

POJAVNOST CD30 NA LIMFOCITIMA U UPALNOM INFILTRATU AKUTNE FAZE ATOPIJSKOG DERMATITISA

THE PRESENCE OF CD30 ON T CELLS IN THE INFLAMMATORY INFILTRATE OF ACUTE ATOPIC DERMATITIS

DUBRAVKA BOBEK, JASNA LIPOZENČIĆ, JASMINKA JAKIĆ-RAZUMOVIĆ,
DAVOR IVANKOVIĆ, OLGA BADOVINAC*

Deskriptori: Atopijski dermatitis – imunologija; Antigeni, CD30 – analiza, imunologija; T limfociti – imunologija

Sažetak. Atopijski dermatitis (AD) sadržava stanične imunohistokemijske značajke slične onima kod kontaktnog alergijskog dermatitisa (KAD). Postoji obilje dokaza za T-staničnu aktivaciju u AD-u kao što su nazočnost T-limfocita koji nose biljege CD3, CD4 i CD45RO. Cilj ovog rada bio je prikazati pojavnost površinskih limfocitnih antigena uključujući CD30, CD45RO, CD4 i CD3 u bolesnika s akutnim AD-om te usporediti pojavnost tih molekula u bolesnika s akutnim KAD-om na nikal radi mogućeg morfološkog razlikovanja tih dvaju entiteta. Pojavnost navedenih molekula evaluirana je imunohistokemijski u bioptima ledirane kože u dermisu i epidermisu. Biopsije su uzete od 12 pacijenata koji su bolovali od akutnog AD i od 13 pacijenata s KAD-om. Rezultati pokazuju statistički značajno viši prosjek pojavnosti, a također bitno veći raspon pojavnosti limfocita CD30+, CD45RO+, CD3+ i CD4+ u dermisu i epidermisu bolesnika s AD-om, u odnosu na prosjek i raspon pojavnosti u bolesnika s KAD-om. Pri tome uočena je statistički značajno veća pojavnost CD30, CD45RO, CD3 i CD4 u dermisu nego u epidermisu u obje skupine bolesnika. Povišeni broj CD30+ limfocita u bolesnika s akutnim AD-om, međutim, ne korelira s težinom kliničke slike procijenjene po kliničkom skor za evaluaciju težine bolesti, tzv. SCORAD-indeksu (engl. Severity Scoring of Atopic Dermatitis). Naši rezultati pokazuju povezanost ekspresije CD30 i akutne faze AD-a, ali ne i KAD-a, što bi moglo utvrditi CD30 kao koristan biljeg u diferenciranju tih dviju bolesti.

Descriptors: Dermatitis, atopic – immunology; Antigens, CD30 – analysis, immunology; T-lymphocytes – immunology

Summary. Atopic dermatitis (AD) has cellular immunohistochemical features similar to those of allergic contact dermatitis (ACD). There is plenty of evidence for T-cell activation in this disease such as the presence of T-lymphocytes which carry CD30, CD3, CD4, CD45RO markers. The aim of this study was to show the presence of lymphocyte-surface antigens including CD30, CD3, CD4, CD45RO in patients with acute AD and to compare the presence of the same molecules in patients with acute ACD (nickel-induced) because of the possible morphologic difference of these two entities. The presence of the stated molecules is immunohistochemically evaluated in biopsies of lesional skin in dermis and epidermis. Biopsies were obtained from twelve patients suffering from acute AD and from thirteen patients with ACD. The results show statistically significant higher average of presence and also much higher range of presence of CD30+, CD3+, CD4+, CD45RO+ lymphocytes in dermis and epidermis of patients with AD compared to the average and range in patients with ACD. Statistically much higher average of CD30, CD3, CD4, CD45RO is noticed in those occasions more in dermis than in epidermis in both groups of patients. High number of CD30+ lymphocytes in patients with acute AD does not however correlate with the severity of the disease evaluated according to clinical score for the evaluation of the severity of the disease, so called the SCORAD-index (Severity Scoring of Atopic Dermatitis). Our results showed an association between CD30 expression and acute AD but not with acute ACD which could evaluate CD3 as the useful marker in differentiating these two diseases.

Liječ Vjesn 2004;126:291–297

Atopijski dermatitis (AD), neurodermitis, pruridermatitis allergica chronica constitutionalis je recidivirajuća upalna bolest kože karakterizirana jakim svrbežom i kožnim promjenama koja se pojavljuje u osoba s genskom predispozicijom.¹ Broj oboljelih u svim dobnim skupinama je u stalnom porastu. Godine 1986. prevalencija je bila 2–3%, a 1996. god. već 10% populacije boluje od AD-a. Promjene na koži mogu se pojaviti u bilo kojoj dobi, a tipičan je početak između 3. i 6. mjeseca života.² U 80% pacijenata bolest započne prije navršene 1. godine života, a tek u oko 2% nakon 20. godine života.³

AD se klinički manifestira jakim svrbežom, eritemom, ekscorijacijama i lihenifikacijom. Općenito se može reći da su akutne lezije karakterizirane intenzivnim svrbežom s papulama na eritematoznoj koži, ekscorijacijama, erozijama te seroznim eksudatom.⁴

Pojava bolesti uvjetovana je atopijskom dijazom. Termin »atopija« od početka je označavao gensku sklonost alergijskoj reaktivnosti. Odavno se naime zna da je učestalost alergijskih bolesti u obiteljima atopičara oko tri puta veća nego u obiteljima zdravih osoba.⁵ Kromosomske regije za koje se smatra da su povezane s atopijom velike su i u prosjeku sadržavaju više od 20 Mb DNA i na tisuće gena. Još uvijek veliki izazov predstavlja identificiranje gena koji uzrokuju bolest.⁶ Oštećenje

tkiva i propagacija upale čini se da je uvjetovana interakcijom između Th-2-limfocita, odnosno njihovih citokina, stanica koje predočavaju antigen, mastocita i eozinofila. Histopatološke studije pokazuju da se mononuklearni stanični infiltrat u AD sastoji od limfocita i monocita predominantno u perivaskularnoj regiji dermisa s manjim širenjem u epidermis.⁷

Braathen i sur. opisuju da se mononuklearne stanice u dermalnom perivaskularnom infiltratu sastoje pretežno od T-limfocita, dok Leung i sur. napominju da su većina limfocita koji infiltriraju kožu pacijenta s AD-om CD4+ T-stanice.^{8,9}

AD ima celularne imunohistokemijske značajke slične onima kod KAD-a. Postoji obilje činjenica za T-staničnu aktivaciju u AD-u kao što su nazočnost staničnih infiltrata T-limfocita, i

* Odjel za fizikalnu medicinu i rehabilitaciju Kliničke bolnice Dubrava (mr. sc. Dubravka Bobek, dr. med.; Olga Badovinac, dr. med.), Klinika za kožne i spolne bolesti KBC-a i Medicinskog fakulteta u Zagrebu (prof. dr. sc. Jasna Lipozenčić, dr. med.), Klinički zavod za patologiju KBC-a i Medicinskog fakulteta u Zagrebu (prof. dr. sc. Jasminka Jakić-Razumović, dr. med.), Katedra za medicinsku statistiku, Škola narodnog zdravlja »Andrija Štampar« Medicinskog fakulteta u Zagrebu (prof. dr. sc. Davor Ivanković, dr. med.)

