

Uloga folikularnih matičnih stanica u patofiziologiji alopecije areate

Sumajstorčić, Danijel

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:830556>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Danijel Sumajstorčić

Uloga folikularnih matičnih stanica u patofiziologiji alopecije areate

DIPLOMSKI RAD



Zagreb, 2015.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Katedri za dermatovenerologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Zrinke Bukvić Mokos i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2014/2015.

SADRŽAJ

1. SAŽETAK

2. SUMMARY

3. UVOD 1

4. MATIČNE STANICE 2

4.1. Jedinstvena svojstva matičnih stanica 2

4.2. Vrste matičnih stanica 4

4.3. Matične stanice kože 6

4.3.1. Različite stanične linije epidermisa 7

4.3.2. Obilježja matičnih stanica kože 9

4.4. Folikularne matične stanice 10

4.4.1. Dosadašnje spoznaje o folikularnim matičnim stanicama i njihovi molekularni biljezi 12

4.4.2. Niša folikularnih matičnih stanica 13

4.4.3. Uloga folikularnih matičnih stanica 14

4.4.4. Folikularne matične stanice – nada za primjenu u regenerativnoj medicini 15

5. ALOPECIA AREATA 18

5.1. Kliničke značajke 18

5.2. Histološke značajke 19

5.3. Patofiziologija alopecije areate 20

5.3.1. Imunološki čimbenici 20

5.3.1.1. Alopecija areata i atopija 21

5.3.2. Genteski čimbenici	21
5.3.2.1. Geni kandidati	22
5.3.3. Neuroendokrino-imunološki čimbenici.....	24
5.4. Uloga folikularnih matičnih stanica u patofiziologiji AA.....	25
5.4.1. Autoantitijela na folikularne strukture	26
5.4.1.1. Autoantitijela na melanocyte folikula dlake	25
5.4.2. Imunološka privilegiranost folikula dlake	27
5.4.2.1. Uloga NK stanica u imunoprivilegiji folikula dlake	28
5.4.2.2. Niša folikularnih matičnih stanica i imunoprivilegija	29
5.4.3. Teorija kolapsa imunoprivilegije folikula dlake.....	30
6. ZAKLJUČAK	32
7. ZAHVALE.....	34
8. POPIS LITERATURE	35
9. ŽIVOTOPIS.....	41

POPIS I OBJAŠNJENJE KRATICA KORIŠTENIH U RADU

AA	alopecija areata
APC	engl. antigen-presenting cells (hrv. stanice koje predočuju antigen)
BrdU	bromodeoksiuridin
CRH	engl. corticotropin-releasing hormone (hrv. hormon koji oslobađa kortikotropin)
DP	dermalna papilla
ECM	engl. extracellular matrix (hrv. izvanstanični matriks)
EPU	engl. epidermal proliferation unit (hrv. proliferacijska jedinica epidermisa)
hESC	engl. human embryonic stem cells (hrv. ljudske embrionalne matične stanice)
HF	engl. hair follicle (hrv. folikul dlake)
HLA	engl. human leukocyte antigen (hrv. ljudski leukocitni antigen)
HPA	engl. hypothalamic-pituitary-adrenal axis (hrv. hipotalamička-pituitarna-adrenalna os)
HSP 70	engl. heat shock protein 70 (hrv. protein šoka 70)
IFE	engl. interfollicular epidermis (hrv. interfolikularni epidermis)

IPSC	engl. induced pluripotent stem cells (hrv. inducirane pluripotentne matične stanice)
IRS	engl. inner root sheath (hrv. unutarnja ovojnica korijena dlake)
LRC	engl. label retaining cells (hrv. stanice koje zadržavaju biljeg)
MIF	engl. melanocyte-inhibiting factor (hrv. čimbenik inhibicije melanocita)
MHC	engl. major histocompatibility complex (hrv. glavni kompleks gena tkivne podudarnosti)
NK	engl. natural killer cells (hrv. stanice prirodni ubojice)
ORS	engl. outer root sheath (hrv. vanjska ovojnica korijena dlake)
SCID	engl. severe combined immunodeficiency (hrv. teška kombinirana imunodeficijencija)
SCF	engl. stem cell factor (hrv. faktor matičnih stanica)
TNF	engl. tumor growth factor (hrv. čimbenik rasta tumora)

