svojeg citolitičkog djelovanja, GNLY djeluje i kao posrednik imunosnog odgovora, odnosno imunosni alarmin (168). GNLY može potaknuti imunosni odgovor aktivacijom predočnih stanica, poput dendritičkih stanica, kao i izravnim djelovanjem na CD4+ i CD8+ αβ limfocite T, monocite i stanice NK (168). U skladu s tim, naši rezultati upućuju na mogućnost da GNLY u vitiligu, osim izravne citotoksičnosti prema melanocitima, sudjeluje i u pojačavanju i održavanju lokalnog upalnog odgovora, čime dodatno pridonosi patogenezi bolesti.

U pojedinim upalnim, imunosno posredovanim bolestima kože, poput alopecije areate i psorijaze, povišene razine GNLY-a u serumu su povezane s aktivnošću bolesti (124,169). Suprotno tome, u našem istraživanju nije utvrđena povezanost između lokalnog izražaja GNLY-a u lezijama vitiliga i aktivnosti, odnosno proširenosti bolesti. Stoga pretpostavljamo da u vitiligu GNLY vjerojatno ne odražava sustavnu aktivnost bolesti na isti način kao u nekim drugim imunosno posredovanim dermatozama. Naši rezultati u skladu su s istraživanjem Saad Hassana i sur., koji također nisu utvrdili povezanost između razine GNLY-a u perifernoj krvi i aktivnosti vitiliga (70). Nadalje, isti autori nisu pronašli korelaciju ni između izražaja druge citolitičke molekule, perforina, i vrijednosti VASI i VIDA zbroja, koji se koriste kao mjere aktivnosti i proširenosti bolesti u pacijenata s vitiligom. Ovi podaci dodatno podupiru pretpostavku da citolitičke molekule, iako značajne u izvršnoj fazi razaranja melanocita, ne moraju nužno odražavati kliničku aktivnost bolesti. Stoga pretpostavljamo da izražaj GNLY-a nije ujednačen u svim zahvaćenim područjima kože u istom vremenskom trenutku. Osim toga, klinički pokazatelji poput VASI i VES zbroja primarno procjenjuju površinu kože zahvaćenu bolešću, a u manjoj mjeri dinamičnu imunološku aktivnost unutar pojedinih lezija. Stoga je vjerojatno da izražaj GNLY-a u lezijama vitiliga odražava mikrolokalnu izvršnu fazu bolesti, dok klinički indeksi bolje opisuju prostornu proširenost nego stvarnu imunološku aktivnost vitiliga u određenom trenutku (70).

U drugom dijelu našeg istraživanja usredotočili smo se na citotoksični protein perforin i njegov izražaj u lezijama i perilezijskoj koži pacijenata s vitiligom u usporedbi sa zdravom kožom kontrolnih ispitanika. Perforin je citolitička molekula pohranjena u citoplazmatskim granulama stanica NK, γδ limfocita T, CD8+ limfocita T te, u manjoj mjeri, CD4+ limfocita T (109). Njegova temeljna uloga u imunološkom odgovoru jest posredovanje stanične citotoksičnosti prema ciljanim stanicama. Mehanizam njegova

djelovanja temelji se na stvaranju pora u membrani ciljne stanice, čime se omogućuje ulazak granzima B i pokretanje apoptoze (135,170). Dakle, PRF predstavlja nezamjenjivu izvršnu molekulu citotoksičnog imunosnog odgovora. Ova citolitička molekula ima ključnu ulogu u obrani organizma od bakterijskih i virusnih infekcija te u nadzoru tumorskih stanica, ali je također uključena u patogenezu brojnih autoimunih i imunosno posredovanih bolesti (130).

Povišen izražaj PRF-a utvrđen je u perifernoj krvi i kožnim lezijama bolesnika sa psorijazom i lichen planusom, što podupire njegovu značajnu ulogu u imunopatogenezi ovih bolesti (137,138). Osim navedenog, PRF se povezuje i s razvojem reumatoidnog i psorijatičnog artritisa, vulgarnog pemfigusa, sustavnog eritematoznog lupusa te Behçetove bolesti (139). Uloga PRF-a prepoznata je i u brojnim neuroupalnim bolestima, uključujući multiplu sklerozu i Parkinsonovu bolest, gdje citotoksični imunosni mehanizmi doprinose oštećenju živčanog tkiva (140–142). Nadalje, povišen izražaj perforina zabilježen je u odraslih bolesnika s Gravesovom i Hashimotovom bolešću, što dodatno potvrđuje njegovu uključenost u autoimune bolesti (143). Perforin je također ushodno reguliran u bolesnika s dijabetesom tipa 1, u kojem citotoksične stanice T razaraju β-stanice gušterače mehanizmima ovisnima o osi perforin–granzim B i Fas/FasL (144). Stoga, ispitivanje lokalnog izražaja perforina u koži pacijenata s vitiligom predstavlja logičan nastavak istraživanja izvršnih citotoksičnih mehanizama koji mogu sudjelovati u razaranju melanocita te dodatno doprinijeti razumijevanju završne faze imunopatogeneze ove bolesti.

Podatci o izražaju molekule PRF-a u vitiligu u dostupnoj su literaturi relativno malobrojni. Saad Hassan i sur. pokazali su povišenu učestalost PRF+ stanica u epidermisu i dermisu perilezijske i klinički nepromijenjene kože pacijenata s aktivnim vitiligom u usporedbi sa zdravom kožom, što upućuje na prisutnost subkliničke imunološke aktivnosti i izvan vidljivih lezija (70). Ovi su podatci u skladu s rezultatima našeg istraživanja, u kojem PRF+ stanice prevladavaju u lezijama vitiliga u odnosu na perilezijsku kožu, ponajprije u gornjim slojevima papilarnog dermisa, dok je njihova prisutnost u bazalnom sloju epidermisa bila znatno rjeđa (slike 14 i 15). U zdravoj koži kontrolnih ispitanika PRF+ stanice nisu uočene ni u epidermisu niti u dermisu (slike 14 i 15). Cheuk i sur., u svom su istraživanju utvrdili značajno povišen izražaj PRF-a i granzima u CD8+ limfocitima T u epidermisu i dermisu lezija vitiliga, čime su potvrdili

ključnu ulogu citotoksičnih stanica T u lokalnom razaranju melanocita (79). To je u skladu s rezultatima našeg istraživanja, u kojem smo dokazali da su među infiltrirajućim limfocitima u lezijama vitiliga značajno učestaliji citotoksični CD8+ limfociti T koji izražavaju PRF, odnosno CD8+PRF+ stanice, u usporedbi s perilezijskom kožom pacijenata i zdravom kožom kontrolne skupine (slike 16 i 17). Dvostruko pozitivne CD8+PRF+ stanice u našem su istraživanju bile najbrojnije u gornjim dijelovima papilarnog dermisa, dok su u bazalnom sloju epidermisa bile zastupljene u manjoj mjeri. Nadalje, gotovo sve CD8+ stanice prisutne u lezijama vitiliga izražavale su PRF, što snažno upućuje na to da upravo CD8+ limfociti T s izraženim citolitičkim potencijalom aktivno sudjeluju u razaranju melanocita. Isti obrazac izražaja, iako u značajno manjem opsegu, zabilježen je i u perilezijskoj koži oboljelih, gdje je većina CD8+PRF+ stanica smještena u papilama dermisa u neposrednoj blizini melanocita. Dakle, u perilezijskoj koži, slično kao i u potpuno razvijenim lezijama, manji broj aktiviranih CD8+ limfocita T s citoplazmatskim granulama ispunjenima PRF-om može imati važnu ulogu u nastanku depigmentacije. Time se dodatno potvrđuje koncept perilezijske kože kao prijelazne zone u kojoj se već odvijaju ključni izvršni mehanizmi imunološkog oštećenja melanocita u vitiligu.

U našem smo istraživanju po prvi put pokazali da je lokalni izražaj stanica NK koje ujedno izražavaju perforin, odnosno CD56+PRF+ stanica, značajno povišen u lezijama vitiliga, i to u oba odjeljka kože, epidermalnom i dermalnom, u usporedbi s perilezijskom kožom oboljelih i zdravom kožom kontrolne skupine ispitanika (slike 16 i 18). Udio CD56+PRF+ stanica NK bio je znatno manji u usporedbi s udjelom CD8+PRF+ limfocita T u lezijama vitiliga, ali statistički značajno veći u odnosu na perilezijsku i zdravu kože. Ovaj nalaz upućuje na koordinirano djelovanje dviju ključnih citotoksičnih populacija u izvršnoj fazi bolesti te snažno podupire pretpostavku da obje populacije stanica, putem perforinom posredovane citotoksičnosti, sudjeluju u lokalnom razaranju melanocita, što je temeljno imunopatogenetsko obilježje ove bolesti.

U sljedećem dijelu istraživanja analizirali smo izražaj i prostorni smještaj molekule PRF-2 u lezijama i perilezijskoj koži pacijenata s vitiligom u usporedbi sa zdravom kožom kontrolnih ispitanika. PRF-2 je citotoksični protein koji, slično perforinu, putem MACPF-domene sudjeluje u stvaranju pora u membrani ciljne stanice te time

omogućuje njezino oštećenje i smrt (150). Molekula PRF-2 pohranjena je unutar intracelularnih vezikula u citoplazmi fagocita i predstavlja sastavni dio mehanizama urođene imunosti (152). Osim svoje uloge u staničnoj citotoksičnosti, PRF-2 posjeduje izražena protumikrobna svojstva te učinkovito sudjeluje u eliminaciji unutarstaničnih i izvanstaničnih bakterija, a opisan je i njegov protutumorski učinak (150,171). Novija istraživanja upućuju i na to da PRF-2 ima važnu regulatornu ulogu u imunosnom odgovoru, osobito u pojačanoj signalizaciji putem IFN tipa I. Naime, pokazano je da PRF-2 sudjeluje u modulaciji IFN-α/β signalnog puta, čija je pretjerana aktivacija obilježje brojnih upalnih i imunosno posredovanih bolesti (158). Stoga se PRF-2 ne može promatrati isključivo kao izvršna citotoksična molekula, već i kao važan regulator imunosnog odgovora u patogenezi autoimunih bolesti i tumora. Unatoč tim spoznajama, u dostupnoj literaturi još uvijek postoji relativno malo podataka o izražaju PRF-2 i njegovoj ulozi u imunosno posredovanim bolestima kože. U nedavnom istraživanju, Štrbo i sur. pokazali su da u ljudskoj koži PRF-2 ponajprije izražavaju γδ limfociti T, bazalni keratinociti, endotelne stanice i fibroblasti te su ukazali na njegovu moguću važnu ulogu u obrani od infekcija i u procesima cijeljenja rana (156). Međutim, do sada nije bilo podataka o lokalnom izražaju PRF-2 u koži pacijenata s vitiligom, što dodatno naglašava važnost našeg istraživanja usmjerenog na rasvjetljavanje uloge novih izvršnih i regulatornih mehanizama uključenih u imunopatogenezu ove bolesti.

Rezultati našeg istraživanja izražaja PRF-2 u bioptatima kože u skladu su s radom Štrbo i sur., o konstitutivnom izražaju PRF-2 u keratinocitima epidermisa te u fibroblastima i endotelnim stanicama dermisa (156). U našem su istraživanju PRF-2+ stanice uočene u oba kožna odjeljka, osobito u lezijmaa, a u manjem broju i u perilezijskoj koži pacijenata s vitiligom, s tim da su u epidermisu bile rijetko raspoređene i uglavnom ograničene na bazalni sloj, dok je najveći udio PRF-2+ stanica bio lokaliziran unutar upalnih infiltrata papilarnog dermisa (slike 20 i 21). Takav obrazac raspodjele upućuje na to da se kako u lezijama tako i u perilezijskoj koži odvijaju imunološki procesi koji osim ranije navedenih GNLY i PRF-a uključuju i molekulu PRF-2.

Može se pretpostaviti da keratinociti, kao dio imunosnog sustava kože, konstitutivnim izražajem PRF-2 sudjeluju u prvoj liniji obrane od patogenih mikroorganizama, kako u zdravoj koži tako i u lezijama kože pacijenata s vitiligom. Međutim, s obzirom na

izraženiju prisutnost PRF-2 unutar upalnih infiltrata papilarnog dermisa, može se pretpostaviti da ova molekula u vitiligu ne sudjeluje samo u obrani od infekcija, već i u modulaciji lokalnog upalnog mikrookoliša te potencijalno u održavanju kronične upalne reakcije. Na temelju morfoloških obilježja i dodatnih imunohistokemijskih analiza može se pretpostaviti da dio PRF-2+ stanica u lezijama vitiliga čine tkivni makrofagi, koji djeluju kao antigen-predočne stanice i time imaju ključnu ulogu u aktivaciji stečenog imunosnog odgovora. Ovu smo pretpostavku dodatno potvrdili metodom dvostruke imunohistokemije, kojom smo utvrdili povišen izražaj CD68+PRF-2+ stanica u lezijama kože pacijenata s vitiligom u usporedbi s uzorcima zdrave kože kontrolne skupine. Dvostruko pozitivne CD68+PRF-2+ stanice bile su znatno brojnije u dermalnom odjeljku lezija i perilezijske kože u odnosu na zdravu kožu te su bile lokalizirane pretežno u gustim upalnim infiltratima koji ispunjavaju dermalne papile, dok su u bazalnom sloju epidermisa bile zastupljene u manjoj mjeri (slike 22 i 23).

S obzirom na izraženu ushodnu regulaciju CD68+PRF-2+ stanica, osobito unutar dermalnih infiltrata lezija vitiliga, ali i u perilezijskoj koži, može se pretpostaviti da se tkivni makrofagi dugotrajno zadržavaju u zahvaćenim područjima kože te koriste PRF-2 kao izvršnu molekulu unutar lokalnog imunološkog mikrookoliša, čime se podržava upala i kronicitet bolesti.