Adresa za dopisivanje: Mr. sc. D. Bobek, Odjel za fizikalnu medicinu i rehabilitaciju KB Dubrava, Avenija Gojka Suška 6, 10000 Zagreb
Primljeno 15. travnja 2003., prihvaćeno 5. studenoga 2004.

to onih koji nose biljege CD4, CD3 i CD45RO. CD4-molekula, molekularne težine 55 kDa prisutna je na pomoćničkim limfocitima normalne periferne krvi, na monocitima te normalnim timocitima.^{10,11} Također, CD4-antigen predstavlja receptor za virus humane imunodeficiencije (engl. human immunodeficiency virus HIV). Osobe inficirane HIV-om pokazuju kontinuirani gubitak CD4+-limfocita.¹² CD3-antigen prisutan je na 61 do 85% limfocita normalne periferne krvi, 60 do 85% timocita te na Purkinjeovim stanicama cerebeluma.¹³

Kompleks T-limfocitnog antigenskog receptora s kojim je CD3-molekula povezana preko epsilon-lanca sastoji se od najmanje šest proteina čija molekularna težina iznosi od 20 do 30 kDa.¹⁴ CD45RO-molekula član je CD45-porodice koja uključuje CD45, CD45RA i CD45RB, ima molekularnu težinu 180 kDa i prisutna je na oko 40% T-limfocita periferne krvi te na monocitima, makrofazima i granulocitima.¹⁵⁻¹⁷ CD30 je na membrani vezani glikoprotein molekularne težine 120 kDa s pleotropnim biološkim aktivnostima za različite CD30+-tipove limfoma, ali i za imunوسي sistem, pogotovo T-limfocite jer je uključen u aktiviranje i funkcioniranje imunosi odgovora ovisnog o T-limfocitima. CD30 funkcionira kao citokinski receptor.¹⁸ Stein i suradnici su 1982. god. CD30 opisali kao površinsku molekulu prepoznatu Ki-1 monoklonskim protutijelom na Hodgkinovim i Reed-Sternbergovim stanicama kod pacijenata s Hodgkinovom bolešću.¹⁹⁻²¹

U posljednje vrijeme CD30 se opisuje na membrani T-limfocita kao član receptora faktora tumorske nekroze (engl. tumor necrosis factor – TNF).²²⁻²⁵ Fiziološki, CD30+-stanice ne cirkuliraju u perifernoj krvi, nego su ograničene na male površine B-staničnim folikulima limfnog tkiva.²⁶

Pojavnost CD30 većinom je ograničena na limfocite napadnute virusom, neoplazme limfnog podrijetla i podtip T-limfocita koji producira Th-2-tip citokina. Uloga CD30 je pleotropna i razumije se u kontekstu kostimulatornih signala. Signalna transdukcija CD30 zajednička je s drugim članovima porodice TNF-receptora.²⁷

U novije vrijeme prikazuje se povezanost između serumskog CD30 i AD-a, ali ne i između CD30 i KAD-a.^{8,29,30} Naime, unatoč tomu što rutinski histološki test u AD-u pokazuje sličnost s tipom IV kasne faze reakcije preosjetljivosti kao u KAD-u, neke činjenice u posljednje vrijeme upućuju na to da u AD-u i KAD-u postoje različite reakcije kasne faze, što je histološki nemoguće razlikovati. Stoga je cilj ovog ispitivanja prikazati pojavnost aktivacijskog biljega CD30 na T-limfocitima u akutnom AD-u i KAD-u, kao i CD45RO+, CD3+ i CD4+-limfocita u biopsijama kože bolesnika s AD-om i KAD-om radi mogućeg morfološkog razlikovanja tih dvaju entiteta.

Bolesnici i metode

Bolesnici

U ovom radu istraživani su uzorci kože 25 osoba podjeljenih u ispitnu i kontrolnu skupinu. Ispitnu skupinu činili su uzorci kože 12 bolesnika u fazi akutne egzacerbacije AD-a. Klinička dijagnoza postavljena je prema kriteriju Hanifina i Rajke.¹ Prema navedenim autorima za postavljanje dijagnoze AD-a nužno je dokazati prisutnost najmanje triju temeljnih (svrbež, tipična distribucija i morfologija kožnih promjena, kronična egzacerbacija bolesti te pozitivna osobna ili obiteljska anamneza na atopiju) i triju ili više manje karakterističnih simptoma, tj. značajke (generalizirano suha koža, povišene vrijednosti IgE, pozitivni intradermalni testovi na suspektne antigene, mlada životna dob, učestale kožne infekcije, alergija na hranu, keratosis itd.).

Za ocjenu težine kliničke slike AD-a rabili smo tzv. SCORAD indeks – klinički sistem za evaluaciju težine bolesti (engl. Severity Scoring of Atopic Dermatitis).³¹ SCORAD indeks

uključuje ukupnu količinu zahvaćenog područja kože, intenzitet promjena (označen s 0 = bez, 1 = blag, 2 = umjeren, 3 = jak), opis tipa promjena (eritem, edem/papule, vlaženje/kruste, ekzorijacije, lihenifikacija, suhoća kože) te subjektivne simptome (pruritus i poremećaj spavanja – prema vizualnoj analognoj skali).

Osim tipične kliničke slike bolesnici s AD-om uključeni u studiju imali su pozitivnu osobnu i/ili obiteljsku anamnezu za atopiju, pozitivan kožni ubodni test (engl. skin prick test) koji je primijenjen na inhalacijske i nutritivne alergene te povišen nivo ukupnih IgE-protutijela. Svi ispitanici bili su odrasle osobe, i to 6 muškaraca i 6 žena u dobi od 19 do 36 godina. Ni jedna od osoba nije bolovala od astme ili koje druge atopijske bolesti. Također ispitanici nisu bili tretirani antibioticima, sistemskim kortikosteroidima, antihistaminicima ili imunosupresivnom terapijom u toku uzimanja biopsije. Kontrolna skupina bolesnika bila je 13 uzoraka kože bolesnika s akutnim KAD-om na nikal.

Ispitanici su bili odrasle osobe, i to 2 muškarca i 11 žena, životne dobi od 18 do 35 godina. Svi su imali negativnu anamnezu za atopiju i normalnu razinu ukupnih IgE-protutijela. Zbog nezadovoljavanja svih postavljenih kriterija za uključivanje u ispitnu ili kontrolnu skupinu 5 bolesnika nije pristupilo ispitivanju. Za izvođenje svih pretraga tražena je suglasnost ispitanika.