1. SAŽETAK

Uloga folikularnih matičnih stanica u patofiziologiji alopecije areate

Danijel Sumajstorčić

Otkriće matičnih stanica u izbočini vanjske ovojnice korijena dlake potaknulo je istraživanja o mogućnosti korištenja folikula dlake kao terapijskog izvora matičnih stanica u regenerativnoj medicini. Folikuli dlake sadrže multipotentne matične stanice koje nakon indukcije i diferencijacije mogu dati specijalizirane stanice epidermisa, dlačnih folikula i pripadajuće lojne žlijezde, a sudjeluju i u regeneraciji epidermisa uslijed tkivnih ozljeda ili bolesti. Smještaj ovih matičnih stanica u izbočini vanjske ovojnice korijena dlake daje općenito objašnjenje zašto pojedini upalni procesi poput *lichen planopilaris* ili diskoidnog eritemskog lupusa uzrokuju trajan gubitak vlasi i/ili dlaka, nasuprot upalnim procesima poput alopecije areate, u kojima dolazi do regeneracije zahvaćenih folikula i ponovnoga rasta vlasi i/ili dlaka. Izbočina dlačnog folikula najprije je opisana u miševa, gdje tvori dobro diferenciranu strukturu. Nasuprot tome, nedostanak jasne morfologije izbočine dlačnih folikula u ljudi pridonio je sporijem tijeku istraživanja na folikularnim matičnim stanicama. Istraživanje matičnih stanica u folikulima dlake započelo je otkrićem mirnih stanica u folikulu, nazvanih stanicama koje zadržavaju biljeg (engl. *label-retaining cells*, LRC). No pravi zamah u istraživanju folikularnih matičnih stanica počeo je tek otkrićem i identifikacijom njihovih molekularnih biljega, poput keratina 15 (K15) i molekula CD34 u miševa te CD200 u ljudi, a koji su omogućili njihovu preciznu izolaciju iz tkiva, kultivaciju *in vitro* i utvrđivanje karakteristika i potencijala folikularnih matičnih stanica. Uloga folikularnih matičnih stanica u patogenezi alopecije areate danas ostaje nerazjašnjena. Zna se kako su oštećenja matičnih stanica rezultat upalnih procesa, a dlačni folikuli mjesta autoimunih reakcija. Ovome pridonose i drugi faktori poput gubitka imunološke privilegije folikula kao i autoimune reakcije koje su rezultat okolišnih čimbenika i genetske predispozicije.

Ključne riječi: folikularne matične stanice, alopecija areata, patofiziologija, terapija.

2. SUMMARY

The role of follicular stem cells in the pathophysiology of alopecia areata

Danijel Sumajstorčić

The discovery of stem cells in the bulge region of the outer root sheath of hair follicles (HF), both in mice and man, has encouraged research into utilizing the hair follicle as a therapeutic source of stem cells for regenerative medicine. The hair follicle contains multipotent stem cells that can form epidermis, hair follicles and sebaceous glands as well as help in repopulation of epidermis after injury. Localization of these stem cells in the bulge area of the hair follicle may explain why some types of inflammatory alopecia cause permanent loss of hair (scarring alopecia such as lichen planopilaris), while others (such as alopecia areata) are reversible (non-scarring alopecia). While being clearly distinguishable structure within hair follicles in mice, the lack of distinctive bulge morphology in human hair follicles has interfered studies of bulge cells. The study of the hair follicle stem cells started by identification of follicular stem cells in HF bulge as quiescent label retaining cells. The research of these cells emerged rapidly after the identification of bulge cell molecular markers, such as keratin 15 (K15) and CD34 in mice and CD200 in humans, which in turn allowed the isolation and further study of bulge cells from follicles. The pathogenesis of alopecia areata and its relation to stem cell involvement is a complicated process. It is known that the damage to stem cells is a result of inflammatory mechanisms; the hair follicle itself is the key target of autoaggressive immunity. In addition, other factors may be involved, including loss of immune protection of stem cells as well as enhanced autoimmunity by environmental factors and genetic predisposition.

Keywords: follicular stem cells, alopecia areata, pathophysiology, therapy.

3. UVOD

Alopecija areata (AA) kompleksna je imunološki posredovana bolest koja zahvaća anagene folikule dlake. Njoj su podložna i djeca i odrasli, a klinički se očituje okruglim do ovalnim arealima bez vlasi i/ili dlaka. U 1-2% svih bolesnika bolest ekstenzivno progredira, uzrokujući gubitak kose i svih dlaka na glavi (AA totalis) ili pak svih dlaka na tijelu (AA universalis). Neposredno prije, u vrijeme ili pak nakon pojave AA, često su zahvaćeni i nokti, od površinskih oštećenja do težih distrofija nokatne ploče. AA se povezuje i s drugim bolestima, napose onim atopijskim poput astme ili atopijskog dermatitisa, ali i autoimunim bolestima, u prvom redu vitiligom i autoimunim tireoiditisom. AA ne poznaje dobnu, rasnu ili etničku selekciju bolesnika. Procjene govore o zahvaćenosti oko 5 milijuna ljudi samo u Sjedinjenim Američkim Državama, dok se životni rizik za obolijevanje od ovoga poremećaja procijenjuje na oko 2 %.