Slijedom navedenog, naše je istraživanje dokazalo povišen lokalni izražaj citotoksičnih proteina, GNLY-a i PRF-2 te potvrdilo ranije naznake o uključenosti PRF-om posredovane citotoksičnosti u koži pacijenata s vitiligom, što upućuje na snažnu uključenost izvršnih mehanizama stanično posredovane citotoksičnosti u patogenezi bolesti. Ovi rezultati donose novi uvid u završnu fazu imunološke kaskade odgovorne za razaranje melanocita i nastanak tipičnih depigmentacija u vitiligu. Halo nevus je melanocitni nevus okružen pravilnim, okruglim i simetričnim prstenom depigmentacije. Pojavljuje se u oko 1 % opće populacije (172), češće u djece i adolescenata, a može biti udružen s vitiligom (173). Halo nevusi se najčešće pojavljuju na leđima te u području glave i vrata, a približno polovica pacijenata istodobno ima više halo nevusa, što upućuje na moguću uključenost sustavnih imunoloških mehanizama (173). Iako točan mehanizam povezanosti halo nevusa i vitiliga još uvijek nije u potpunosti razjašnjen, dostupni podatci ukazuju na postojanje sličnih imunoloških mehanizama, ponajprije posredovanih limfocitima T, koji sudjeluju u razvoju i patogenezi obje bolesti

(90). Danas se smatra da halo nevusi nastaju kao posljedica imunološkog odgovora usmjerenog protiv antigena nevomelanocita, što dovodi do njihove postupne regresije i razaranja, uz razvoj karakterističnog prstena hipopigmentacije koji okružuje sam nevus (105).

Slično vitiligu, dosadašnja istraživanja ukazuju na središnju ulogu citotoksičnog imunološkog odgovora posredovanog limfocitima T u patogenezi halo nevusa, pri čemu CD8+ limfociti T čine većinu upalnih stanica tijekom svih faza razvoja ove lezije (90). To je u skladu s rezultatima našeg istraživanja, u kojem smo u dermisu lezija halo nevusa utvrdili gust upalni infiltrat CD8+ limfocita T koji okružuje gnijezda nevus stanica (slika 27), kao i znatan broj CD8+ limfocita T u neposrednoj blizini melanocita bazalnog sloja epidermisa (slika 27). U perilezijskoj koži halo nevusa CD8+ limfociti T bili su prisutni u epidermisu i dermisu, ali u znatno manjem broju nego u samoj leziji, dok ovih stanica u zdravoj koži gotovo nije bilo (slika 27 i 28). Na temelju ovih rezultata može se pretpostaviti da CD8+ limfociti T lokalizirani u neposrednoj blizini gnijezda nevus stanica imaju ključnu ulogu u razaranju nevomelanocita i nastanku halo nevusa. Istodobno, pojačano nakupljanje CD8+ limfocita T u perilezijskoj koži vjerojatno sudjeluje u razvoju depigmentacijskog haloa oko nevusa, što dodatno povezuje imunopatogenezu halo nevusa s mehanizmima karakterističnima za vitiligo.

Stanice NK posjeduju snažno citotoksično djelovanje te predstavljaju poveznicu između urođenog i stečenog imunosnog odgovora, zbog čega se smatra da imaju važnu ulogu u započinjanju i oblikovanju imunoloških reakcija u koži (174). Slijedom toga, opravdano je pretpostaviti da stanice NK sudjeluju i u nastanku halo nevusa. Međutim, u dostupnoj literaturi do sada nisu opisani podatci o izražaju i smještaju stanica NK u lezijama niti u perilezijskoj koži halo nevusa. Stoga su naši rezultati prvi koji pokazuju znatno veći udio CD56+ stanica NK u lezijama halo nevusa u usporedbi s perilezijskom kožom pacijenata gdje je taj broj bio manji, ali statistički značajno veći nego u koži zdravih ispitanika (slika 27 i 28). CD56+ stanice NK poglavito smo uočili u srednjim dijelovima papilarnog dermisa, dok su u epidermisu bile prisutne u manjoj mjeri (slike 27 i 28). Slijedom navedenog, može se pretpostaviti da upravo CD56+ stanice, kao dio urođenog imunosnog sustava kože, sudjeluju u započinjanju lokalne imunološke kaskade, uključujući aktivaciju antigen-specifičnih CD8+ limfocita T, nakon čega slijedi izvršna faza imunosnog odgovora usmjerena prema nevomelanocitima.

Ovakav slijed događaja dodatno podupire koncept imunološke sličnosti između halo nevusa i vitiliga te ističe važnost stanica NK kao ranih pokretača citotoksičnog protumelanocitnog odgovora.

Dosadašnja su istraživanja pokazala da većina limfocita T u lezijama halo nevusa izražava citolitičke molekule poput granzima B, perforina i Fas liganda, što upućuje na njihovu izraženu citotoksičnu aktivnost usmjerenu prema nevomelanocitima (91). Međutim, u dostupnoj literaturi za sada ne postoje podatci o izražaju i smještaju citolitičke molekule GNLY u lezijama niti u perilezijskoj koži halo nevusa. Stoga su naša istraživanja dokazala ushodnu regulaciju GNLY+ stanica, osobito u lezijama, a manje u perilezijskoj koži, dok u zdravoj koži kontrolnih ispitanika GNLY+ stanice nisu zabilježene (slike 25 i 26). Najveći broj GNLY+ stanica nađen je u gornjim slojevima papilarnog dermisa, a u manjoj mjeri u bazalnom sloju epidermisa kako u lezijama tako i u perilezijskoj koži (slike 25 i 26). Naši rezultati ukazuju na pojačan lokalni izražaj GNLY-a u lezijama i perilezijskoj koži halo nevusa, što upućuje na to da GNLY u halo nevusu kao i u vitiligu ima važnu ulogu u razvoju zone depigmentacije koja okružuje sam nevus. Činjenica da se GNLY+ stanice nalaze u neposrednoj blizini nevomelanocita dodatno podupire pretpostavku da GNLY sudjeluje u lokalnom citotoksičnom imunosnom odgovoru te doprinosi oštećenju i razaranju nevomelanocita. Nadalje, ne može se isključiti mogućnost da GNLY+ stanice u dermalnom odjeljku lezija djeluju i kao imunosni alarmini koji privlače i usmjeravaju dodatne imunocite u kožu lezije te time doprinose održavanju upalnog odgovora u halo nevusu.

Jednostrukom imunohistokemijskom analizom utvrdili smo ushodnu regulaciju GNLY+ stanica u lezijama i perilezijskoj koži pacijenata s halo nevusom, što nas je potaknulo da u nastavku istraživanja detaljnije ispitamo koje subpopulacije upalnog infiltrata izražavaju ovu citolitičku molekulu. Naši rezultati pokazuju da su CD8+ limfociti T koji ujedno izražavaju GNLY (CD8+GNLY+ stanice) značajno učestaliji u lezijama i perilezijskoj koži halo nevusa u usporedbi sa zdravom kožom kontrolne skupine, pri čemu je njihov broj u perilezijskoj koži ipak značajno manji nego u samim lezijama (slika 30). Dvostruko pozitivne CD8+GNLY+ stanice najčešće su bile smještene u gornjim slojevima papilarnog dermisa, a važno je istaknuti da je većina CD8+ limfocita T u lezijama halo nevusa istodobno izražavala biljeg GNLY, što upućuje na njihovu

izraženu citotoksičnu aktivaciju unutar lezije (slika 29). Osim CD8+ limfocita T, u lezijama halo nevusa uočen je i manji, ali statistički značajan udio CD56+GNLY+ stanica NK, koje su pretežno bile smještene u srednjem dijelu papilarnog dermisa (slike 29 i 31). Iako je njihov ukupni broj bio znatno manji u odnosu na CD8+GNLY+ stanice, izražaj CD56+GNLY+ stanica NK u lezijama bio je značajno veći u usporedbi s perilezijskom kožom oboljelih i zdravom kožom kontrolne skupine. Važno je naglasiti da su dvostruko pozitivne CD8+GNLY+ i CD56+GNLY+ stanice bile smještene subepidermalno, u neposrednoj blizini nevomelanocita, što snažno upućuje na njihovu aktivnu ulogu u citotoksičnom oštećenju i razaranju nevomelanocita te posljedičnom nastanku depigmentacijskog haloa, koji je temeljno kliničko obilježje halo nevusa (slika 29). Stoga, naše istraživanje pokazuje da CD8+ limfociti T, a u manjoj mjeri i stanice NK koje izražavaju GNLY, prevladavaju u lezijama halo nevusa te vjerojatno aktivno sudjeluju u svim fazama razvoja ove bolesti - od početne imunološke aktivacije do završne faze razaranja nevomelanocita.

Naglašeni izražaj citolitičke molekule perforina u lezijama halo nevusa uočen je u literaturi, ali smještaj i distribucija stanica koje ovu molekulu izražavaju nije detaljno istražena. Naše je istraživanje pokazalo značajno viši udio PRF+ stanica u dermalnom odjeljku lezija, poglavito u gornjim slojevima papilarnog dermisa, u odnosu na perilezijsku kožu oboljelih i zdravu kožu kontrolnih ispitanika. Značajno viši udio PRF+ stanica također je uočen u perilezijskoj koži u usporedbi sa zdravom kožom, pretežno u dermisu, što upućuje na postojanje aktivnog imunosnog procesa i izvan rubova klinički vidljive lezije (slike 32 i 33). U nastavku istraživanja ispitali smo koje stanice upalnog infiltrata u lezijama i perilezijskoj koži izražavaju citolitičku molekulu PRF. Naši rezultati ukazuju na značajno veći izražaj CD8+PRF+ stanica u lezijama i perilezijskoj koži pacijenata s halo nevusom, pri čemu je broj dvostruko pozitivnih CD8+PRF+ limfocita T ipak značajno manji u perilezijskoj koži nego u samoj leziji. U lezijama halo nevusa utvrđen je i manji, ali statistički značajan udio CD56+PRF+ stanica NK, pretežno lokaliziranih u papilarnom dermisu, pri čemu je njihov izražaj bio značajno veći nego u perilezijskoj i zdravoj koži. Iako brojčano manje zastupljene, ove stanice vjerojatno doprinose lokalnom citotoksičnom odgovoru. Činjenica da su među analiziranim subpopulacijama upravo CD8+ limfociti T koji izražavaju PRF bili najzastupljeniji i višestruko brojniji u lezijama halo nevusa u odnosu na zdravu kožu

upućuje na važnu ulogu PRF-om posredovane citotoksičnosti u izvršnoj fazi razaranja nevomelanocita.

Kao i u vitiligu, i ovdje smo istražili izražaj i prostorni smještaj citolitičke molekule perforina-2 u lezijama i perilezijskoj koži pacijenata s halo nevusom, što do sada nije istraženo te u dostupnoj literaturi o tome ne postoje podatci. Dokazali smo konstitutivan izražaj PRF-2 u epidermalnom odjeljku te u stanicama dermisa u sve tri analizirane skupine ispitanika (slike 37 i 38). Međutim, PRF-2+ stanice bile su najbrojnije u dermalnom odjeljku lezije halo nevusa, osobito u gornjim slojevima papilarnog dermisa, dok su rjeđe bile zastupljene u bazalnom sloju epidermisa. Isti obrazac izražaja PRF-2+ stanica, ali u značajno manjem opsegu, utvrdili smo i u perilezijskoj koži pacijenata s halo nevusom, gdje su PRF-2+ stanice također pretežno infiltrirale gornje slojeve dermisa (slike 37 i 38). Molekula PRF-2 u halo nevusu vjerojatno djeluje kao izvršna citotoksična molekula koja doprinosi patogenezi bolesti. Pretpostavljamo da PRF-2+ stanice unutar upalnih infiltrata papilarnog dermisa lezije halo nevusa u suradnji s drugim citolitičkim proteinima i imunološkim stanicama doprinose razaranju nevomelanocita. Nadalje, smještaj PRF-2+ stanica unutar gustih upalnih infiltrata papilarnog dermisa ukazuje na njihovu uključenost u lokalne citotoksične mehanizme koji obilježavaju imunopatogenezu halo nevusa.

Poznato je da citolitički protein PRF-2 konstitutivno izražavaju tkivni makrofagi, što smo potvrdili i u našem istraživanju, u skladu s nalazima Štrbo i sur., koji su pokazali izražaj PRF-2 u makrofagima i drugim stanicama ljudske kože (156). U lezijama kože pacijenata s halo nevusom utvrdili smo značajno veći broj dvostruko pozitivnih CD68+PRF-2+ stanica u usporedbi s bioptatima perilezijske i zdrave kože (slike 39 i 40). Te su stanice najčešće bile smještene u gornjim slojevima papilarnog dermisa, dok su u manjoj mjeri bile prisutne u bazalnom sloju epidermisa (slika 39). Isti obrazac izražaja CD68+PRF-2+ stanica opažen je i u perilezijskoj koži pacijenata s halo nevusom, iako je njihov broj bio značajno manji u odnosu na kožu lezije (slika 40). Unatoč tome, u perilezijskoj koži oboljelih zabilježeno je značajno veće nakupljanje CD68+PRF-2+ stanica u usporedbi sa zdravom kožom kontrolnih ispitanika (slika 40). Većina dvostruko pozitivnih CD68+PRF-2+ stanica u perilezijskoj koži bila je lokalizirana u dermalnom odjeljku što upućuje na njihovu moguću ulogu u održavanju lokalnog upalnog mikrookoliša i prezentaciji antigena tijekom progresije lezije (slika

39). Na temelju navedenih rezultata može se pretpostaviti da tkivni makrofagi koji izražavaju PRF-2 imaju važnu ulogu u patogenezi halo nevusa, ponajprije kroz sudjelovanje u lokalnim upalnim zbivanjima i modulaciji citotoksičnih mehanizama usmjerenih prema nevomelanocitima. Njihovo nakupljanje u lezijama, ali i u perilezijskoj koži, dodatno podupire koncept halo nevusa kao dinamičnog procesa u kojem imunosna aktivnost nadilazi granice klinički vidljive lezije i može prethoditi nastanku karakteristične zone depigmentacije.

Slijedom navedenih rezultata, našim smo istraživanjem utvrdili povećan izražaj triju citotoksičnih molekula, GNLY-a, PRF-a i PRF-2, u lezijama pacijenata s halo nevusom, što upućuje na uključenost više komplementarnih izvršnih mehanizama stanične citotoksičnosti u patogenezu ove bolesti. Ovi rezultati podupiru koncept da je razaranje nevomelanocita u halo nevusu rezultat koordiniranog djelovanja različitih citotoksičnih puteva posredovanih imunosnim stanicama, a ne posljedica djelovanja pojedinačne efektorske molekule. S obzirom na sličnosti u imunopatogenetskim mehanizmima između halo nevusa i vitiliga, uključujući ključnu ulogu CD8+ limfocita T i stanica NK u razaranju melanocita, naši rezultati dodatno upućuju na to da lokalna citotoksična aktivacija u halo nevusu može odražavati širi imunosni profil sličan onome u vitiligu, što može objasniti čestu koegzistenciju ovih dviju bolesti.