Imunohistokemija

Na parafinskim rezovima debljine 4–5 μm metodom imunohistokemijskog bojenja odredi se pojavnost CD30, CD3, CD4 i CD45RO na staničnim membranama limfatičnih stanica. Pri tome se rabila metoda Streptavidin-Avidin-Biotin (ABC). Histološki rezovi bili su inkubirani s neimunim konjskim serumom u trajanju od 20 minuta, nakon čega se serum odstranio i preparati inkubirani s primarnim protutijelom. Nakon toga rezovi su bili oprani 3 po 5 minuta u fosfatnom puferu (PBS) te se apliciralo biotinizirano sekundarno protutijelo (Multilink Swine anti-Goat-Mouse-Rabbit Immunoglobulins biotinylated) (Dako Copenhagen, Danska). Rezovi su bili inkubirani u trajanju od 30 minuta, oprani u PBS-u te inkubirani s konjugatom biotin-avidin peroksidaze (ABC/HRP kit, Dako, Copenhagen, Danska) u trajanju od 30 minuta. Nakon pranja u PBS-u imuni produkt bojenja se vizualizirao 3,3'-2 diaminobenzidinom (DAB; Dako, Copenhagen, Danska) u PBS-u s 0,01% H₂O₂. Preparati su bili kontrastno obojeni hemalaun-eozinom u trajanju od 3 minute i uklopljeni u sintetski medij DPX. Evaluacija bojenja izvršena je svjetlosnim mikroskopom. Broj pozitivnih stanica za svako korišteno protutijelo kvantificiran je brojenjem (+) stanica svjetlosnim mikroskopom, i to na mm dužine epidermisa i mm² dermisa. Dobiveni rezultati uspoređeni su s kliničkom slikom bolesnika prema SCORAD-indeksu.

Statističke metode

Podaci su prikazani tablično i grafički. Sve distribucije testirane su na normalnost unutargrupno (AD, KAD) Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Samo dvije varijable (CD30 i CD4 u epidermisu), i to u skupini KAD pokazale su statistički značajan odklon od normalne distribucije. Stoga se u analizi za sve normalno distribuirane varijable primjenjuje Studentov test (t-test), a za dvije varijable koje nisu normalno distribuirane odgovarajući neparametrijski Mann-Whitneyev test. Grafički su za sve varijable koje su normalno distribuirane prikazani i uspoređeni međugrupno prosjek, 95%-tni interval pouzdanosti te minimalna i maksimalna vrijednost. Za varijable u kojih se pokazalo statistički značajno odstupanje od normalne distribucije u barem jednoj uspoređivanoj skupini grafički su prikazani medijan, interkvartilni raspon, minimum i maksimum, kao i statistička značajnost među grupama. Unutar grupne us-

poredbe prikazane su t-testom diferencijacije za normalne distribucije i Wilcoxonovim testom sume rangova za distribucije koje odstupaju od normale. Također je prikazana regresijska i korelacijska analiza, pri čemu je SCORAD-indeks predstavljao prediktora; a CD30 zavisnu varijablu. Rezultati statističkih analiza za koje je utvrđen $p < 0,05$ i niže smatrani su statistički značajnima.

Rezultati

U ovom radu istraživani su uzorci kože 25 osoba podjeljenih u ispitnu i kontrolnu skupinu. Ispitnu skupinu činili su uzorci kože 12 bolesnika u fazi akutne egzacerbacije atopijskog dermatitisa (AD). Svi ispitanici bili su odrasle osobe, i to 6 muškaraca i 6 žena u dobi od 19 do 37 godina. Također, svi ispitanici imali su pozitivan ubodni test, a testirani su na inhalacijske i nutritivne alergene. Najčešće zastupljeni inhalacijski alergeni bili su: D. pteronyssinus i kućna prašina, a od nutritivnih alergena najčešće su bili zastupljeni jaja i mlijeko.

Kontrolnu skupinu činilo je 13 uzoraka kože bolesnika s akutnim alergijskim kontaktnim dermatitisom (KAD) na nikal. Ispitanici su bili 2 muškarca i 11 žena životne dobi od 18 do 35 godina. Na tablici 1. prikazane su karakteristike pacijenata

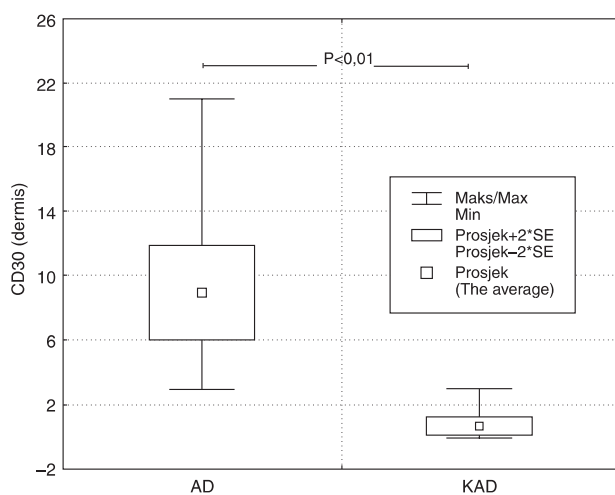
s AD-om. Prikazana je životna dob, spol, trajanje bolesti i ukupna vrijednost IgE u serumu. Također su prikazani pojedini alergeni na koje su ispitanici pozitivno reagirali pri izvođenju ubodnog testa (engl. skin prick test) te izračunani SCORAD-indeksi u pacijenata ispitne skupine.

Iz navedene tablice može se utvrditi da je najniža vrijednost SCORAD-indeksa u naših ispitanika iznosila 21, a najviša 62. Ako ispitanike podijelimo prema vrijednosti SCORAD-a na one s blagom kliničkom slikom (indeks 0 do 30), zatim na one s umjereno teškom (indeks od 31 do 65) i teškom kliničkom slikom (indeks od 66 do 100), vidljivo je da se naša ispitna skupina sastojala pretežno od pacijenata s umjereno teškom kliničkom slikom (10 bolesnika ili 83%). Mala je bila zastupljenost bolesnika s blagom kliničkom slikom (2 bolesnika ili 17%).