Za razliku od drugih autoimunih bolesti koje zahvaćaju folikule dlake, poput eritematoznog lupusa, u AA dlačni folikuli nisu trajno oštećeni, a sami autoimuni upalni proces lokaliziran je u bulbarnom segmentu folikula, uz poštedu izbočine trajnog dijela folikula gdje se nalazi rezervoar folikularnih matičnih stanica. Time je sačuvana sposobnost regeneracije folikula i ponovnoga rasta kose i dlaka. Zbog ove se svoje karakteristike AA klasificira kao prolazna, neožiljkasta alopecija.

Genetika, psihoemocionalni stres, imunološki i neuroendokrini sustav redovito se navode kao uzroci ovoga poremećaja, iako je vjerojatno riječ o složenim i ne posve razjašnjenim mehanizmima interakcija između ovih čimbenika bolesti. Iako se terapijski primjenju kortikosteroidi i imunomodulatorni lijekovi, ovakvo liječenje nije kauzalno, pa je često frustrirajuće s obzirom na rezultate, a do danas ne postoje općeprihvaćene i na temelju dokaza striktno definirane smjernice za liječenje AA. U ovome radu prikazat će se dosadašnje spoznaje o folikularnim matičnim stanicama, njihovoj lokalizaciji, fiziološkoj ulozi i načinu regulacije njihova usmjerenja, kao i potencijalne uloge u patofiziologiji alopecije areate.

4. MATIČNE STANICE

Matične stanice odlikuju se potencijalom razvoja u mnoge funkcionalno različite stanice organizma kako u tijeku ranoga razvoja tako i u odrasloj dobi. One tako predstavljaju svojevrsan unutarnji popravljajući sustav, dijeleći se praktički neograničeno, a u svrhu nadomještanja stanica tkiva dokle god je organizam živ. Prigodom svake takve diobe, novonastala stanica-kćer ima potencijal ili ostati matičnom stanicom, obnavljajući tako rezervoar matičnih stanica ili postati stanicom specijalizirane funkcije (mišićna, masna, živčana stanica i dr.) (Barrandon & Green, 1987).

Matične stanice razlikuju se od ostalih stanica dvama važnim obilježjima. Prvo, riječ je o nediferenciranim i nespecijaliziranim stanicama sposobnim za neograničeno dijeljenje koje može uslijediti i nakon dužih razdoblja mirovanja, a drugo, u određenim fiziološkim ili eksperimentalnim uvjetima one bivaju inducirane na diferencijaciju u tkivno ili organski specifične stanice specijalizirane funkcije.

Matične stanice važne su za organizam iz više razloga. U tri do pet dana starom embriju, blastocisti, unutarnji sloj nediferenciranih stanica preteča je cijelog ustroja budućega organizma, uključujući i krajnje specijalizirane stanične tipove. S druge strane pak, u većini tkiva odrasle jedinke, primjerice u koštanoj srži, koži, crijevima i mišićima, diskretne populacije matičnih stanica neprestano se dijele, obnavljajući tako istrošene stanice tkiva koje su rezultat bilo normalnog životnog ciklusa, bilo bolesti ili ozljede. U drugim pak organima, napose gušterači, mozgu i srcu, matične stanice dijele se samo u određenim okolnostima.

4.1. Jedinstvena svojstva matičnih stanica

Kako je već navedeno, matične stanice razlikuju se od svih ostalih stanica u organizmu. Neovisno o svome ishodištu i funkciji u organizmu one posjeduju uistinu jedinstvena svojstva, uključujući sljedeće:

(I) Matične stanice sposobne su za neograničeno dijeljenje i obnavljanje vlastitih rezervi u organizmu – one proliferiraju. Tako početna populacija relativno maloga broja

matičnih stanica u *in vitro* uvjetima daje, neprestanim simetričnim diobama kroz određeno vremensko razdoblje, milijune stanica-kćeri identičnih ishodišnim roditeljskim stanicama. Stoga za matične stanice kažemo da posjeduju vremenski neograničen potencijal samoobnavljanja (Rochat et al., 1994).