Stoga smo u sljedećem dijelu ispitivanja usporedili izražaj navedenih citotoksičnih molekula u lezijama vitiliga i halo nevusa. Uočili smo značajno viši izražaj molekule GNLY u lezijama i perilezijskoj koži halo nevusa u odnosu na lezije vitiliga, a u obje je bolesti GNLY poglavito smješten u papilarnom dermisu, blizu melanocita i oko nevus stanica (slike 41 i 42). Nadalje, halo nevus karakterizira izraženiji lokalni upalni infiltrat CD8+ limfocita T, koji perifokalno okružuje gnijezda nevomelanocita, dok je u vitiligu upalni infiltrat CD8+ stanica rjeđi i difuznije raspoređen (slike 41 i 42). Takva distribucija u skladu je s konceptom da je halo nevus obilježen lokaliziranom, snažno fokusiranom citotoksičnom reakcijom, dok je vitiligo manifestacija šireg i kroničnog imunosnog odgovora protiv melanocita (164). To se također podudara i s rezultatima Yanga i sur., koji su u lezijama vitiliga uočili gust infiltrat CD8+ limfocita T povezan s aktivacijom IFN-γ osi, povećanom ekspresijom kemokina, osobito CXCL9 i CXCL10, te aktivacijom citotoksičnih mehanizama posredovanih granzimom B i perforinom. Iako navedena studija nije uključivala analizu granulizina, ona snažno podupire koncept da je CD8+

T-stanicama posredovana citotoksičnost središnji patogenetski mehanizam u razvoju vitiliga, u koji se uklapa i GNLY kao dodatna izvršna citotoksična molekula, što do sada nije bilo istraženo (90,175).

U halo nevusu smo, osim jačeg infiltrata CD8+ limfocita T, zabilježili i veći udio CD56+ stanica NK u odnosu na vitiligo, što upućuje na izraženiju uključenost prirođene imunosti u lokalni citotoksični odgovor u halo nevusu (175) (slike 41 i 42). Poznato je da stanice NK, uz PRF i granzim, u velikoj mjeri koriste GNLY kao efektorsku molekulu, osobito u kontekstu ciljanog uništavanja stanica s promijenjenim ili stresom induciranim antigenskim profilom, što je dokazano u različitim modelima citotoksičnosti (123,176). Ovi podaci podupiru našu pretpostavku da veći broj CD56+GNLY+ stanica u halo nevusu doprinosi izraženijem lokalnom GNLY-posredovanom citotoksičnom odgovoru (slike 43 i 44). Zanimljivo, unatoč manjem ukupnom broju GNLY+ i CD8+ stanica u lezijama vitiliga u odnosu na halo nevus, udio dvostruko pozitivnih CD8+GNLY+ stanica bio je veći u lezijama vitiliga (175). Ovaj nalaz ukazuje na to da je u vitiligu veći postotak CD8+ limfocita T funkcionalno diferenciran prema snažno citotoksičnom fenotipu, što upućuje na izraženiji antigenski fokus i specifičnost CD8+ T-staničnog odgovora protiv melanocitnih antigena. Takav obrazac u skladu je s prethodnim radovima koji naglašavaju visoku razinu antigen-specifične aktivacije CD8+ stanica u vitiligu, uključujući njihovu sposobnost migracije u epidermis i izravnog kontakta s melanocitima (90). Suprotno tome, u halo nevusu veći broj CD56+GNLY+ stanica NK ukazuje na to da citotoksični odgovor nije isključivo antigen-specifičan, već uključuje i stanice urođene imunosti, vjerojatno potaknute lokalnim signalima stresa ili promijenjenim mikrookolišem unutar tkiva halo nevusa (42,175). Ova razlika dodatno podupire koncept da, iako vitiligo i halo nevus dijele slične efektorske mehanizme, organizacija i intenzitet imunološkog odgovora bitno se razlikuju. Dakle, naši rezultati podupiru hipotezu da granulizin ima važnu i diferencijalnu ulogu u patogenezi vitiliga i halo nevusa, djelujući kao ključna efektorska molekula citotoksičnih CD8+ limfocita T te u manjoj mjeri stanica NK (123,175). Slabiji izražaj GNLY-a u lezijama vitiliga u odnosu na halo nevus vjerojatno ne odražava slabiju citotoksičnost, već razliku u intenzitetu i fokusu lokalnog imunološkog odgovora, pri čemu je vitiligo obilježen difuznijim, sustavnim autoimunim procesom, a halo nevus snažnijom, ali lokaliziranom citotoksičnom reakcijom.

U lezijama vitiliga u odnosu na halo nevus također smo zapazili značajno manji broj PRF+ stanica, koje su u obje bolesti bile poglavito smještene u papilarnom sloju dermisa, u neposrednoj blizini melanocita odnosno nevus stanica (slika 45). Ovakav raspored PRF+ stanica u skladu je s prethodnim istraživanjima koja ukazuju da su citotoksične efektorske molekule u vitiligu poglavito smještene u površnim dermalnim slojevima i bazalnom sloju epidermisa, gdje mogu ostvariti izravan kontakt s melanocitima (90). Sličan obrazac izražaja PRF-a, iako u manjem intenzitetu, uočen je i usporedbom perilezijske kože halo nevusa i vitiliga, pri čemu je u perilezijskoj koži vitiliga zabilježen značajno manji broj PRF+ stanica u odnosu na perilezijsku kožu halo nevusa (slika 45). Dakle, halo nevus je vjerojatno obilježen izraženijom lokalnom PRF-posredovanom citotoksičnom reakcijom, dok je u vitiligu PRF+ infiltrat u samim lezijama slabije izražen. Viši udio PRF+ stanica u lezijama halo nevusa u odnosu na vitiligo također ukazuje na intenzivniju lokalnu citotoksičnu reakciju usmjerenu protiv nevomelanocita, što je u skladu s konceptom razvoja halo nevusa kao fokalnog, snažno aktiviranog imunološkog procesa (175). PRF je ključna efektorska molekula granularnog puta citotoksičnosti, a njegova pojačana ekspresija tipično se povezuje s akutnom i snažno fokusiranom citotoksičnom aktivacijom CD8+ limfocita T i stanica NK (170,176). Suprotno tome, iako je u lezijama vitiliga opažen manji ukupni broj PRF+ stanica, veći udio dvostruko pozitivnih CD8+PRF+ stanica u perilezijskoj koži vitiliga u odnosu na halo nevus upućuje na izraženiju aktivaciju CD8+ limfocita T u perifernim dijelovima lezija vitiliga (slike 46 i 47). Stoga naši rezultati ukazuju na to da je u vitiligu citotoksični odgovor izraženiji u perilezijskom području, što može predstavljati rani znak širenja lezija i progresije bolesti. Usporedbom izražaja CD8+PRF+ stanica u perilezijskoj koži vitiliga i halo nevusa našli smo značajno veći udio CD8+PRF+ stanica u perilezijskoj koži vitiliga (slika 47). Takav obrazac u skladu je s prethodnim studijama koje su pokazale da se u perilezijskoj koži vitiliga nalaze funkcionalno aktivirani, antigen-specifični CD8+ limfociti T s izraženim citotoksičnim potencijalom, čak i u klinički nepromijenjenoj koži (164). Slično je zabilježeno i analizom izražaja CD56+PRF+ stanica u perilezijskoj koži, gdje je uočen značajno veći udio CD56+PRF+ stanica u perilezijskoj koži vitiliga u odnosu na perilezijsku kožu halo nevusa (slika 47). Dakle, naši rezultati upućuju na važnu ulogu stanica NK u perifernim zonama lezija vitiliga, gdje one mogu sudjelovati u ranom, urođenom citotoksičnom odgovoru i potencijalno doprinijeti započinjanju ili širenju upale. Uloga stanica NK i perforina u vitiligu ranije je također pokazana u kontekstu povećane ekspresije citotoksičnih

molekula i IFN-γ signalizacije u perilezijskim područjima ove bolesti (90,164). Stoga, naši rezultati upućuju na različitu prostornu organizaciju PRF-posredovanog citotoksičnog odgovora u vitiligu i halo nevusu. Dok je halo nevus obilježen snažnom, lokalno fokusiranom PRF-ovisnom citotoksičnošću unutar samih lezija, vitiligo pokazuje izraženiju aktivaciju perforin-pozitivnih CD8+ limfocita T i stanica NK u perilezijskoj koži, što je u skladu s njegovim difuznim i progresivnim karakterom. Ovakav obrazac dodatno podupire koncept da, iako vitiligo i halo nevus dijele slične efektorske mehanizme, dinamika i topografija imunološkog odgovora bitno se razlikuju (175).

Uspoređujući izražaj molekule PRF-2 te stanica upalnog infiltrata koje istodobno izražavaju navedenu citotoksičnu molekulu u lezijama i perilezijskoj koži vitiliga i halo nevusa utvrdili smo značajno manji broj PRF-2+ stanica u lezijama vitiliga u odnosu na halo nevus (slika 48). U obje su bolesti PRF-2+ stanice bile poglavito smještene u papilarnom sloju dermisa, što podupire lokaliziranu aktivaciju stanica urođene imunosti u neposrednoj blizini ciljanih melanocita odnosno nevus stanica. Suprotan obrazac izražaja PRF-2 uočen je usporedbom perilezijske kože vitiliga i halo nevusa, pri čemu je u perilezijskoj koži vitiliga zabilježen veći broj PRF-2+ stanica u odnosu na perilezijsku kožu halo nevusa, iako ta razlika nije dosegla statističku značajnost (slika 48).

PRF-2 je transmembranski protein urođene imunosti koji se primarno izražava u mononuklearnim fagocitima, uključujući makrofage i dendritične stanice, te ima važnu ulogu u intracelularnoj i membranski posredovanoj citotoksičnosti putem stvaranja pora i lize ciljanih stanica ili patogena (177,178). Njegova pojačana ekspresija u lezijama halo nevusa stoga može odražavati intenzivniju lokalnu aktivaciju makrofaga u fokalnom imunološkom odgovoru usmjerenom protiv nevomelanocita. Suprotno tome, relativno veći udio PRF-2+ stanica u perilezijskoj koži vitiliga može upućivati na perifernu, potencijalno raniju fazu aktivacije urođene imunosti, uključenu u započinjanje ili širenje procesa depigmentacije. Ovakav obrazac u skladu je s konceptom vitiliga kao difuzne imunosno posredovane bolesti u kojoj se aktivacija imunocita može opaziti i u klinički nepromijenjenoj koži (164). Nakon analize ukupnog izražaja PRF-2, provedena je usporedba izražaja dvostruko pozitivnih CD68+PRF-2+ stanica u lezijama i perilezijskoj koži vitiliga i halo nevusa. Usporedbom lezija vitiliga i

halo nevusa nije utvrđena značajna razlika u broju CD68+PRF-2+ stanica (slika 51), što upućuje na to da makrofagi koji izražavaju PRF-2 sudjeluju u imunopatogenezi obje bolesti u sličnom kvantitativnom opsegu. Sličan obrazac zabilježen je i u perilezijskoj koži, gdje također nije uočena značajna razlika u udjelu CD68+PRF-2+ stanica između vitiliga i halo nevusa (slika 51). Dakle, naši rezultati ukazuju na to da se, unatoč razlikama u ukupnom izražaju PRF-2 između vitiliga i halo nevusa, osobito u lezijama, doprinos CD68+ makrofaga koji izražavaju PRF-2 održava relativno stabilnim u obje bolesti. Stoga razlike u ukupnom izražaju PRF-2+ stanica vjerojatno proizlaze iz doprinosa drugih staničnih populacija urođene imunosti ili iz razlika u njihovoj funkcionalnoj aktivaciji, a ne iz samog udjela CD68+PRF-2+ makrofaga u upalnom infiltratu. Zaključno, naši rezultati upućuju na to da molekula PRF-2 sudjeluje u patogenezi vitiliga i halo nevusa kao dio urođene citotoksične komponente imunološkog odgovora, pri čemu halo nevus pokazuje izraženiju lokalnu PRF-2-posredovanu aktivnost unutar lezije, dok vitiligo pokazuje relativno veću perifernu aktivaciju, što je u skladu s njegovim progresivnim i difuznim kliničkim tijekom.

Ovo se istraživanje koncepcijski i metodološki nadovezuje na ranija istraživanja naše istraživačke skupine, u kojima je utvrđen povećan izražaj citotoksičnih molekula PRF-a, GNLY-a i PRF-2 u promijenjenoj koži i perifernoj krvi bolesnika sa psorijazom i lihen planusom, također imunosno posredovanim upalnim bolestima. U ovom smo radu, analizom izražaja i prostorne raspodjele GNLY-a, PRF-a i PRF-2 u lezijama i perilezijama vitiliga i halo nevusa, pokazali njihovu povećanu prisutnost među infiltrirajućim upalnim stanicama zahvaćene kože, što upućuje na uključenost više komplementarnih izvršnih mehanizama stanične citotoksičnosti u patogenezi obje bolesti.

Premda je ovo istraživanje rezultiralo opsežnim i konzistentnim nalazima o izražaju citotoksičnih molekula GNLY, PRF-a i PRF-2 u koži bolesnika s vitiligom i halo nevusom, točna funkcionalna uloga ovih molekula u patogenezi obje bolesti još uvijek nije u potpunosti razjašnjena. Naime, iako dobiveni rezultati upućuju na njihovu uključenost u lokalne imunosne procese, ostaje nepoznato u kojoj mjeri i kojim mehanizmima navedene citotoksične molekule izravno sudjeluju u oštećenju melanocita odnosno nevus stanica, kao i kako doprinose započinjanju, održavanju i progresiji upalnog odgovora. Stoga bi se buduća istraživanja trebala usmjeriti na

detaljnu funkcionalnu karakterizaciju uloge GNLY-a, PRF-a i PRF-2 u kožnim lezijama vitiliga i halo nevusa, s posebnim naglaskom na identifikaciju ciljnih stanica njihova citotoksičnog djelovanja. Provedba funkcionalnih *in vitro* i *ex vivo* studija, uključujući ko-kulture imunoloških stanica i melanocita, mogla bi omogućiti izravno ispitivanje citotoksičnog potencijala ovih molekula te pružiti precizniji uvid u njihovu interakciju s melanocitima unutar upalnog mikrookoliša kože. Osim toga, dodatna istraživanja trebala bi razjasniti vremensku i prostornu dinamiku izražaja citotoksičnih molekula, osobito u perilezijskim područjima, kako bi se utvrdilo sudjeluju li GNLY, PRF i PRF-2 u ranim fazama bolesti te mogu li poslužiti kao potencijalni biomarkeri aktivnosti ili progresije vitiliga. Stoga bi longitudinalne studije mogle pružiti vrijedan uvid u povezanost izražaja ovih molekula s kliničkim tijekom bolesti.