Slikama od 1. do 4. prikazana je pojava CD30, CD45RO, CD3 i CD4 na staničnim membranama limfatičnih stanica bolesnika s akutnim AD-om i KAD-om. Pojavnost je određena metodom imunohistokemijskog bojenja na parafinskim rezovima debljine 4–5 μm . Evaluacija bojenja izvršena je svjetlosnim mikroskopom. Broj pozitivnih stanica za svako korišteno protutijelo kvantificiran je brojenjem (+) stanica svjetlosnim

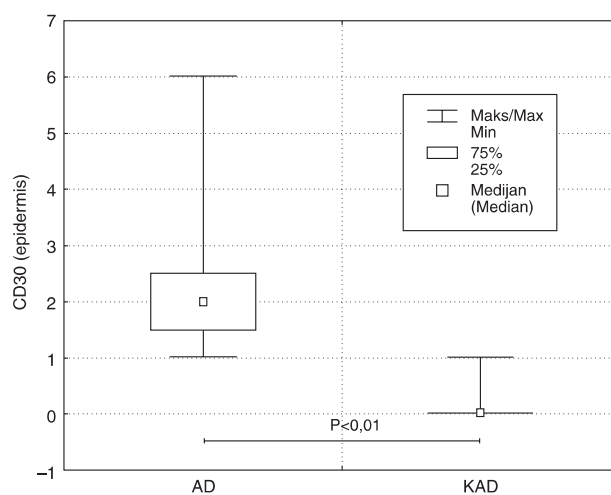
Tablica 1. Karakteristike bolesnika s atopijskim dermatitisom
Table 1. Characteristics of the atopic dermatitis patients

Bolesnici Patients	Spol Sex	Dob (godine) Age (years)	Trajanje AD-a (godine) Duration of AD (years)	IgE RIST (U/ml) Total serum IgE level (U/ml)	Rezultati ubodnog testa (20 minuta)	SCORAD-indeks SCORAD index
					Results of prick test (20 minutes)	
B. S.	m	24	2	38	D. pteronyssinus	35
M. K.	f	25	7	812	Kućna prašina / House dust	55
P. M.	f	29	5	32	D. pteronyssinus	50
B. S.	f	28	4	245	Jaje / Egg	62
V. M.	m	35	10	21000	Mlijeko / Milk	37
B. A.	m	37	19	320	Kućna prašina / House dust	24
G. G.	f	36	14	178	Kućna prašina / House dust	42
B. N.	f	22	10	450	Kućna prašina / House dust	37
P. V.	f	19	3	17000	D. pteronyssinus	43
I. S.	m	28	1	14	Jaje / Egg	32
K. J.	m	26	5	780	D. pteronyssinus	21
B. S.	m	19	8	659	Jaje/ Egg	49



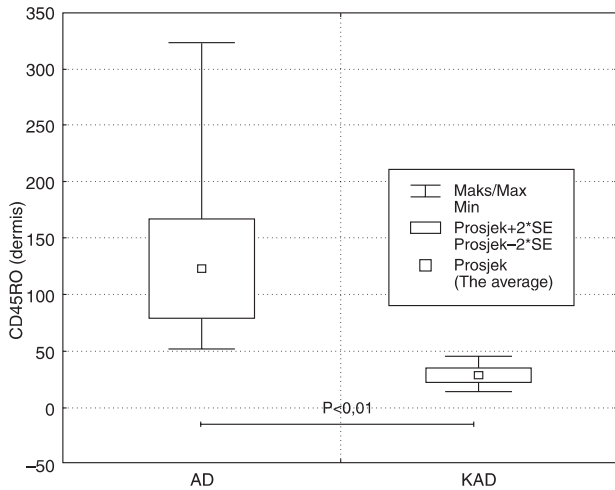
Slika 1.a. Pojavnost CD30+ limfocita u mm^2 dermisa ispitanika s AD-om i u kontrolne skupine bolesnika s KAD-om

Figure 1a. Expression of CD30 on T cells in the mm^2 of dermis in patients with AD and patients with ACD



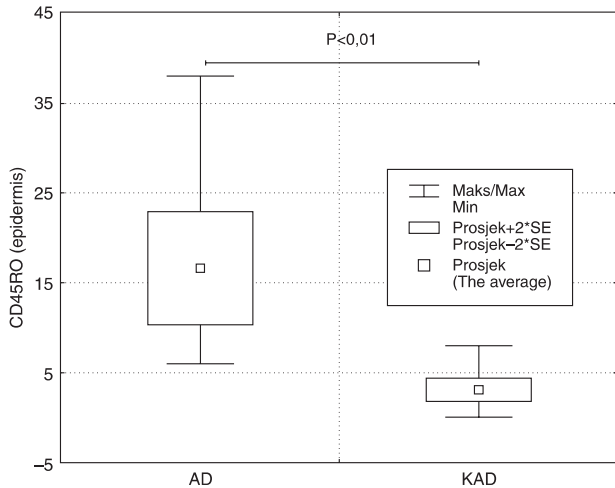
Slika 1.b. Pojavnost CD30+ limfocita u mm epidermisa bolesnika s AD-om i KAD-om

Figure 1b. Membrane CD30 expression in mm epidermis derived from skin infiltrates of patients with AD compared with membrane CD30 expression in patients with ACD



Slika 2.a. Pojavnost CD45RO+ limfocita u mm² dermisa u bolesnika akutne faze AD-a i KAD-a

Figure 2a. Membrane CD45RO+ expression in mm² dermis derived from skin infiltrates of patients with AD compared with membrane CD30 expression in patients with ACD



Slika 2.b. Pojavnost CD45RO+ limfocita u mm dužine epidermisa u bolesnika akutne faze AD-a i KAD-a

Figure 2b. Membrane CD45RO+ expression in mm epidermis derived from skin infiltrates of patients with AD compared with membrane CD30 expression in patients with ACD

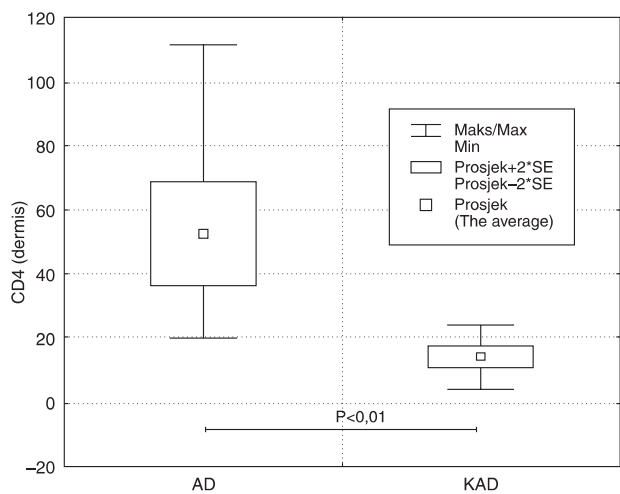
mikroskopom, i to na mm dužine epidermisa i mm² dermisa. Sve su varijable testirane na normalnost unutargrupno (grupa AD i grupa KAD) Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Samo dvije varijable (CD30 i CD4 u epidermisu), i to u skupini bolesnika s KAD-om, pokazale su statistički značajan odklon od normalne distribucije. Stoga se u analizi za sve normalno distribuirane varijable primjenjuje Studentov test (t-test), a za dvije varijable koje nisu normalno distribuirane odgovarajući neparametrijski Mann-Whitneyev test. Grafički su za varijable koje su normalno distribuirane prikazani i uspoređeni međugrupno prosjek, 95%-tni interval pouzdanosti, minimalna i maksimalna vrijednost. Za varijable u kojih se pokazalo statistički značajno odstupanje od normalne distribucije u barem jednoj uspoređivanoj skupini (CD30 i CD4 u epidermisu) grafički su prikazani medijan, interkvartilni raspon, minimum i maksimum, kao i statistička značajnost razlike među grupama.