Zaključno, daljnja istraživanja usmjerena na funkcionalne i mehanističke aspekte citotoksičnih molekula GNLY, PRF i PRF-2 nužna su kako bi se u potpunosti razjasnila njihova uloga u započinjanju, razvoju i napredovanju imunosno posredovanih upalnih zbivanja u vitiligu i halo nevusu.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju iznesenih rezultata donijeli smo sljedeće zaključke:

1. Povećani udio CD56+ stanica NK i CD8+ limfocita T u lezijama i perilezijskoj koži bolesnika s vitiligom i halo nevusom u odnosu na kontrolnu skupinu potvrđuje istodobnu aktivaciju urođenog i stečenog citotoksičnog imunosnog odgovora u obje bolesti te ukazuje na to da perilezijska koža predstavlja imunološki aktivno područje uključeno u ranu fazu nastanka i progresije depigmentacija.
2. Povećani izražaj GNLY-a, PRF-a i PRF-2 u lezijama vitiliga i halo nevusa potvrđuje da u patogenezi obje bolesti sudjeluje više komplementarnih citotoksičnih mehanizama koji koordinirano dovode do razaranja melanocita odnosno nevomelanocita.
3. GNLY se ističe kao dominantna citotoksična molekula u vitiligu i halo nevusu, s izraženom zastupljenošću unutar CD8+ citotoksičnih stanica, što upućuje na njegovu ključnu ulogu u izvršnoj fazi imunopatogeneze obje bolesti i antigen-specifičnom razaranju melanocita.
4. Molekula PRF-a sudjeluje u citotoksičnom odgovoru u vitiligu i halo nevusu, no njezin niži izražaj u usporedbi s GNLY-om upućuje na to da djeluje u sklopu šireg citotoksičnog odgovora, a ne kao dominantna izvršna molekula.
5. Povećani izražaj PRF-2 u lezijama i perilezijskoj koži vitiliga i halo nevusa, osobito u CD68+ makrofagima dermalnih infiltrata, upućuje na to da PRF-2, osim konstitutivne uloge u urođenoj obrani kože, sudjeluje u održavanju lokalne upale i povezivanju urođenog i stečenog imunološkog odgovora, čime doprinosi imunopatogenezi obje bolesti.
6. Dobiveni rezultati potvrđuju da vitiligo i halo nevus dijele slične izvršne citotoksične mehanizme, koji se razlikuju u intenzitetu, prostornoj organizaciji i dinamici imunološkog odgovora, pri čemu halo nevus može predstavljati prikladan model za proučavanje lokaliziranog protumelanocitnog imunološkog odgovora u vitiligu kao sustavnoj imunosno posredovanoj bolesti.

7. LITERATURA

1. Ezzedine K, Eleftheriadou V, Whitton M, van Geel N. Vitiligo. Lancet 2015;386:74-84.
2. Bergqvist C, Ezzedine K. Vitiligo: A Review. Dermatology. 2020;236(6):571-592.
3. Krüger C, Schallreuter KU. Stigmatisation, Avoidance Behaviour and Difficulties in Coping are Common Among Adult Patients with Vitiligo. Acta Derm Venereol 2015;95:553-558.
4. Zhang Y, Cai Y, Shi M i sur. The Prevalence of Vitiligo: A Meta-Analysis. PLoS One 2016;11:e0163806.
5. van Geel N, Speeckaert R, Taieb A i sur. Koebner's phenomenon in vitiligo: European position paper. Pigment Cell Melanoma Res 2011;24:564-573.
6. Spritz RA, Santorico SA. The Genetic Basis of Vitiligo. J Invest Dermatol 2021;141:265-273.
7. Spritz RA, Andersen GH. Genetics of Vitiligo. Dermatol Clin. 2017;35(2):245-255.
8. Shen C, Gao J, Sheng Y, et al. Genetic Susceptibility to Vitiligo: GWAS Approaches for Identifying Vitiligo Susceptibility Genes and Loci. Front Genet 2016;7:3.
9. Kumeta H, Sakakibara H, Enokizono Y i sur. The N-terminal domain of TIR domain-containing adaptor molecule-1, TICAM-1. J Biomol NMR 2014;58:227-230.
10. Jin Y, Mailloux CM, Gowan K i sur. NALP1 in vitiligo-associated multiple autoimmune disease. N Engl J Med 2007;356:1216-1225.
11. Birlea SA, Laberge GS, Procopciuc LM, Fain PR, Spritz RA. CTLA4 and generalized vitiligo: two genetic association studies and a meta-analysis of published data. Pigment Cell Melanoma Res 2009;22:230-234.
12. Wang J, Wicker LS, Santamaria P. IL-2 and its high-affinity receptor: genetic control of immunoregulation and autoimmunity. Semin Immunol 2009;21:363-371.
13. Birlea SA, Gowan K, Fain PR, Spritz RA. Genome-wide association study of generalized vitiligo in an isolated European founder population identifies SMOC2, in close proximity to IDDM8. J Invest Dermatol 2010;130:798-803.
14. Petukhova L, Duvic M, Hordinsky M i sur. Genome-wide association study in alopecia areata implicates both innate and adaptive immunity. Nature 2010;466:113-117.

15. Zhu KJ, Lv YM, Yin XY i sur. Psoriasis regression analysis of MHC loci identifies shared genetic variants with vitiligo. PLoS One 2011;6:e23089.
16. Kucuksezer UC, Duymaz-Tozkir J, Gül A, Saruhan-Direskeneli G. No association of granzyme B gene polymorphism with Behçet's disease. Clin Exp Rheumatol 2009;27:S102.
17. Donn R, Ellison S, Lamb R, Day T, Baildam E, Ramanan AV. Genetic loci contributing to hemophagocytic lymphohistiocytosis do not confer susceptibility to systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. Arthritis Rheum 2008;58:869-874.
18. Faraj S, Kemp EH, Gawkrodger DJ. Patho-immunological mechanisms of vitiligo: the role of the innate and adaptive immunities and environmental stress factors. Clin Exp Immunol 2022;207:27-43.
19. Jin Y, Birlea SA, Fain PR i sur. Variant of TYR and autoimmunity susceptibility loci in generalized vitiligo. N Engl J Med 2010;362:1686-1697.
20. McGlinchey RP, Shewmaker F, McPhie P, Monterroso B, Thurber K, Wickner RB. The repeat domain of the melanosome fibril protein Pmel17 forms the amyloid core promoting melanin synthesis. Proc Natl Acad Sci U S A 2009;106:13731-13736.
21. Lamkanfi M, Kanneganti TD. Caspase-7: a protease involved in apoptosis and inflammation. Int J Biochem Cell Biol 2010;42:21-24.
22. Cohen BE, Mu EW, Orlow SJ. Comparison of Childhood Vitiligo Presenting with or without Associated Halo Nevi. Pediatr Dermatol 2016;33:44-48.
23. Boniface K, Seneschal J, Picardo M, Taïeb A. Vitiligo: Focus on Clinical Aspects, Immunopathogenesis, and Therapy. Clin Rev Allergy Immunol 2018;54:52-67.
24. de Barros JC, Machado Filho CD, Abreu LC i sur. A study of clinical profiles of vitiligo in different ages: an analysis of 669 outpatients. Int J Dermatol 2014;53:842-848.
25. Ezzedine K, Lim HW, Suzuki T i sur. Revised classification/nomenclature of vitiligo and related issues: the Vitiligo Global Issues Consensus Conference. Pigment Cell Melanoma Res 2012;25:E1-E13.
26. Nagarajan A, Masthan MK, Sankar LS, Narayanasamy AB, Elumalai R. Oral manifestations of vitiligo. Indian J Dermatol 2015;60:103.
27. Ezzedine K, Mahé A, van Geel N i sur. Hypochromic vitiligo: delineation of a new entity. Br J Dermatol 2015;172:716-721.

28. Gill L, Zarbo A, Isedeh P, Jacobsen G, Lim HW, Hamzavi I. Comorbid autoimmune diseases in patients with vitiligo: A cross-sectional study. J Am Acad Dermatol 2016;74:295-302.
29. Collins SM, Dominguez M, Ilmarinen T, Costigan C, Irvine AD. Dermatological manifestations of autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy syndrome. Br J Dermatol 2006;154:1088-1093.
30. J Joye A, Suhler E. Vogt-Koyanagi-Harada disease. Curr Opin Ophthalmol 2021;32:574-582.
31. Andrade A, Pithon M. Alezzandrini syndrome: report of a sixth clinical case. Dermatology 2011;222:8-9.
32. Ming JE, Russell KL, McDonald-McGinn DM, Zackai EH. Autoimmune disorders in Kabuki syndrome. Am J Med Genet A 2005;132A:260-262.
33. Rodrigues M, Ezzedine K, Hamzavi I, Pandya AG, Harris JE; Vitiligo Working Group. New discoveries in the pathogenesis and classification of vitiligo. J Am Acad Dermatol 2017;77:1-13.
34. Seneschal J, Boniface K, D'Arino A, Picardo M. An update on Vitiligo pathogenesis. Pigment Cell Melanoma Res 2021;34:236-243.
35. Hlača N, Žagar T, Kaštelan M, Brajac I, Prpić-Massari L. Current Concepts of Vitiligo Immunopathogenesis. Biomedicines 2022;10:1639.
36. Migayron L, Boniface K, Seneschal J. Vitiligo, From Physiopathology to Emerging Treatments: A Review. Dermatol Ther (Heidelb) 2020;10:1185-1198.
37. Xuan Y, Yang Y, Xiang L, Zhang C. The Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Vitiligo: A Culprit for Melanocyte Death. Oxid Med Cell Longev 2022;2022:8498472-12.
38. Speeckaert R, Dugardin J, Lambert J i sur. Critical appraisal of the oxidative stress pathway in vitiligo: a systematic review and meta-analysis. J Eur Acad Dermatol Venereol 2018;32:1089-1098.
39. Wang Y, Li S, Li C. Perspectives of New Advances in the Pathogenesis of Vitiligo: From Oxidative Stress to Autoimmunity. Med Sci Monit 2019;25:1017-1023.
40. Wang XX, Wang QQ, Wu JQ i sur. Increased expression of CXCR3 and its ligands in patients with vitiligo and CXCL10 as a potential clinical marker for vitiligo. Br J Dermatol 2016;174:1318-1326.
41. Passeron T, Malmqvst VEA, Bzioueche H, Marchetti S, Rocchi S, Tulic MK. Increased Activation of Innate Immunity and Pro-Apoptotic CXCR3B in Normal-

Appearing Skin on the Lesional Site of Patients with Segmental Vitiligo. J Invest Dermatol 2022;142:480-483.
42. Tulic MK, Cavazza E, Cheli Y i sur. Innate lymphocyte-induced CXCR3B-mediated melanocyte apoptosis is a potential initiator of T-cell autoreactivity in vitiligo. Nat Commun 2019;10:2178.
43. He Y, Li S, Zhang W i sur. Dysregulated autophagy increased melanocyte sensitivity to H2O2-induced oxidative stress in vitiligo. Sci Rep 2017;7:42394.
44. Jadeja SD, Mayatra JM, Vaishnav J, Shukla N, Begum R. A Concise Review on the Role of Endoplasmic Reticulum Stress in the Development of Autoimmunity in Vitiligo Pathogenesis. Front Immunol 2021;11:624566.
45. Wong PM, Yang L, Yang L i sur. New insight into the role of exosomes in vitiligo. Autoimmun Rev 2020;19:102664.
46. Zhang J, Yu R, Guo X i sur. Identification of TYR, TYRP1, DCT and LARP7 as related biomarkers and immune infiltration characteristics of vitiligo via comprehensive strategies. Bioengineered 2021;12:2214-2227.
47. Birlea SA, Jin Y, Bennett DC i sur. Comprehensive association analysis of candidate genes for generalized vitiligo supports XBP1, FOXP3, and TSLP. J Invest Dermatol 2011;131:371-381.
48. Singh M, Jadeja SD, Vaishnav J i sur. Investigation of the Role of Interleukin 6 in Vitiligo Pathogenesis. Immunol Invest 2022;51:120-137.
49. Mou K, Liu W, Miao Y, Cao F, Li P. HMGB1 deficiency reduces H2 O2 -induced oxidative damage in human melanocytes via the Nrf2 pathway. J Cell Mol Med 2018;22:6148-6156.
50. Zhou T, Li D, Deng Y. Update on the role of noncoding RNAs in vitiligo. Chin Med J (Engl) 2022;135:793-795.
51. Frisoli ML, Essien K, Harris JE. Vitiligo: Mechanisms of Pathogenesis and Treatment. Annu Rev Immunol 2020;38:621-648.
52. Traks T, Keermann M, Karelson M i sur. Polymorphisms in Toll-like receptor genes are associated with vitiligo. Front Genet 2015;6:278.
53. Mosenson JA, Flood K, Klarquist J i sur. Preferential secretion of inducible HSP70 by vitiligo melanocytes under stress. Pigment Cell Melanoma Res 2014;27:209-220.

54. Henning SW, Fernandez MF, Mahon JP i sur. HSP70iQ435A-Encoding DNA Repigments Vitiligo Lesions in Sinclair Swine. J Invest Dermatol 2018;138:2531-2539.
55. Cui T, Zhang W, Li S i sur. Oxidative Stress-Induced HMGB1 Release from Melanocytes: A Paracrine Mechanism Underlying the Cutaneous Inflammation in Vitiligo. J Invest Dermatol 2019;139:2174-2184.
56. Zhang Y, Liu L, Jin L i sur. Oxidative stress-induced calreticulin expression and translocation: new insights into the destruction of melanocytes. J Invest Dermatol 2014;134:183-191.
57. Boniface KP Thierry; Seneschal, Julien; Tulic, Meri K. Targeting Innate Immunity to Combat Cutaneous Stress: The Vitiligo Perspective. Front Immunol 2021;12:613056–613056.
58. Zhuang T, Yi X, Chen J i sur. Intracellular virus sensor MDA5 exacerbates vitiligo by inducing the secretion of chemokines in keratinocytes under virus invasion. Cell Death Dis 2020;11:453.
59. Bzioueche H, Simonyté Sjödin K, West CE i sur. Analysis of Matched Skin and Gut Microbiome of Patients with Vitiligo Reveals Deep Skin Dysbiosis: Link with Mitochondrial and Immune Changes. J Invest Dermatol 2021;141:2280-2290.
60. Gholijani N, Yazdani MR, Dastgheib L. Predominant role of innate pro-inflammatory cytokines in vitiligo disease. Arch Dermatol Res 2020;312:123-131.
61. Yu R, Broady R, Huang Y i sur. Transcriptome analysis reveals markers of aberrantly activated innate immunity in vitiligo lesional and non-lesional skin. PLoS One 2012;7:e51040.
62. Jin Y, Andersen G, Yorgov D i sur. Genome-wide association studies of autoimmune vitiligo identify 23 new risk loci and highlight key pathways and regulatory variants. Nat Genet 2016;48:1418-1424.
63. Bertolotti A, Boniface K, Vergier B i sur. Type I interferon signature in the initiation of the immune response in vitiligo. Pigment Cell Melanoma Res 2014;27:398-407.
64. Srivastava N, Bishnoi A, Parsad D, Kumaran MS, Vinay K, Gupta S. Dendritic cells sub-sets are associated with inflammatory cytokine production in progressive vitiligo disease. Arch Dermatol Res 2021;313:759-767.
65. Regazzetti C, Joly F, Marty C i sur. Transcriptional Analysis of Vitiligo Skin Reveals the Alteration of WNT Pathway: A Promising Target for Repigmenting Vitiligo Patients. J Invest Dermatol 2015;135:3105-3114.

66. Yang L, Wei Y, Sun Y i sur. Interferon-gamma Inhibits Melanogenesis and Induces Apoptosis in Melanocytes: A Pivotal Role of CD8+ Cytotoxic T Lymphocytes in Vitiligo. Acta Derm Venereol 2015;95:664-670.
67. Bergqvist C, Ezzedine K. Vitiligo: A focus on pathogenesis and its therapeutic implications. J Dermatol 2021;48:252-270.
68. Richmond JM, Bangari DS, Essien KI i sur. Keratinocyte-Derived Chemokines Orchestrate T-Cell Positioning in the Epidermis during Vitiligo and May Serve as Biomarkers of Disease. J Invest Dermatol 2017;137:350-358.
69. Benzekri L, Gauthier Y. Clinical markers of vitiligo activity. J Am Acad Dermatol 2017;76:856-862.
70. Hassan AS, Kohil MM, Sayed SSE, Mahmoud SB. Immunohistochemical study of perforin and apoptosis stimulation fragment ligand (FasL)in active vitiligo. Arch Dermatol Res 2021;313:453-460.
71. Maloy KJ, Powrie F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. Nat Immunol 2001;2:816-822.
72. Giri PS, Dwivedi M, Laddha NC, Begum R, Bharti AH. Altered expression of nuclear factor of activated T cells, forkhead box P3, and immune-suppressive genes in regulatory T cells of generalized vitiligo patients. Pigment Cell Melanoma Res 2020;33:566-578.
73. Giri PS, Dwivedi M, Begum R. Decreased suppression of CD8+ and CD4+ T cells by peripheral regulatory T cells in generalized vitiligo due to reduced NFATC1 and FOXP3 proteins. Exp Dermatol 2020;29:759-775.
74. Ben Ahmed M, Zaraa I, Rekik R i sur. Functional defects of peripheral regulatory T lymphocytes in patients with progressive vitiligo. Pigment Cell Melanoma Res 2012;25:99-109.
75. Le Poole IC, Mehrotra S. Replenishing Regulatory T Cells to Halt Depigmentation in Vitiligo. J Investig Dermatol Symp Proc 2017;18:S38-S45.
76. Dwivedi M, Kemp EH, Laddha NC, Mansuri MS, Weetman AP, Begum R. Regulatory T cells in vitiligo: Implications for pathogenesis and therapeutics. Autoimmun Rev 2015;14:49-56.
77. Clark RA. Resident memory T cells in human health and disease. Sci Transl Med 2015;7:269rv1.

78. Boniface K, Jacquemin C, Darrigade AS i sur. Vitiligo Skin Is Imprinted with Resident Memory CD8 T Cells Expressing CXCR3. J Invest Dermatol 2018;138:355-364.
79. Cheuk S, Schlums H, Gallais Sérézal I i sur. CD49a Expression Defines Tissue-Resident CD8+ T Cells Poised for Cytotoxic Function in Human Skin. Immunity 2017;46:287-300.
80. Frączek A, Owczarczyk-Saczonek A, Placek W. The Role of TRM Cells in the Pathogenesis of Vitiligo-A Review of the Current State-Of-The-Art. Int J Mol Sci 2020;21:3552.
81. Boniface K, Seneschal J. Vitiligo as a skin memory disease: The need for early intervention with immunomodulating agents and a maintenance therapy to target resident memory T cells. Exp Dermatol 2019;28:656-661.
82. Martins C, Darrigade AS, Jacquemin C i sur. Phenotype and function of circulating memory T cells in human vitiligo. Br J Dermatol 2020;183:899-908.
83. Richmond JM, Strassner JP, Zapata L Jr i sur. Antibody blockade of IL-15 signaling has the potential to durably reverse vitiligo. Sci Transl Med 2018;10:eaam7710.
84. Toussirot É, Aubin F. Paradoxical reactions under TNF-α blocking agents and other biological agents given for chronic immune-mediated diseases: an analytical and comprehensive overview. RMD Open 2016;2:e000239.
85. Chen X, Guo W, Chang Y i sur. Oxidative stress-induced IL-15 trans-presentation in keratinocytes contributes to CD8+ T cells activation via JAK-STAT pathway in vitiligo. Free Radic Biol Med 2019;139:80-91.
86. Singh RK, Lee KM, Vujkovic-Cvijin I i sur. The role of IL-17 in vitiligo: A review. Autoimmun Rev 2016;15:397-404.
87. Sushama S, Dixit N, Gautam RK, Arora P, Khurana A, Anubhuti A. Cytokine profile (IL-2, IL-6, IL-17, IL-22, and TNF-α) in vitiligo-New insight into pathogenesis of disease. J Cosmet Dermatol 2019;18:337-341.
88. Speeckaert R, Mylle S, van Geel N. IL-17A is not a treatment target in progressive vitiligo. Pigment Cell Melanoma Res 2019;32:842-847.
89. Weyant GW, Chung CG, Helm KF. Halo nevus: review of the literature and clinicopathologic findings. Int J Dermatol 2015;54:e433-e435.
90. Yang Y, Li S, Zhu G i sur. A similar local immune and oxidative stress phenotype in vitiligo and halo nevus. J Dermatol Sci 2017;87:50-59.

91. Musette P, Bachelez H, Flageul B i sur. Immune-mediated destruction of melanocytes in halo nevi is associated with the local expansion of a limited number of T cell clones. J Immunol 1999;162:1789-1794.
92. Herd RM, Hunter JA. Familial halo naevi. Clin Exp Dermatol 1998;23:68-69.
93. Patrizi A, Bentivogli M, Raone B, Dondi A, Tabanelli M, Neri I. Association of halo nevus/i and vitiligo in childhood: a retrospective observational study. J Eur Acad Dermatol Venereol 2013;27:e148-e152.
94. Botella-Estrada R, Kutzner H. Study of the immunophenotype of the inflammatory cells in melanomas with regression and halo nevi. Am J Dermatopathol 2015;37:376-380.
95. Nedelcu RI, Zurac SA, Brînzea A i sur. Morphological features of melanocytic tumors with depigmented halo: review of the literature and personal results. Rom J Morphol Embryol 2015;56:659-663.
96. Rongioletti F, Cecchi F, Rebora A. Halo phenomenon in melanocytic nevi (Sutton's nevi). Does the diameter matter?. J Eur Acad Dermatol Venereol 2011;25(:1231-1232.
97. Vural AT, Güleç AT. Halo phenomenon is not restricted to melanocytic lesions. Indian J Dermatol Venereol Leprol 2022;88:656-657.
98. Basak PY, Meric G, Ciris M. Basal cell carcinoma with halo phenomenon in a young female: significance of dermatoscopy in early diagnosis. Indian J Dermatol 2015;60:214.
99. Haliasos EC, Kerner M, Jaimes N i sur. Dermoscopy for the pediatric dermatologist part III: dermoscopy of melanocytic lesions. Pediatr Dermatol 2013;30:281-293.
100. Margileth AM. Spontaneous Regression of Large Congenital Melanocytic Nevi, With a Halo Rim in 17 Children With Large Scalp and Trunk Nevi During 45 Years: A Review of the Literature. Clin Pediatr (Phila) 2019;58:313-319.
101. van Geel N, Speeckaert R, Lambert J i sur. Halo naevi with associated vitiligo-like depigmentations: pathogenetic hypothesis. J Eur Acad Dermatol Venereol 2012;26:755-761.
102. van Geel N, Vandenhaute S, Speeckaert R i sur. Prognostic value and clinical significance of halo naevi regarding vitiligo. Br J Dermatol 2011;164:743-749.
103. Zhou H, Wu LC, Chen MK, Liao QM, Mao RX, Han JD. Factors Associated with Development of Vitiligo in Patients with Halo Nevus. Chin Med J (Engl) 2017;130:2703-2708.

104. Bello-Quintero CE, Gonzalez ME, Alvarez-Connelly E. Halo nevi in Turner syndrome. Pediatr Dermatol 2010;27:368-369.
105. Zeff RA, Freitag A, Grin CM, Grant-Kels JM. The immune response in halo nevi. J Am Acad Dermatol 1997;37:620-624.
106. Speeckaert R, van Geel N, Luiten RM i sur. Melanocyte-specific immune response in a patient with multiple regressing nevi and a history of melanoma. Anticancer Res 2011;31:3697-3703.
107. Fernandez-Flores A, Saeb-Lima M. The inflammatory infiltrate of melanocytic nevus. Rom J Morphol Embryol 2014;55:1277-1285.
108. Liu X, Lieberman J. Knocking 'em Dead: Pore-Forming Proteins in Immune Defense. Annu Rev Immunol 2020;38:455-485.
109. Ding J, Wang K, Liu W, et al. Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family. Nature 2016;535:111-116.
110. Dotiwala F, Lieberman J. Granulysin: killer lymphocyte safeguard against microbes. Curr Opin Immunol 2019;60:19-29.
111. Sparrow E, Bodman-Smith MD. Granulysin: The attractive side of a natural born killer. Immunol Lett 2020;217:126-132.
112. Wang J, Deobald K, Re F. Gasdermin D Protects from Melioidosis through Pyroptosis and Direct Killing of Bacteria. J Immunol 2019;202:3468-3473.
113. Maeda Y, Tamura T, Fukutomi Y, Mukai T, Kai M, Makino M. A lipopeptide facilitate induction of Mycobacterium leprae killing in host cells. PLoS Negl Trop Dis 2011;5:e1401.
114. Guipouy D, Gertner-Dardenne J, Pfajfer L, German Y, Belmonte N, Dupré L. Granulysin- and granzyme-dependent elimination of myeloid cells by therapeutic ova-specific type 1 regulatory T cells. Int Immunol 2019;31:239-250.
115. Lettau M, Dietz M, Dohmen K, Leippe M, Kabelitz D, Janssen O. Granulysin species segregate to different lysosome-related effector vesicles (LREV) and get mobilized by either classical or non-classical degranulation. Mol Immunol 2019;107:44-53.
116. Wang Z, Choice E, Kaspar A i sur. Bactericidal and tumoricidal activities of synthetic peptides derived from granulysin. J Immunol 2000;165:1486-1490.
117. Kaspar AA, Okada S, Kumar J i sur. A distinct pathway of cell-mediated apoptosis initiated by granulysin. J Immunol 2001;167:350-356.

118. Saini RV, Wilson C, Finn MW, Wang T, Krensky AM, Clayberger C. Granulysin delivered by cytotoxic cells damages endoplasmic reticulum and activates caspase-7 in target cells. J Immunol 2011;186:3497-3504.
119. Pitabut N, Sakurada S, Tanaka T i sur. Potential function of granulysin, other related effector molecules and lymphocyte subsets in patients with TB and HIV/TB coinfection. Int J Med Sci 2013;10:1003-1014.
120. Dotiwala F, Mulik S, Polidoro RB i sur. Killer lymphocytes use granulysin, perforin and granzymes to kill intracellular parasites. Nat Med 2016;22:210-216.
121. Walch M, Dotiwala F, Mulik S i sur. Cytotoxic cells kill intracellular bacteria through granulysin-mediated delivery of granzymes. Cell 2014;157:1309-1323.
122. Chung WH, Hung SI, Yang JY i sur. Granulysin is a key mediator for disseminated keratinocyte death in Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. Nat Med 2008;14:1343-1350.
123. Krensky AM, Clayberger C. Biology and clinical relevance of granulysin. Tissue Antigens 2009;73:193-198.
124. Vičić M, Brajac I, Kaštelan M, Sotošek V, Prpić Massari L. Elevated Granulysin Expression in Cytotoxic Lymphocytes from the Blood and Lesions of Patients with Lichen Planus. Acta Derm Venereol 2021;101:adv00499.
125. Vičić M, Kaštelan M, Sotošek Tokmadžić V, Prpić Massari L. Systemic and Local Increase of Granulysin Expression in Cytotoxic Lymphocytes in Severe Psoriasis. Acta Derm Venereol 2019;99:1136-1142.
126. Veljkovic Vujaklija D, Dominovic M, Gulic T i sur. Granulysin expression and the interplay of granulysin and perforin at the maternal-fetal interface. J Reprod Immunol 2013;97:186-196.
127. Saigusa S, Ichikura T, Tsujimoto H i sur. Serum granulysin level as a novel prognostic marker in patients with gastric carcinoma. J Gastroenterol Hepatol 2007;22:1322-1327.
128. Voskoboinik I, Dunstone MA, Baran K, Whisstock JC, Trapani JA. Perforin: structure, function, and role in human immunopathology. Immunol Rev 2010;235:35-54.
129. Law RH, Lukoyanova N, Voskoboinik I i sur. The structural basis for membrane binding and pore formation by lymphocyte perforin. Nature 2010;468:447-451.
130. Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. Nat Rev Immunol 2002;2:735-747.