U bolesnika s AD-om utvrđene su vrijednosti CD30 na membranama limfocita u rasponu od 3 do 21 na mm² dermisa, isto-

dobno taj se raspon kretao od 0 do 3 kod bolesnika s KAD-om (slika 1.a). Prosjek pojavnosti CD30 u bolesnika s AD-om bio je statistički značajno viši (p<0,05) u odnosu na prosjek u bolesnika s KAD-om.

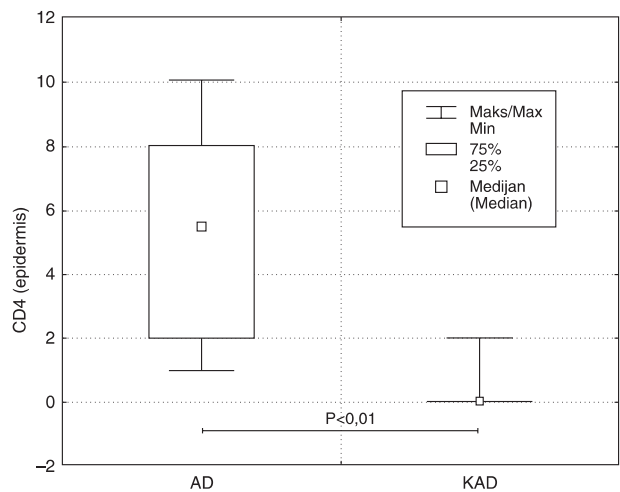
Slika 1.b prikazuje pojavnost CD30+ limfocita u epidermisu ispitanika s AD-om i KAD-om u kojih se Kolmogorov-Smirnovljevim testom pokazalo statistički značajno odstupanje od normale. Grafički su prikazani medijan, interkvartilni raspon, minimum i maksimum, kao i statistička značajnost razlike među grupama (AD i KAD). Iz prikaza je vidljivo da su bolesnici s AD-om imali viši medijan za pojavnost CD30+ limfocita u epidermisu u odnosu na bolesnike s KAD-om. Razlika je bila statistički značajna (p<0,05). Također, vidljiv je znatno veći raspon (od 1 do 6) za ekspresiju CD30 u epidermisu bolesnika s AD-om u odnosu na bolesnike s KAD-om (od 0 do 1).

Iz slike 2.a i 2.b je vidljivo da su bolesnici s AD-om imali viši prosjek pojavnosti CD45RO-molekule na membranama



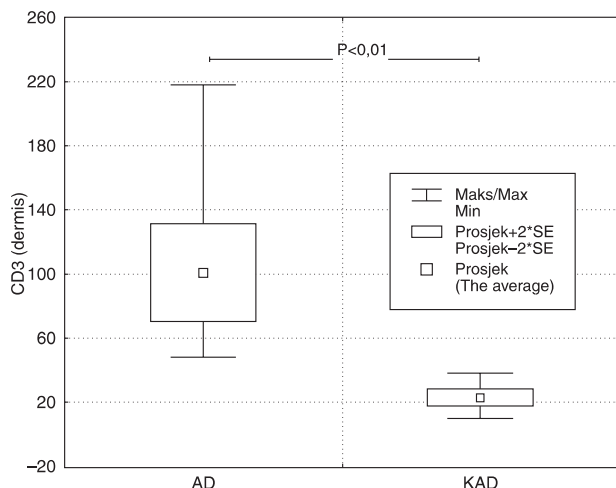
Slika 3.a. Pojavnost CD4+ limfocita u mm² dermisa bolesnika s AD-om i KAD-om

Figure 3a. Membrane CD4+ expression in mm² dermis derived from skin infiltrates of patients with AD compared with membrane CD30 expression in patients with ACD



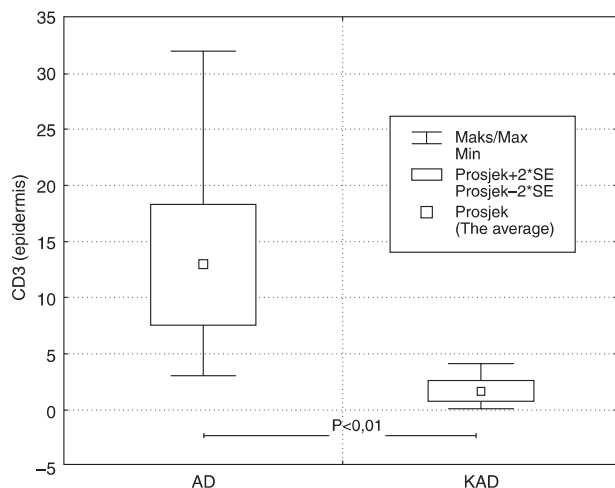
Slika 3.b. Pojavnost CD4+ limfocita u mm epidermisa bolesnika s AD-om i KAD-om

Figure 3b. Membrane CD4+ expression in mm epidermis derived from skin infiltrates of patients with AD compared with membrane CD30 expression in patients with ACD



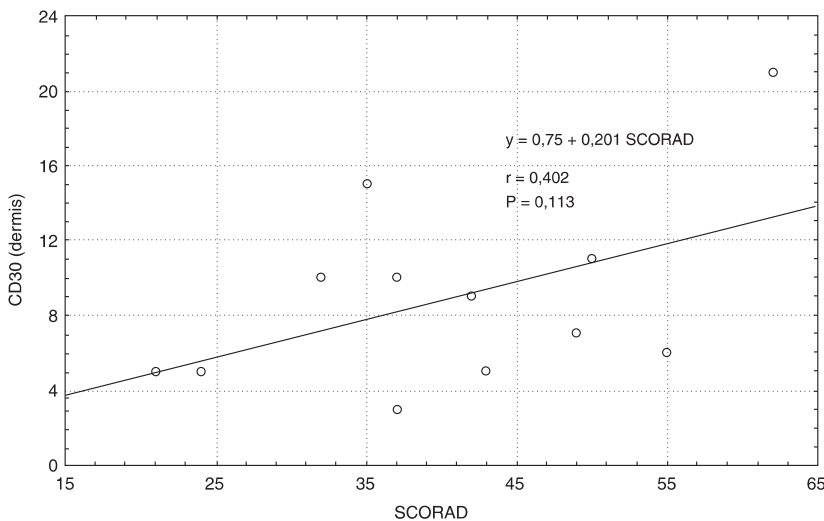
Slika 4.a. Pojavnost CD3+-limfocita u mm² dermisa bolesnika s AD-om i s KAD-om

Figure 4a. Membrane CD3+ expression in mm epidermis derived from skin infiltrates of patients with AD compared with membrane CD30 expression patients with ACD



Slika 4b. Pojavnost CD3+-limfocita u mm epidermisa bolesnika s AD-om i KAD-om

Figure 4b. Membrane CD3+ expression in mm epidermis derived from skin infiltrates of patients with AD compared with membrane CD30 expression in patients with ACD



Slika 5. Korelacija SCORAD indeksa s pojavnosti CD30+-limfocita u dermisu bolesnika s AD-om

Figure 5. Correlation between presence of CD30+ cells in the lesional skin of adults with AD and clinical score (SCORAD index)

limfocita i u dermisu i u epidermisu u odnosu na bolesnike s KAD-om. Razlika je bila statistički značajna ($p < 0,05$). Pojavnost CD4+-molekule u dermisu bolesnika s AD-om pokazuje raspon vrijednosti od 20 do 112, a u bolesnika s KAD-om od 4 do 24.

Srednja vrijednost iskazana prosjekom bila je statistički značajno viša u pacijenata s AD-om (slika 3.a). U bolesnika s AD-om utvrđen je raspon vrijednosti pojavnosti CD4+-limfocita u epidermisu od 1 do 10, istodobno u bolesnika s KAD-om taj se raspon kretao u puno užim granicama od 0 do 2.

Medijan u bolesnika s AD-om bio je statistički značajno viši ($p < 0,05$) u odnosu na medijan u bolesnika s KAD-om (slika 3.b).

Iz slike 4.a i 4.b vidljiv je za ekspresiju CD3-molekule na membrani limfocita znatno veći raspon u bolesnika s AD-om (od 48 do 218 u mm² dermisa i od 3 do 32 mm dužine epidermisa) u odnosu na raspon istog pokazatelja u bolesnika s KAD-om (od 10 do 38 u mm² dermisa i od 0 do 4 mm dužine epidermisa). Iz istih grafova također je vidljivo da su bolesnici s AD-om imali viši prosjek pojavnosti CD3 u odnosu na bolesnike s KAD-om. Razlika je bila statistički značajna ($p < 0,05$) i za dermis i za epidermis. Također je prikazana regresijska i korelacijska analiza, pri čemu je SCORAD-indeks predstavljao prediktor, a CD30 zavisnu varijablu.

Iz slike 5. vidljiva je pozitivna korelacija između ekspresije CD30 i težine bolesti evaluirane prema SCORAD-indeksu, koja međutim nije statistički značajna ($p = 0,113$; $r = 0,402$). Koefficient determinacije (r^2) iznosi 23,2%, što znači da se s pomoću SCORAD-vrijednosti daje objasniti svega 23,2% varijabilnosti CD30 u dermisu.

Rasprava

Sve veća učestalost atopijskog dermatitisa (AD) u kliničkoj praksi uvjetuje pronalaženje novih seroloških i imunoloških pokazatelja koji bi mogli poboljšati objektivno praćenje ovih bolesnika. U ovom radu prikazana je prisutnost CD30 u biopstatima kože bolesnika u akutnoj fazi AD, ali ne i u biopstatima bolesnika s KAD-om. Naši rezultati sugeriraju specifičnu regulatornu funkciju CD30+ obilježenih T-limfocita u akutnom AD-u. Isto se može zaključiti i iz studije Bengtssona, Capronija i Dummera koji su dokazali povezanost između u serumu topljivog CD30 (sCD30) i AD-a, ali ne sCD30 i KAD-a.^{33,34} Imajući u vidu stajalište da je CD30-molekula biljeg za Th-2-limfocite, naše istraživanje potvrđuje prethodne pretpostavke da je Th-2-odgovor dominantan u infiltratu pretežno akutne faze AD-a.

Naši rezultati poklapaju se s rezultatima Dummera i suradnika, koji su dokazali pojavnost CD30 na membranama limfocita u AD-u, ali ne i u KAD-u i predložili CD30 kao koristan biljeg u histološkom diferenciranju tih dviju bolesti.³⁵ Caproni i suradnici su imunohistokemijski također dokazali pojavnost CD30 na CD4+ T-limfocitima u kožnim lezijama bolesnika s AD-om, međutim u tom radu autori nisu pravili razliku između akutne i subakutne/kronične faze bolesti.³⁶ Najinteresantiji rezultat njihove studije je demonstracija značajnog broja CD30+ T-limfocita u lediranoj koži bolesnika s AD-om koji odgovara visokoj vrijednosti topljivog oblika CD30-molekule u serumu, što podupire koncepciju da je AD Th-2/Th-0 dominantna bolest. U istom radu autori su dokazali da ekspresija CD30 na T-staničnim klonovima iz kože bolesnika s AD-om usko korelira sa sposobnošću tih stanica da produciraju IL-4 i IL-5, dok je bila sasvim inverzna s njihovom sposobnošću da produciraju IFN- γ .

I druge studije in vitro podupiru stajalište da kožna infiltracija CD4+ T-stanicama u pacijenata s AD-om uglavnom pripada Th-2-fenotipu te da CD4+ T-stanice iz kožnih lezija atopičara produciraju veliku količinu IL-4, a malo ili ništa IFN- γ , tako pokazuju Th-2/Th-0 profili. Međutim, rezultati kliničkog testa (engl. atopy patch test – APT) pokazuju da se u koži atopičara osim IL-4 producira i IFN- γ ili se producira samo IFN- γ bez IL-4.^{37–39} Taj nesklad mogao bi se objasniti bifazičnim odgovorom na određeni alergen u AD-u koji je karakteriziran, početnim Th-2 dominirajućim odgovorom koji kasnije zamjenjuje Th-1 dominantan odgovor in situ. Imunohistokemijski s anti-IL-4 i anti-IFN- γ primijenjenim u APT-u dokazana je IL-4-pojavnost u početnoj fazi upalnog odgovora nakon koje je uslijedila u kasnijoj i kroničnoj fazi promjena u INF- γ -predominancija.³⁶

S obzirom na to da još uvijek nije utvrđeno da li pozitivna APT-reakcija zaista znači AD ili je tek reakcija iritacije koju je lako izazvati kod atopičara⁴⁰ evaluacija pojavnosti CD3 u tkivu mogla bi pojasniti prirodu pozitivne APT. Iako je uloga CD30 kao biljega za Th-2-limfocite kontroverzna,^{33,41} njegova pojavnost jasno je udružena s AD-om, ali ne i s KAD-om. Navedeni rezultati pokazuju da dokazivanje pojavnosti CD30 na limfocitima u tkivu može biti jednostavan i koristan alat za detekciju imunskog odgovora u kojem dominira Th-2-tip citokina u akutnoj fazi AD.