131. Osińska I, Popko K, Demkow U. Perforin: an important player in immune response. Cent Eur J Immunol 2014;39:109-115.
132. Ivanova ME, Lukoyanova N, Malhotra S i sur. The pore conformation of lymphocyte perforin. Sci Adv 2022;8:eabk3147.
133. Voskoboinik I, Smyth MJ, Trapani JA. Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis. Nat Rev Immunol 2006;6:940-952.
134. Rudd-Schmidt JA, Hodel AW, Noori T i sur. Lipid order and charge protect killer T cells from accidental death. Nat Commun 2019;10:5396.
135. Voskoboinik I, Whisstock JC, Trapani JA. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. Nat Rev Immunol 2015;15:388-400.
136. House IG, House CM, Brennan AJ i sur. Regulation of perforin activation and pre-synaptic toxicity through C-terminal glycosylation. EMBO Rep 2017;18:1775-1785.
137. Kastelan M, Prpić Massari L, Gruber F i sur. Perforin expression is upregulated in the epidermis of psoriatic lesions. Br J Dermatol 2004;151:831-836.
138. Prpić Massari L, Kastelan M, Gruber F i sur. Perforin expression in peripheral blood lymphocytes and skin-infiltrating cells in patients with lichen planus. Br J Dermatol 2004;151:433-439.
139. Park YW, Kee SJ, Cho YN i sur. Impaired differentiation and cytotoxicity of natural killer cells in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 2009;60:1753-1763.
140. Gross CC, Meyer C, Bhatia U i sur. CD8+ T cell-mediated endotheliopathy is a targetable mechanism of neuro-inflammation in Susac syndrome. Nat Commun 2019;10:5779.
141. Kaskow BJ, Baecher-Allan C. Effector T Cells in Multiple Sclerosis. Cold Spring Harb Perspect Med 2018;8:a029025.
142. Galiano-Landeira J, Torra A, Vila M, Bové J. CD8 T cell nigral infiltration precedes synucleinopathy in early stages of Parkinson's disease. Brain 2020;143:3717-3733.
143. 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;98:470-477.
144. Thomas HE, Trapani JA, Kay TW. The role of perforin and granzymes in diabetes. Cell Death Differ 2010;17:577-585.

145. Spicer JA, Huttunen KM, Jose J i sur. Small Molecule Inhibitors of Lymphocyte Perforin as Focused Immunosuppressants for Infection and Autoimmunity. J Med Chem 2022;65:14305-14325.
146. Koike H, Kanda T, Sumino H i sur. Reduction of viral myocarditis in mice lacking perforin. Res Commun Mol Pathol Pharmacol 2001;110:229-237.
147. Gebhard JR, Perry CM, Harkins S i sur. Coxsackievirus B3-induced myocarditis: perforin exacerbates disease, but plays no detectable role in virus clearance. Am J Pathol 1998;153:417-428.
148. Novais FO, Carvalho LP, Graff JW i sur. Cytotoxic T cells mediate pathology and metastasis in cutaneous leishmaniasis. PLoS Pathog 2013;9:e1003504.
149. Dekker SE, Green EW, Ahn J. Treatment and Prevention of Acute Hepatitis B Virus. Clin Liver Dis 2021;25:711-724.
150. Bayly-Jones C, Pang SS, Spicer BA, Whisstock JC, Dunstone MA. Ancient but Not Forgotten: New Insights Into MPEG1, a Macrophage Perforin-Like Immune Effector. Front Immunol 2020;11:581906.
151. McCormack RM, de Armas LR, Shiratsuchi M i sur. Perforin-2 is essential for intracellular defense of parenchymal cells and phagocytes against pathogenic bacteria. Elife 2015;4:e06508.
152. Merselis LC, Rivas ZP, Munson GP. Breaching the Bacterial Envelope: The Pivotal Role of Perforin-2 (MPEG1) Within Phagocytes. Front Immunol 2021;12:597951.
153. Ni T, Gilbert RJC. Repurposing a pore: highly conserved perforin-like proteins with alternative mechanisms. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2017;372:20160212.
154. Jiao F, Dehez F, Ni T i sur. Perforin-2 clockwise hand-over-hand pre-pore to pore transition mechanism. Nat Commun 2022;13:5039.
155. Ni T, Jiao F, Yu X i sur. Structure and mechanism of bactericidal mammalian perforin-2, an ancient agent of innate immunity. Sci Adv 2020;6:eaax8286.
156. Strbo N, Pastar I, Romero L i sur. Single cell analyses reveal specific distribution of anti-bacterial molecule Perforin-2 in human skin and its modulation by wounding and Staphylococcus aureus infection. Exp Dermatol 2019;28:225-232.
157. Xiong P, Shiratsuchi M, Matsushima T i sur. Regulation of expression and trafficking of perforin-2 by LPS and TNF-α. Cell Immunol 2017;320:1-10.
158. McCormack R, Hunte R, Podack ER, Plano GV, Shembade N. An Essential Role for Perforin-2 in Type I IFN Signaling. J Immunol 2020;204:2242-2256.

159. van Geel N, Lommerts J, Bekkenk M i sur. Development and Validation of the Vitiligo Extent Score (VES): an International Collaborative Initiative. J Invest Dermatol 2016;136:978-984.
160. Bankhead P, Loughrey MB, Fernández JA i sur. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. Sci Rep 2017;7:16878.
161. Picardo M, Dell'Anna ML, Ezzedine K i sur. Vitiligo. Nat Rev Dis Primers 2015;1:15011.
162. Spritz RA. Six decades of vitiligo genetics: genome-wide studies provide insights into autoimmune pathogenesis. J Invest Dermatol 2012;132:268-273.
163. Harris JE, Harris TH, Weninger W, Wherry EJ, Hunter CA, Turka LA. A mouse model of vitiligo with focused epidermal depigmentation requires IFN-γ for autoreactive $CD8^+$ T-cell accumulation in the skin. J Invest Dermatol 2012;132:1869-1876.
164. Rashighi M, Harris JE. Vitiligo Pathogenesis and Emerging Treatments. Dermatol Clin 2017;35:257-265.
165. Richmond JM, Masterjohn E, Chu R, Tedstone J, Youd ME, Harris JE. CXCR3 Depleting Antibodies Prevent and Reverse Vitiligo in Mice. J Invest Dermatol 2017;137:982-985.
166. Dal Peraro M, van der Goot FG. Pore-forming toxins: ancient, but never really out of fashion. Nat Rev Microbiol 2016;14:77-92.
167. Vičić M, Sotošek V, Brajac I, Kaštelan M, Prpić-Massari L. The possible involvement of granulysin mediated cytotoxicity in keratinocytes disruption in lichen planus. Med Hypotheses 2021;149:110546.
168. Tewary P, Yang D, de la Rosa G i sur. Granulysin activates antigen-presenting cells through TLR4 and acts as an immune alarmin. Blood 2010;116:3465-3474.
169. Abe R, Yoshioka N, Murata J, Fujita Y, Shimizu H. Granulysin as a marker for early diagnosis of the Stevens-Johnson syndrome. Ann Intern Med 2009;151:514-515.
170. Lieberman J. Granzyme A activates another way to die. Immunol Rev 2010;235:93-104.
171. McCormack RM, Szymanski EP, Hsu AP i sur. MPEG1/perforin-2 mutations in human pulmonary nontuberculous mycobacterial infections. JCI Insight 2017;2:e89635.
172. Nedelcu R, Dobre A, Brinzea A i sur. Current Challenges in Deciphering Sutton Nevi-Literature Review and Personal Experience. J Pers Med 2021;11:904.

173. Zhou H, Wu LC, Chen MK, Liao QM, Mao RX, Han JD. Factors Associated with Development of Vitiligo in Patients with Halo Nevus. Chin Med J (Engl) 2017;130:2703-2708.
174. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. Nat Immunol 2008;9:503-510.
175. Hlača N, Vičić M, Kaštelan M, Dekanić A, Prpić-Massari L. Analysis of granulysin expression in vitiligo and halo-nevus. Sci Rep 2024;14:16580.
176. Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R i sur. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. Science 1998;282:121-125.
177. McCormack R, de Armas LR, Shiratsuchi M, Ramos JE, Podack ER. Inhibition of intracellular bacterial replication in fibroblasts is dependent on the perforin-like protein (perforin-2) encoded by macrophage-expressed gene 1. J Innate Immun 2013;5:185-194.
178. Pang SS, Bayly-Jones C, Radjainia M i sur. The cryo-EM structure of the acid activatable pore-forming immune effector Macrophage-expressed gene 1. Nat Commun 2019;10:4288.

POPIS POKRATA

APC	stanica koja predočuje antigen (od engl. *Antigen Presenting Cell*)
BSA	tjelesna površina (od engl. *Body Surface Area*)
CD	klaster diferencijacije (od engl. *Cluster of Differentiation*)
CLA	kožni limfocitni antigen (od engl. *Cutaneous Lymphocyte Antigen*)
CRT	kalretikulin (od engl. *Calreticulin*)
CSV	citotoksične sekretorne vezikule (od engl. *Cytotoxic Secretory Vesicles*)
CXCL10	kemokinski ligand 10 (od engl. *C-X-C Motif Ligand 10*)
CXCL9	kemokinski ligand 9 (od engl. *C-X-C Motif Ligand 9*)
CXCR3	kemokinski receptor tipa 3 (od engl. *C-X-C Motif Chemokine Receptor 3*)
DAMP	molekularni uzorci povezani s oštećenjima (od engl. *Damage-Associated Molecular Patterns*)
DC	dendritičke stanice (od engl. *Dendritic Cells*)
DM1	dijabetes melitus tip 1
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (od engl. *Deoxyribonucleic Acid*)
EEA1	rani endosomski antigen 1 (od engl. *Early Endosome Antigen 1*)
EGF	epidermalni čimbenik rasta (od engl. *Epidermal Growth Factor*)
ER	endoplazmatski retikulum
FasL	ligand Fas receptora (od engl. *Fas Ligand*)
GNLY	granulizin (od engl. *Granulysin*)

GWAS	cjelogenomske asocijacijske studije (od engl. *Genome-Wide Association Studies)*
HLA	ljudski leukocitni antigen (od engl. *Human Leukocyte Antigen*)
HMGB1	protein B1 skupine visoke pokretljivosti (od engl. *High-Mobility Group Protein B1)*
HN	halo nevus
HSP	protein toplinskog šoka (od engl. *Heat Shock Protein*)
IFN-α	interferon alfa (od engl. *Interferon Alpha*)
IFN-β	interferon beta (od engl. *Interferon Beta*)
IFN-γ	interferon gama (od engl. *Interferon Gamma*)
IFNAR	receptor za interferon-α/β (od engl. *Interferon-α/β receptor*)
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin (od engl. *Interleukin*)
ILC	urođene limfoidne stanice (od engl. *Innate Lymphoid Cells*)
IMID	upalne imunosno posredovane bolesti (od engl. *Immune-Mediated Inflammatory Disease*)
JAK-STAT	Janus kinaza – pretvarač signala i aktivator transkripcije (od engl. *Janus Kinases – Signal Transducer and Activator of Transcription Proteins)*
KBC	Klinički bolnički centar
KLRC1	receptor C1 stanica ubojica sličan lektinu (od engl. *Killer Cell Lectin-like Receptor C1*)
LAMP	membranski protein povezan s lizosomom (od engl. *Lysosome-Associated Membrane Protein*)

LDL	lipoprotein niske gustoće (od engl. *Low-Density Lipoprotein*)
LPS	lipopolisaharid
MACPF	domena slična membranskom napadačkom kompleksu/perforinu (od engl. *Membrane Attack Complex/Perforin Domain*)
MAPK	protein kinaza aktivirana mitogenom (od engl. *Mitogen-Activated Protein Kinase*)
MAU	melanocitna antigena jedinica (od engl. *Melanocyte Antigenic Unit*)
MDA5	protein 5 povezan s diferencijacijom melanoma (od engl. *Melanoma Differentiation-Associated Protein 5*)
MHC	glavni sustav tkivne podudarnosti (od engl. *Major Histocompatibility Complex*)
miRNA	mikroRNA (od engl. *microRNA*)
MLKL	pseudokinaza slična domeni kinaze miješane loze (od engl. *Mixed Lineage Kinase Domain-Like Pseudokinase*)
MPEG1	gen 1 izražen u makrofagima (od engl. *Macrophage Expressed Gene 1*)
MRSA	zlatni stafilokok otporan na meticilin (od engl. *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*)
ncRNA	nekodirajuće RNA (od engl. *Non-coding RNA*)
NF-κB	jezgreni čimbenik kapa B (od engl. *Nuclear Factor Kappa B)*
NK stanica	prirodnoubilačka stanica (od engl. *Natural Killer Cell*)
NKG2D	receptor stanica ubojica grupe 2D sličan C obliku lektina (od engl. *C-type lectin-like receptor Natural Killer Group 2D*)
NKTR	receptor aktivacije stanica prirodnih ubojica (od engl. *Natural Killer Cell Triggering Receptor*)

NLR	receptori za domenu sličnu oligomerizaciji nukleotida (od engl. *Nucleotide Oligomerization Domain–Like Receptors*)
NRF2	čimbenik 2 povezan s nuklearnim eritroidnim čimbenikom 2 (od engl. *Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2*)
NS	nije značajno (od engl. *Non-significant*)
NSV	nesegmentalni vitiligo
PAF	čimbenik aktivacije trombocita (od engl. *Platelet Activation Factor*)
PAMP	molekularni obrasci povezani s patogenima (od engl. *Pathogen-Associated Molecular Patterns*)
pDC	plazmocitoidna dendritična stanica (od engl. *Plasmacytoid Dendritic Cell*)
PFP	proteini koji stvaraju pore u membranama (od engl. *Pore Forming Proteins*)
PRF	perforin
PRF-2	perforin-2
PRR	receptori za prepoznavanje uzoraka (od engl. *Pattern Recognition Receptors*)
RLR	receptori slični RIG-I (od engl. *RIG-I-like receptors)*
RNA	ribonukleinska kiselina (od engl. *Ribonucleic Acid)*
ROS	reaktivne kisikove vrste (od engl*. Reactive Oxygen Species*)
SAD	Sjedinjene Američke Države
SV	segmentalni vitiligo
TCR	receptor T-limfocita (od engl. *T-Cell Receptor*)

Th	pomoćnički limfocit T (od engl. *Helper T-Cell*)
TLR	receptor sličan Tollu (od engl.*Toll-like receptor*)
TNF-α	čimbenik nekroze tumora alfa (od engl. *Tumor Necrosis Factor-α*)
TRAIL	TNF-srodni ligand koji inducira apoptozu (od engl. *Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand*)
Treg	regulacijski T-limfocit (od engl. *Regulatory T-cell*)
Trm	tkivno-rezidentni memorijski limfocit T (od engl. *Tissue Resident Memory T-cell*)
TYK2	tirozin kinaza 2 (od engl. *Tyrosine kinase 2*)
TYRP1	protein-1 povezan s tirozinazom (od engl. *Tyrosinase-related protein 1)*
UK	Ujedinjeno Kraljevstvo
UPR	odgovor na nepravilno savijene proteine (od engl. *Unfolded Protein Response*)
UV	ultraljubičasto zračenje (od engl. *Ultraviolet*)
VES	indeks proširenosti vitiliga (od engl. *Vitiligo Extent Score*)
VIDA	indeks aktivnosti vitiliga (od engl. *Vitiligo Disease Activity*)

ILUSTRACIJE

Popis slika:

Slika 1. Klinička slika vitiliga.