Naši su rezultati pokazali da je povezanost između pojavnosti CD30+limfocita u dermisu bolesnika s AD-om i težine iste bolesti evaluirane prema SCORAD-indeksu pozitivna, međutim bez statistički signifikantne značajnosti. Također, u ovom radu nismo utvrdili statistički značajnu povezanost između pojavnosti CD30+limfocita u dermisu i pojedinih SCORAD-parametara u bolesnika s AD-om, iako je korelacija među njima bila pozitivnog smjera. Želimo li usporediti ove rezultate s rezultatima sličnih radova, moramo početi od činjenice da u dostupnoj literaturi nailazimo na proturječne podatke. Caproni i suradnici u svojoj su studiji istraživali pojavnost CD30 u biopstatima kože odraslih bolesnika s AD. U toj studiji i broj CD30+stanica i razina topljivog CD30 bili su povećani. Dapače, T-stanični klonovi derivirani iz kože ledirane AD-om secernirali su Th-2-tip citokina i iskazivali membranski CD30.³⁶ Pojavnost CD30-molekule na stanicama koje infiltriraju lediranu kožu u djece s AD-om istraživali su Cavagni i suradnici.⁴¹ Oni su također utvrdili povećan broj CD30-molekule kao i Frezzolini i suradnici,⁴² međutim u svojoj studiji nisu dokazali korelaciju između CD30 i aktivnosti bolesti, niti korelaciju sa sistemskim biljezima IgE-reakcije. Ti rezultati u skladu su s rezultatima Bengtssona i suradnika³³ u odraslih, ali u suprotnosti sa zaključcima Frezzolinija i suradnika kod djece. Naime, prema rezultatima studije Frezzolinija i suradnika prisutnost visoke razine sCD30 u atopijskih pacijenata potvrđuje ulogu

te molekule kao aktivacijskog biljega upotrebljivog na evaluaciju *in vivo* Th-2-imunosnog odgovora, dok korelacija s kliničkim skorom (SCORAD-indeksom) prikazuje molekulu CD30 kao dodatni biljeg aktivnosti bolesti pedijatrijskih pacijenata s AD-om.⁴²

Takvi konfliktni rezultati mogu biti uzrokovani različitim karakteristikama bolesnika i kontrolne skupine ili metodološkim problemima. Pomanjkanje povezanosti može takođe biti uzrokovano malim uzorkom. Naši rezultati najviše se podudaraju s navodima Cavagnija i suradnika. Na smjer i jačinu povezanosti dvaju obilježja može utjecati više čimbenika. U citiranim radovima bolesnici su bili različite dobi, a ispitne su se skupine razlikovale i po težini kliničke slike prilikom uzimanja uzoraka kože za analizu. To u značajnoj mjeri otežava međusobne usporedbe dobivenih rezultata. Što se tiče naših rezultata, za procjenu korelacije između ekspresija CD30 na limfocitima i SCORAD-indeksa svakako je značajno mogla utjecati relativno mala učestalost pacijenata s visokim odnosno niskim SCORAD-indeksom. Osim toga neki autori⁴³ drže da se pri usporedbi kvantitativnih vrijednosti, kao što je broj limfocita s CD30-molekulama na membrani limfocita u koži bolesnika, sa semikvantitativnim obilježjima (ocjena težine bolesti) ne može očekivati izravna korelacija.

Zaključak

Imajući u vidu postavljene ciljeve i utvrđene rezultate, u zaključku možemo istaknuti da u ovom radu utvrđena statistički značajno viša pojavnost CD30-molekule na membranama limfocita u biopstatima kože bolesnika u akutnoj fazi AD-a, ali ne i u biopstatima bolesnika s akutnim KAD-om prikazuje CD30-molekulu kao koristan biljeg u diferenciranju AD-a i KAD-a. Također, pojavnost CD30 u koži bolesnika u akutnoj fazi AD-a mogla bi pojasniti prirodu pozitivne APT-reakcije. Stoga, bi određivanje CD30-molekule u biopstatima kože bilo opravdano kao dodatna metoda u praćenju i liječenju bolesnika s AD-om.

Biopsija i histopatološka pretraga pacijenata ispitne (akutni atopijski dermatitis) i kontrolne (akutni kontaktni alergijski dermatitis) skupine vršena je u Klinici za kožne i spolne bolesti KBC-a i MF-a u Zagrebu, gdje je postavljena dijagnoza ovih bolesti. Imunohistokemijska pretraga učinjena je u Kliničkom zavodu za patologiju KBC-a i Medicinskog fakulteta u Zagrebu (prof. dr. sc. Jasminka Jakić-Razumović).

LITERATURA

1. Hanifin JM, Rajka G. Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Derm Venerol* (Stock) 1980; 92(Suppl. 92):44–7.
2. Aberg N, Hasselmar B, Aberg B, Eriksson B. Increase of asthma, allergic rhinitis and eczema in Swedish schoolchildren between 1979 and 1991. *Clin Exp Allergy* 1995;25:815–9.
3. Queille-Roussel C, Raunaud F, Saraud JH. A prospective computerized study of 500 cases of atopic eczema in childhood. Initial analyses of 250 parameters. *Acta Derm Venerol* (Stockh) 1985;114:87–92.
4. Diepgen TL, Fartasch M, Hornstein OP. Evaluation and relevance of atopic basic and minor features in patients with atopic dermatitis and in the general population. *Acta Derm Venerol* (Stockh) 1989;144:50–4.
5. Dekaris D. Reakcije tipa I anafilaktične reakcije ili reakcije ovisne o reaginima. U: Temeljna alergologija. Zagreb: Školska knjiga, 1983:29–84.
6. Moffatt MF, Cookson WO. Genetics of asthma and inflammation: the status. *Current Opinion in immunology* 1999;11:606–9.
7. Mihm MC, Soter NA, Dvorak HF i sur. The structure of normal skin and the morphology of atopic eczema. *J Invest Dermatol* 1976;67:305–12.
8. Braathen LR, Forre O, Natvig JB i sur. Predominance of T lymphocytes in the dermal infiltrate of atopic dermatitis. *Br J Dermatol*, 1979;100:511–9.
9. Leung DYM, Ghan AK, Schneeberger EE i sur. Characterization of the mononuclear cell infiltrate in atopic dermatitis using mononuclear antibodies. *J Allergy Clin Immunol* 1983;71:47–56.
10. Evans RI, Wall DW, Platsoucas CD i sur. Thymus-dependent membrane antigens in man: Inhibition of cell-mediated lympholysis by monoclonal antibodies to the Th2 antigen. *Proc Nat Acad Sci USA*. 1981;78:544–8.
11. Ledbetter JA, Evans RL, Lipinski M, Cunningham-Rundles C, Good RA, Herzenberg LA. Evolutionary conservation of surface molecules that dis-

- tinguish T lymphocyte helper/inducer and T cytotoxic/suppressor subpopulations in mouse and man. *J Exp Med.* 1981;153:310–23.
12. *Dalgleish AG, Beverley PCL, Clapham PR i sur.* The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature.* 1984;312:763–7.
 13. *Garson JA, Beverley PCL, Coakham HB, Harper EJ.* Monoclonal antibodies against human T lymphocytes label Purkinje neurons of many species. *Nature.* 1982;298:375.
 14. *Brenner MB, Groh V, Porcelli SA i sur.* Plenary papers: Structure and distribution of the human T-cell receptor. In: Knapp W, Dorken B, Gilks WR, et al, eds. *Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens.* Oxford: Oxford University Press; 1989:1049.
 15. *Norton AJ, Ramsay AD, Smith SH, Beverley PC, Isaacson PG.* Monoclonal antibody (UCHL-1) that recognizes normal and neoplastic T cells in routinely fixed tissues. *J Clin Pathol.* 1986;39:399–405.
 16. *Akbar AN, Terry L, Timms A, Beverley PC, Janossy G.* Loss of CD45R and gain of UCHL-1 reactivity is a feature of primed T cells. *J Immunol.* 1988;140:2171–8.
 17. *Smith SH, Brown MH, Rowe D, Callard RE, Beverley PC.* Functional subsets of human helper-inducer cells defined by a new monoclonal antibody, UCHL-1. *J Immunol.* 1986;58:63–70.
 18. *Gruss H-J, Herrmann F.* CD30 ligand, a member of the TNF ligand superfamily, with growth and activation control CD30+ lymphoid and lymphoma cells. *Leuk Lymphoma* 1996;20(S-6):397–409.
 19. *Schwab U, Tein H, Gerds N, Lemke H, Kirchner H, Schaadt M, Diehl V.* Production of a monoclonal antibody specific for Hodgkins and Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease and a subset of normal lymphoid cells. *Nature* 1982;299:65–7.
 20. *Chialre R, Podda A, Prolla G, Gong J, Thorbecke GJ, Inghirami G.* CD30 in normal and neoplastic cells. *Clin Immunol* 1999;90(2):157–64.
 21. *Falini B, Pileri S, Pizzolo G, Durkop H, Flenghi L, Stirpe F, Martelli MF, Stein H.* CD30 (Ki-1) molecule: a new cytokine receptor of the tumor necrosis factor receptor superfamily as a tool for diagnosis and immunotherapy. *Blood* 1995;85(1):1–14.
 22. *Smith C, Davis T, Anderson D i sur.* A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. *Science* 1990;248:1019–23.
 23. *Lotz M, Setareh M, von Kompis J, Schwarz H.* The nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor family. *J Leukoc Biol* 1996;60(1):1–7.
 24. *Gedrich RW, Gilfillan MC, Duckett CS, Van Dongen JL, Thompson CB.* CD30 contains two binding sites with different specificities for members of the tumor necrosis factor receptor-associated factor family of signal transducing proteins. *J Biol Chem* 1996;271:12852.
 25. *De Bruin PC, Gruss HJ, van der Valk P, Willemze R, Meijer CJ.* CD30 expression in normal and neoplastic lymphoid tissue: biological aspects and clinical implications. *Leukemia* 1995;9(10):1620–7.
 26. *Stein H, Mason DY, Gerders J, O'Connor N i sur.* The expression of the Hodgkin's disease associated antigen Ki-1 in reactive and lymphoid neoplastic tissue: evidence that Reed-Sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells. *Blood* 1985;66:848–58.
 27. *Horie R, Watanabe T.* CD30: expression and function in health and disease. *Semin Immunol* 1998;10(6):547–70.
 28. *Romagnani S, Del Prete G, Maggi E, Chilosi M, Caligaris-Cappio F, Pizzolo G.* CD30 and type 2 T helper (Th2) responses. *J Leukoc Biol* 1995;57:726–30.
 29. *Younes A, Carbone A.* CD30/CD30 ligand and CD40/CD40 ligand in malignant lymphoid disorders. *Int J Biol Markers* 1999;14(3):135–43.
 30. *Bengtsson A, Johansson C, Linden MT, Hallden G, Ploeg I van der, Scheynius A.* Not only Th2 cells, but also Th1 and Th0 cells express CD30 after activation. *J Leukoc Biol* 1995;58:683–9.
 31. *European Task Force on Atopic dermatitis.* Severity scoring of atopic dermatitis: the SCORAD index (Consensus report of the European Task Force on atopic dermatitis). *Dermatology* 1993;186:23–31.
 32. *Halbert AR, Weston WL, Morelli JG.* Atopic dermatitis: Is it an allergic disease? *J Am Acad Dermatol* 1995;33:1008–18.
 33. *Bengtsson A, Johansson C, Linden MT, Hallden G, Ploeg I van der, Scheynius A.* Not only Th2 cells, but also Th1 and Th0 cells express CD30 after activation. *J Leukoc Biol* 1995;58:683–9.
 34. *Dummer V, Brocker EB, Basman BC.* Elevated serum levels of soluble CD30 are associated with atopic dermatitis, but not with respiratory atopic dermatitis and allergic contact dermatitis. *Br J Dermatol* 1997;137:185–7.
 35. *Dummer W, Rose C, Brocker EB.* Expression of CD30 on T helper cells in the inflammatory infiltrate of acute atopic dermatitis but not of allergic contact dermatitis. *Arch Dermatol Res* 1998;290:598–602.
 36. *Caproni M, Bianchi B, D'Elios M, De Carli M, Amedei A, Fabbri P.* In vivo relevance of CD30 in atopic dermatitis. *Allergy* 1997;52:1063–70.
 37. *Grewe M, Gyufco K, Schopf E, Krutmann J.* Lesional expression of interferon- γ in atopic eczema. *Lancet* 1994;343:25–6.
 38. *Sager N, Feldmann A, Schilling G, Kreitsch P, Neumann C.* House dust mite-specific T cells in the skin of subjects with atopic dermatitis: frequency and lymphokine profile in the allergen patch test. *J Allergy Clin Immunol* 1992;89:801–10.
 39. *Virtanen T, Maggi E, Menetti R i sur.* No relationship between skin-infiltrating Th2-like cells and allergen-specific IgE response in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1995;96:411–20.
 40. *Hanifin JM.* Assembling the puzzle pieces in atopic inflammation. *Arch Dermatol* 1996;132:1230–2.
 41. *Cavagni G, Caffarelli C, Facchetti F, Brugnoli D, Notarangelo LD, Tosoni C, Altobelli R.* Cutaneous CD30+ cells in children with atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol* 2000;121:224–8.
 42. *Frezzolini A, Paradisi M, Ruffelli M, Cadoni S, De Pita O.* Soluble CD30 in pediatric patients with atopic dermatitis. *Allergy* 1997;52:106–9.
 43. *Gebhardt M, Wenzel HC, Hipler UC, Herrmann D, Wolina U.* Monitoring of serologic immune parameters in inflammatory skin diseases. *Allergy* 1997;52:1087–94.

* * *

Vijesti News

**1st INTERNATIONAL SYMPOSIUM
ON REGIONAL ANAESTHESIA AND PAIN CONTROL
1st CROATIAN CONGRESS OF REGIONAL ANAESTHESIA AND ANALGESIA**

European Society of Regional Anaesthesia
Croatian Society of Regional Anaesthesia and Analgesia
Croatian Medical Association, CSRAA-CMA

June 16–19, 2005, Hotel »Excelsior«, Dubrovnik, Croatia

Za sve potrebne obavijesti obratite se:

Prof. dr. sc. Kata Šakić, 098/318317; tel./fax: 29 02 440; e-mail: ksakic@kdb.hr
e-mail: hdraa@kdb.hr www.mef.hr/hdraa,

Kongresni servis/Congressional service:

EURO-VAL d.o.o., Mirna 11, 10040 ZAGREB,

http://www.euroval.hr; e-mail: milenka@euroval.hr; tel.: 385 1 2917183; fax: (0)1 2988 004