Slika 2. Shematski prikaz imunopatogeneze vitiliga.

Slika 3. Klinička slika halo nevusa.

Slika 4. Građa i mehanizam djelovanja perforina i granulizina.

Slika 5. Shematski prikaz građe i mehanizma djelovanja perforina-2.

Slika 6. GNLY+ stanice u: (A) leziji vitiliga, (B) perilezijskoj koži te u (C) zdravoj koži (povećanje 200x).

Slika 7. Postotak GNLY+ stanica među stanicama: (A) epidermisa lezije, perilezijske i zdrave kože; (B) dermisa lezije, perilezijske i zdrave kože i (C) epidermisa i dermisa lezije, perilezije i zdrave kože kontrolne skupine.

Slika 8. CD8+ i CD56+ stanice u: (A,D) leziji vitiliga, (B,E) perilezijskoj koži te (C,F) u zdravoj koži kontrolne skupine (povećanje 200x).

Slika 9. Postotak CD8+ i CD56+ stanica među stanicama: (A,D) epidermisa lezija vitiliga, perilezijske kože i zdrave kože; (B,E) dermisa lezija vitiliga, perilezijske kože i zdrave kože; (C,F) epidermisa i dermisa lezija vitiliga, perilezijske i zdrave kože.

Slika 10. CD8+GNLY+ i CD56+GNLY+ stanice u: (A,D) leziji vitiliga, (B,E) perilezijskoj koži te (C,F) u zdravoj koži kontrolne skupine (povećanje 200x).

Slika 11. Udio CD8+GNLY+ stanica unutar subpopulacije citotoksičnih limfocita T (CD3+CD8+) u: (A) epidermisu lezija vitiliga, perilezijskoj koži i zdravoj koži; (B) dermisu lezija vitiliga, perilezijskoj koži i zdravoj koži; (C) epidermisu i dermisu lezija vitiliga, perilezijske i zdrave kože.

Slika 12. Udio CD56+GNLY+ stanica unutar subpopulacije citotoksičnih stanica NK (CD3-CD56+) u: (A) epidermisu lezija vitiliga, perilezijske kože i zdrave kože; (B) dermisu lezija vitiliga, perilezijske kože i zdrave kože; (C) epidermisu i dermisu lezija vitiliga, perilezijske i zdrave kože.

Slika 13. Korelacijski dijagrami povezanosti udjela GNLY+ stanica u lezijama vitiliga s aktivnošću bolesti, (A) VIDA zbrojem i proširenošću bolesti, (B) VES zbrojem.

Slika 14. PRF+ stanice u: (A) leziji vitiliga, (B) perilezijskoj koži te u (C) zdravoj koži (povećanje 200x).

Slika 15. Postotak PRF+ stanica među stanicama: (A) epidermisa lezije i perilezijske kože vitiliga te zdrave kože; (B) dermisa lezije i perilezijske kože vitiliga te zdrave kože i (C) epidermisa i dermisa lezije i perilezije vitiliga te zdrave kože kontrolne skupine.

Slika 16. CD8+PRF+ i CD56+PRF+ stanice u: (A,D) leziji vitiliga, (B,E) perilezijskoj koži te u (C,F) zdravoj koži kontrolne skupine (povećanje 200x).

Slika 17. Udio CD8+PRF+ stanica unutar subpopulacije citotoksičnih limfocita T (CD3+CD8+) u: (A) epidermisu lezija vitiliga, perilezijskoj koži i zdravoj koži; (B) dermisu lezija vitiliga, perilezijskoj koži i zdravoj koži; (C) epidermisu i dermisu lezija vitiliga, perilezijske i zdrave kože.

Slika 18. Udio CD56+PRF+ stanica unutar subpopulacije citotoksičnih stanica NK (CD3-CD56+) u: (A) epidermisu lezija vitiliga, perilezijske kože i zdrave kože; (B) dermisu lezija vitiliga, perilezijske kože i zdrave kože; (C) epidermisu i dermisu lezija vitiliga, perilezijske i zdrave kože.

Slika 19. Korelacijski dijagrami povezanosti udjela PRF+ stanica u lezijama vitiliga s aktivnošću bolesti, (A) VIDA zbrojem i proširenošću bolesti, (B) VES zbrojem.

Slika 20. PRF-2+ stanice u: (A) leziji vitiliga, (B) perilezijskoj koži te u (C) zdravoj koži (povećanje 200x).

Slika 21. Postotak PRF-2+ stanica među stanicama: (A) epidermisa lezije i perilezijske kože vitiliga te zdrave kože; (B) dermisa lezije i perilezijske kože vitiliga te zdrave kože i (C) epidermisa i dermisa lezije i perilezije vitiliga te zdrave kože kontrolne skupine.

Slika 22. CD68+PRF-2+ stanice u: (A) leziji vitiliga, (B) perilezijskoj koži te (C) u zdravoj koži kontrolne skupine (povećanje 200x).

Slika 23. Udio CD68+PRF-2+ stanica unutar subpopulacije makrofaga (CD68+) u: (A) epidermisu lezija vitiliga, perilezijske kože i zdrave kože; (B) dermisu lezija vitiliga, perilezijske kože i zdrave kože; (C) epidermisu i dermisu lezija vitiliga, perilezijske i zdrave kože.

Slika 24. Korelacijski dijagrami povezanosti udjela PRF-2+ stanica u lezijama vitiliga s aktivnošću bolesti, (A) VIDA zbrojem i proširenošću bolesti, (B) VES zbrojem.

Slika 25. GNLY+ stanice u: (A) leziji halo nevusa, (B) perilezijskoj koži halo nevusa i (C) zdravoj koži kontrolne skupine (povećanje 200x).

Slika 26. Postotak GNLY+ stanica među stanicama: (A) epidermisa lezije, perilezije halo nevusa i zdrave kože (B) dermisa lezije, perilezije halo nevusa i zdrave kože te (C) epidermisa i dermisa lezije, perilezije halo nevusa te zdrave kože.

Slika 27. CD8+ i CD56+ stanice u: (A,D) leziji halo nevusa, (B,E) perilezijskoj koži te (C,F) u zdravoj koži kontrolne skupine (povećanje 200x).

Slika 28. Postotak CD8+ i CD56+ stanica među stanicama: (A,D) epidermisa lezija halo nevusa, perilezijske kože i zdrave kože; (B,E) dermisa lezija halo nevusa, perilezijske kože i zdrave kože; (C,F) epidermisa i dermisa lezija vitiliga, perilezijske i zdrave kože.

Slika 29. CD8+GNLY+ i CD56+GNLY+ stanice u: (A,D) leziji halo nevusa; (B,E) perilezijskoj koži; (C,F) u zdravoj koži (povećanje 200x).

Slika 30. Udio CD8+GNLY+ stanica unutar subpopulacije citotoksičnih stanica T (CD3+CD8+) u: (A) epidermisu lezija halo nevusa, perilezijske kože i zdrave kože; (B) dermisu lezija halo nevusa, perilezijske kože i zdrave kože; (C) epidermisu i dermisu lezija halo nevusa, perilezijske i zdrave kože.

Slika 31. Udio CD56+GNLY+ stanica unutar subpopulacije citotoksičnih stanica NK (CD3-CD56+) u: (A) epidermisu lezija halo nevusa, perilezijske kože i zdrave kože; (B)

dermisu lezija halo nevusa, perilezijske kože i zdrave kože; (C) epidermisu i dermisu lezija halo nevusa, perilezijske i zdrave kože.

Slika 32. PRF+ stanice u: (A) leziji halo nevusa, (B) perilezijskoj koži te u (C) zdravoj koži (povećanje 200x).

Slika 33. Postotak PRF+ stanica među stanicama: (A) epidermisa lezije i perilezijske kože halo nevusa te zdrave kože; (B) dermisa lezije i perilezijske kože halo nevusa te zdrave kože i (C) epidermisa i dermisa lezije te perilezije halo nevusa i zdrave kože kontrolne skupine.

Slika 34. CD8+PRF+ i CD56+PRF+ stanice u: (A,D) leziji halo nevusa, (B,E) perilezijskoj koži te (C,F) u zdravoj koži kontrolne skupine (povećanje 200x).

Slika 35. Udio CD8+PRF+ stanica unutar subpopulacije citotoksičnih limfocita T (CD3+CD8+) u: (A) epidermisu lezija halo nevusa, perilezijskoj koži i zdravoj koži; (B) dermisu lezija halo nevusa, perilezijskoj koži i zdravoj koži; (C) epidermisu i dermisu lezija halo nevusa, perilezijske i zdrave kože.

Slika 36. Udio CD56+PRF+ stanica unutar subpopulacije citotoksičnih stanica NK (CD3-CD56+) u: (A) epidermisu lezija halo nevusa, perilezijske kože i zdrave kože; (B) dermisu lezija halo nevusa, perilezijske kože i zdrave kože; (C) epidermisu i dermisu lezija halo nevusa, perilezijske i zdrave kože.

Slika 37. PRF-2+ stanice u: (A) leziji halo nevusa, (B) perilezijskoj koži te u (C) zdravoj koži (povećanje 200x).

Slika 38. Postotak PRF-2+ stanica među stanicama: (A) epidermisa lezije i perilezijske kože halo nevusa te zdrave kože; (B) dermisa lezije i perilezijske kože halo nevusa te zdrave kože i (C) epidermisa i dermisa lezije te perilezije halo nevusa i zdrave kože kontrolne skupine.

Slika 39. CD68+PRF-2+ stanice u: (A) leziji halo nevusa, (B) perilezijskoj koži te (C) u zdravoj koži kontrolne skupine (povećanje 200x).

Slika 40. Udio CD68+PRF-2+ stanica unutar subpopulacije makrofaga (CD68+) u: (A) epidermisu lezija halo nevusa, perilezijskoj koži i zdravoj koži; (B) dermisu lezija halo

nevusa, perilezijskoj koži i zdravoj koži; (C) epidermisu i dermisu lezija halo nevusa, perilezijske i zdrave kože.

Slika 41. Imunohistokemijski prikaz GNLY+, CD8+ i CD56+ stanice u: (A, B, C) leziji vitiliga, (D,E,F) leziji halo nevusa (povećanje 200x). Kvantitativna analiza izražaja (G) GNLY+, (H) CD8+ i (I) CD56+ stanica u leziji vitiliga i halo nevusa.

Slika 42. GNLY+, CD8+ i CD56+ stanice u: (A, B, C) perilezijskoj koži vitiliga, (D,E,F) perilezijskoj koži halo nevusa (povećanje 200x). Kvantitativna analiza izražaja (G) GNLY+, (H) CD8+ i (I) CD56+ stanica u perileziji vitiliga i halo nevusa.

Slika 43. CD8+GNLY+ i CD56+GNLY+ stanica u (A,B) leziji vitiliga i (C,D) halo nevusa (povećanje 200x). Postotak CD8+GNLY+ i CD56+GNLY+ stanica među stanicama: (E,F) epidermisa i dermisa lezije vitiliga i halo nevusa.

Slika 44. (A,C) CD8+GNLY+ i (B,D) CD56+GNLY+ stanica u perilezijskoj koži vitiliga i halo nevusa (povećanje 200x). Kvantitativna analiza prikazana je u (E) kao postotak CD8+GNLY+ stanica unutar CD8+ subpopulacije te u (F) kao postotak CD56+GNLY+ stanica unutar CD56+ subpopulacije u epidermisu i dermisu perilezijske kože vitiliga i halo nevusa.

Slika 45. PRF+ stanice u: (A,C) leziji vitiliga i halo nevusa, (B,D) perilezijskoj koži vitiliga i halo nevusa (povećanje 200x). Postotak PRF+ stanica među stanicama: (E) epidermisa i dermisa lezije vitiliga i halo nevusa; (F) epidermisa i dermisa perilezijske kože vitiliga i halo nevusa.

Slika 46. CD8+PRF+ i CD56+PRF+ stanice u: (A,B) leziji vitiliga i (C,D) halo nevusa. Kvantitativna analiza prikazana je u (E) za CD8+PRF+ stanice te u (F) za CD56+PRF+ stanice u epidermisu i dermisu lezije vitiliga i halo nevusa.

Slika 47. (A,C) CD8+PRF+ stanice u perilezijskoj koži vitiliga i halo nevusa te (B,D) CD56+PRF+ stanice u perilezijskoj koži vitiliga i halo nevusa (povećanje 200x). Postotak CD8+PRF+ unutar CD8+ subpopulacije: (E) epidermisa i dermisa u perilezijskoj koži vitiliga i halo nevusa; postotak CD56+PRF+ stanica unutar CD56+ subpopulacije (F) epidermisa i dermisa perilezijske kože vitiliga i halo nevusa.

Slika 48. PRF-2+ stanice u: (A,C) leziji vitiliga i halo nevusa, (B,D) perilezijskoj koži vitiliga i halo nevusa (povećanje 200x). Postotak PRF-2+ stanica među stanicama: (E) epidermisa i dermisa lezije vitiliga i halo nevusa; (F) epidermisa i dermisa perilezijske kože vitiliga i halo nevusa.

Slika 49. CD68+PRF-2+ u: (A,C) leziji vitiliga i halo nevusa, (B,D) perilezijskoj koži vitiliga i halo nevusa (povećanje 200x). Kvantitativna analiza ukupnog izražaja CD68+PRF-2+ stanica unutar subpopulacije makrofaga (CD68+) u (E) epidermisu i dermisu lezije vitiliga i halo nevusa; (F) epidermisu i dermisu perilezijske kože vitiliga i halo nevusa.

Popis tablica:

Tablica 1. Kemikalije i reagensi

Tablica 2. Protutijela

Tablica 3. Kliničke i demografske značajke ispitanika

ŽIVOTOPIS

IME I PREZIME

Nika Hlača

DATUM I MJESTO ROĐENJA

24. travnja 1993., Zagreb

ZAPOSLENJE I RADNO ISKUSTVO:

2025. – do danas
Specijalist dermatovenerologije, Klinika za dermatovenerologiju, Klinički bolnički centar Rijeka
2020. – do danas
Suradnica u suradničkom zvanju i na radnom mjestu asistent, Katedra za dermatovenerologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
2019. – 2025. Liječnik na specijalizaciji iz dermatovenerologije, Klinika za dermatovenerologiju, Klinički bolnički centar Rijeka
2018. - 2019.
Pripravnički staž za doktora medicine, KBC Rijeka

OBRAZOVANJE:

2000. – 2008. Osnovna škola „Vladimir Gortan“, Rijeka
2008. – 2012. Prva sušačka hrvatska gimnazija, Rijeka
2012. – 2018. Integrirani preddiplomski i diplomskij studij medicine, Medicinski fakultet, Sveučilišta u Rijeci

AKADEMSKI NASLOVI

2018. Doktor medicine

ZNANSTVENI STUPNJEVI

2020. – danas - Asistent, Katedra za dermatovenerologiju, Medicinski fakultet, Sveučilišta u Rijeci

ČLANSTVA

- Hrvatski liječnički zbor (HLZ)
- Hrvatska liječnička komora (HLK)
- Hrvatsko dermatovenerološko društvo (HDVD)
- European Academy of Dermatology and Venereology (EADV)

STRUČNE AKTIVNOSTI I PUBLIKACIJE

Aktivno sudjelovanje u realizaciji znanstvenih projekata

1. 2024. do danas

   Suradnik na HRZZ projektu „Optička dijagnostika infekcija kože“ voditelja projekta izv.prof.dr.sc. Ivan Štajduhar

2. 2021. - 2023.

   Suradnik na projektu „Uloga citotoksičnosti posredovane granulizinom i perforinom-2 u nastanku vitiliga“ (uniri-iskusni-biomed-23-13-2949) odobrenog od Sveučilišta u Rijeci voditelja projekta izv.prof.dr.sc. Larise Prpić-Massari, dr.med.

3. 2021.– 2022.

   Suradnik na projektu „Uloga citotoksičnosti posredovane granulizinom i perforinom-2 u nastanku psorijaze i lihen planusa biomedicinske i biotehničke znanosti“ odobrenog od Sveučilišta u Rijeci voditelj projektaa izv.prof.dr.sc. Larisa Prpić-Massari, dr.med.

Znanstveni i stručni radovi

Radovi objavljeni u znanstvenim časopisima u bazi Web of Science Core Collection (WoSCC)

1. **Hlaca N**, Zagar T, Kastelan M, Brajac I, Prpic-Massari L. Ixekizumab-induced paradoxical pustular reaction successfully treated with guselkumab. Clin Exp Dermatol 2021; 46:1572-1573.

2. Žagar T, **Hlača N**, Brajac I, Prpić-Massari L, Peternel S, Kaštelan M. Bullous Sweet syndrome following SARS-CoV-2 Oxford AstraZeneca vaccine. Br J Dermatol 2022; 186:e110.

3. **Hlaca N**, Zagar T, Kastelan M, Brajac I, Prpic-Massari L. Secukinumab-induced scar sarcoidosis in a patient with plaque psoriasis. Australas J Dermatol 2022; 63: e187-e189.

4. Batinac T, **Hlača N**, Simetić L, Valković F, Peternel S, Prpić-Massari L. Stevens-Johnson Syndrome and Severe Anaemia: A Case of Toxicity Induced by Vemurafenib plus Cobimetinib following Pembrolizumab for Metastatic Melanoma. Acta Derm Venereol 2022;102:adv00650.

5. **Hlaca N**, Zagar T, Kastelan M, Peternel S, Brajac I, Prpic-Massari L. New-onset lichen planus and lichen planus flare in elderly women after COVID-19 vaccination. J Cosmet Dermatol 2022;21:3679-3681.

6. **Hlaca N**, Zagar T, Kastelan M, Peternel S, Brajac I, Dujmovic-Hasanbegovic K, Prpic-Massari L. Pityriasis rubra pilaris following booster dose of mRNA (Pfizer-BioNTech) COVID-19 vaccine. Dermatol Ther 2022;35:e15791.

7. **Hlača N**, Žagar T, Kaštelan M, Brajac I, Prpić-Massari L. Current Concepts of Vitiligo Immunopathogenesis. Biomedicines 2022;10:1639.

8. Vičić M, **Hlača N**, Kaštelan M, Brajac I, Sotošek V, Prpić Massari L. Comprehensive Insight into Lichen Planus Immunopathogenesis. Int J Mol Sci 2023; 24:3038.

9. Šutić Udović I, **Hlača N**, Massari LP, Brajac I, Kaštelan M, Vičić M. Deciphering the Complex Immunopathogenesis of Alopecia Areata. International Journal of Molecular Sciences 2024;25:5652.

10. Belančić A, **Hlača N**, Peternel S, Golčić M, Prpić-Massari L, Vlahović-Palčevski V. Afatinib-induced toxic epidermal necrolysis: A case report with a literature review. Br J Clin Pharmacol 2024;90:2030-2033. doi: 10.1111/bcp.16114.

11. Vičić M, **Hlača N**, Skender K, Kaštelan M, Jonjić N, Prpić-Massari L. Lichen planus pigmentosus-like reaction to pirfenidone in a patient with idiopathic pulmonary fibrosis. Int J Dermatol 2025;64:430-431. doi: 10.1111/ijd.17380.

12. **Hlača N**, Vičić M, Kaštelan M, Dekanić A, Prpić-Massari L. Analysis of granulysin expression in vitiligo and halo-nevus. Sci Rep 2024; 14:16580. doi: 10.1038/s41598-024-67494-9.

13. **Hlača N**, Vičić M, Prpić-Massari L. Immunological aspects of halo nevus (Sutton's nevus). Front Immunol 2026; 17:1729726. doi:10.3389/fimmu.2026.1729726.

Radovi objavljeni u znanstvenim časopisima u bazi Scopus

1. **Hlača N**, Klobučar Majanović S, Štimac T, Rahelić D. Kontroverze u dijagnostici dijabetesa u ranoj trudnoći. Acta Medica Croatica 2019;73:377-380.

2. **Hlača N**, Klobučar Majanović S. Novosti u liječenju gestacijskog dijabetesa. Medicina fluminensis 2019;55:330-336.

3. Lukežić I, **Hlača N**, Vičić M. Terapijski pristup psorijazi – prvi dio: lokalni pripravci. Medicina Fluminensis 2024;60:36-46.

4. Sopta D, **Hlača N**, Vičić M. Terapijski pristup psorijazi – drugi dio: fototerapija i fotokemoterapija. Medicina Fluminensis 2024;60:47-54.

5. Peterka Z, **Hlača N**, Vičić M. Terapijski pristup psorijazi – treći dio: nebiološka sustavna terapija. Medicina Fluminensis 2024;60:55-61.

Poglavlja u knjigama

1. **Hlača N**, Žagar T, Prpić-Massari L. Radiodermatitis. U: „Opekline“, 2. prošireno izdanje, ur: Pirjavec Mahić A, Libertin naklada, Rijeka 2020.

2. Žagar T, **Hlaca N**, Prpic-Massari, L. Dermatoscopic Features of Basal Cell Carcinoma. In: Pietkiewicz, P. , editor. Dermatoscopy [Internet]. London: IntechOpen; 2021. Available from: https://www.intechopen.com/chapters/78974 doi:10.5772/intechopen.100390

3. **Hlača, Nika**; Žagar, Tina; Kaštelan, Marija; Prpić-Massari, Larisa. Inhibitori TNF-α // Psorijaza: od imunopatogeneze do suvremene terapije / Kaštelan, Marija; Prpić-Massari, Larisa i suradnici (ur.). Rijeka: Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet, 2023. str. 139-156.

4. **Hlača, Nika**; Žagar, Tina; Kaštelan, Marija; Prpić-Massari, Larisa. Inhibitori IL-12/23 // Psorijaza: od imunopatogeneze do suvremene terapije / Kaštelan, Marija; Prpić-Massari, Larisa i suradnici (ur.). Rijeka: Sveučilište u Rijeci, MEF u Rijeci, 2023. str. 157-162.

5. Žagar, Tina; **Hlača, Nika**; Prpić-Massari, Larisa. Liječenje psorijaze kroz povijest // Psorijaza: od imunopatogeneze do suvremene terapije / Kaštelan, Marija; Prpić-Massari, Larisa i suradnici (ur.). Rijeka: Sveučilište u Rijeci, MEF u Rijeci, 2023. str. 15-24.

Kongresna priopćenja

Domaći skupovi

1. **Hlača N**, Jakšić A. Utjecaj gestacijskog dijabetesa na razvoj kardiovaskularnih bolesti. Knjiga sažetaka II. Riječki dani primarne zdravstvene zaštite - bolesnik s kardiovaskularnom bolesti u primarnoj zdravstvenoj zaštiti. Rijeka, 2.-4.11.2018.

2. Jakšić A, **Hlača N**. Sindrom dijabetičkog stopala - predskazatelj rizika kardiovaskularnih bolesti? Knjiga sažetaka II. Riječki dani primarne zdravstvene zaštite - bolesnik s kardiovaskularnom bolesti u primarnoj zdravstvenoj zaštiti. Rijeka, 2.-4.11.2018.

3. **N. Hlača**, T.Batinac, S. Peternel, G.Lakoš, E. Cini-Tešar, I. Pavlović-Ružić, L.Simetić L. Prpić Massari. Teške kožne reakcije vezane uz primjenu BRAF i MEK inhibitora u liječenju metastatskog melanoma, pregled literature i prikaz slučaja. 3. znanstveni simpozij multidisciplinarnih timova za melanom. Virtualni simpozij, oralna prezentacija, 26.-27.02.2021.

4. **Hlaca N**, Zagar T, Kastelan M, Brajac I, Prpic Massari L. Sarcoidosis following secukinumab therapy in a patient with psoriasis. 7. kongres hrvatskih dermatovenerologa s međunarodnim sudjelovanjem Vodice, Hrvatska, 2022. (poster, domaća recenzija, neobjavljeni rad, stručni)

5. Žagar, Tina; **Hlača, Nika**; Skender, Katarina; Brajac, Ines; Prpić-Massari, Larisa; Peternel, Sandra; Kaštelan, Marija. Rijetki slučaj buloznog sindroma Sweet nakon vakcinacije protiv COVID-19 // 7. kongres hrvatskih dermatovenerologa s međunarodnim sudjelovanjem Vodice, Hrvatska, 2022. (poster, domaća recenzija, neobjavljeni rad, stručni)

6. Katarina Skender, **Nika Hlaca**, Marijana Vicic, Larisa Prpic-Massari, Marija Kastelan. Diagnostic pitfall of occupational hand eczema: pyoderma gangrenosum of the hands. 2nd Symposium of ICDRG with cooperation with Croatian Dermatovenerological Society of the Croatian Medical Association, Split, Croatia 2023. (poster, domaća recenzija, neobjavljeni rad, stručni)

7. Marijana Vičić, **Nika Hlača**, Katarina Skender, Marija Kaštelan, Larisa Prpić Massari. Pirfenidone-induced lichenoid drug reaction. 2nd Symposium of ICDRG with cooperation with Croatian Dermatovenerological Society of the Croatian Medical Association, Split, Croatia 2023. (poster, domaća recenzija, neobjavljeni rad, stručni)

8. Vraničić I, **Hlača N**. Suvremen pristup liječenju androgenetske alopecije u muškaraca. 7. Studentski kongres zaštite zdravlja, Sanitas, 14.-16.03.2024., Medicinski fakultet u Rijeci. (poster, domaća recenzija, neobjavljeni rad, stručni)

Međunarodni skupovi

1. **Hlača N**, Žagar T, Skender K, Prpić-Massari L et al. SJS following introduction of targeted combination therapy for advanced stage melanoma. EADV Virtual Congress 2020. Poster prezentacija.

2. Skender K, Žagar T, **Hlača N**, Peternel S, Kaštelan M, Brajac I, Prpić Massari L. Eosinophilic annular erythema following influenza virus infection. EADV Virtual Congress 2020. Poster prezentacija.

3. **Hlaca N**, Vicic M, Kastelan M, Brajac I, Prpic Massari L. Iga Vasculitis Following Covid-19 Infection In An Elderly Woman. 25th World Congress of Dermatology 2023, Singapur (03.07.2023-08.07.2023). Poster prezentacija.

4. **Hlaca N**, Vicic M, Kastelan M, Brajac I, Prpic Massari L. Extensive cutaneous lichen planus flare following COVID-19 vaccination (mRNA-1273). 25th World Congress of Dermatology 2023, Singapur (03.07.2023-08.07.2023). Poster prezentacija.

5. **Hlaca N**, Vicic M, Kastelan M, Dekanic A, Prpic Massari L. Granulysin expression is upregulated in vitiligo lesions. 25th World Congress of Dermatology 2023. Poster prezentacija.

6. **Hlaca N.**, Vicic M., Skender K., Kastelan M., Dekanic A., Prpic Massari L. Upregulation of granulysin expression in halo nevus lesions. EADV Congress, Berlin 2023. Poster prezentacija.

7. **Hlaca N.**, Lakos G., Žagar T., Šutić-Udović I., Vicic M., Kastelan M. Radiotherapy-Induced Localized Bullous Pemphigoid with Delayed Onset. EADV Congress, Paris 2025. Poster prezentacija.

Nagrade i priznanja

Nagrada za najboljeg mladog znanstvenika za kliničke medicinske znanosti i javno zdravstvo i zdravstvenu zaštitu u 2022. godini.

Nastavna djelatnost

Od prosinca 2020. do danas aktivno sudjelujem u izvedbi nastave pri Katedri za dermatovenerologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci, u svojstvu asistenta za studente integriranog preddiplomskog i diplomskog studija medicine na hrvatskom i engleskom jeziku te za studente stomatologije na hrvatskom i engleskom jeziku pri Fakultetu dentalne medicine Sveučilišta u Rijeci.