(II) Matične stanice su nespecijalizirane. One ne posjeduju nikakvu tkivno specifičnu strukturu koja bi im omogućila vršenje tkivno specifične funkcije. Skupina matičnih stanica ne može dolaziti u kontakt niti potpomagati funkciju tkivno specifične stanice (primjerice sudjelovati u opskrbi krvlju kao što to čine srčani miociti). Matične stanice imaju drugu ulogu; one mogu biti inducirane i tada putem asimetrične diobe daju stanicu koja kreće putem diferencijacije i postaje funkcionalnom tkivno specifičnom stanicom (npr. srčani miocit).

(III) Matične stanice preteča su tkivno specifičnih stanica određenih funkcija. Nakon indukcije i diobe mogu se diferencirati. Sam proces diferencijacije obuhvaća niz faza, a sa svakom slijedećom fazom stanica postaje više specijalizirana. Znanstvenici tek započinju razumijevati signale, koji djeluju kao okidač za započinjanje procesa diferencijacije matične stanice, kako one koji potječu iz same stanice tako i one izvanjske. Unutarnji signali su po svemu sudeći kontrolirani od strane staničnih gena, smještenih na lancima uzvojnice DNK, koji nose kodirane instrukcije za sve stanične strukture i funkcije. Vanjski signali za staničnu diferencijaciju uključuju hormone i transmitore, fizički kontakt sa susjednim stanicama te neke još nerazjašnjene molekule iz staničnog mikrokoliša. Interakcija ovih signala uzrokuje u ishodišnoj staničnoj DNK stjecanje određenih epigenetskih oznaka koje moduliraju gensku ekspresiju koja se potom prenosi kroz proces diobe i diferencijacije. Mnoga pitanja o diferencijaciji matičnih stanica ipak za sada ostaju nerazjašnjena. Jesu li unutarnji i vanjski signali za diferencijaciju različitih vrsta matičnih stanica jednaki? Postoji li specifičan set signala koji promovira diferencijaciju u specifičnu vrstu stanice? Odgovore na ovakva i slična pitanja znanstvenici za sada nemaju, a ona su svakako važna, jer će spoznaja tih zakonitosti omogućiti znanstvenicima bolje razumijevanje i kontrolu nad diferencijacijom matičnih stanica u laboratorijima a time i uzgoj stanica i tkiva koja će se moći primijeniti

u specifične svrhe, poglavito u liječenju za sada neizlječivih bolesti (Trempe et al., 2003; Lyle et al., 1998).

4.2. Vrste matičnih stanica

Suvremena znanost donedavno je bila upoznata isključivo s dvije vrste matičnih stanica: embrionalne matične stanice te ne-embrionalne, somatske ili odrasle matične stanice. Ipak, 2006. godine znanstvenici su otkrili način genskog reprogramiranja pojedinih specijaliziranih stanica tkiva kako bi one eksprimirale gene i čimbenike koji su potrebni za održavanje svojstava embrionalnih matičnih stanica. Takve stanice, koje su u početnim fazama razvoja, nazvane su induciranim pluripotentnim matičnim stanicama (engl. Induced pluripotent stem cells, iPSC) a znanstvenici se nadaju njihovoj primjeni u transplantacijskoj medicini (Blanpain & Fuchs, 2006).

Embrionalne matične stanice, kako im samo ime ukazuje, potječu od embrija. Većina embrionalnih matičnih stanica potječe od embrija koji nastaju iz oplođenih jajašaca fertiliziranih tehnikom *in vitro*, a potom doniranih u znanstvene i istraživačke svrhe. Takve stanice uzgojene u laboratorijima nazivaju se staničnom linijom. Ljudske embrionalne matične stanice (engl. human embryonal stem cells, hESC) laboratorijski se generiraju prenošenjem stanica s embrija u predimplantacijskom stadiju na medij za kultivaciju. Ukoliko tako prenešene stanice prežive, dijele se i proliferiraju te se nastavlja prijenos na nove kultivacijske medije. Ovakav proces subkultivacije stanica ponavlja se više puta kroz više mjeseci, sve dok se ne uspostavi stanična linija. Embrionalne matične stanice proliferiraju u staničnoj kulturi kroz prolongirano vremensko razdoblje u velikom broju bez znakova diferencijacije i imaju odbilježja pluripotentnosti. Ukoliko uz to ne razviju određene genetske abnormalnosti, smatraju se embrionalnim matičnim staničnim linijama koje se u bilo kojemu trenutku kultivacije mogu zamrznuti i prenijeti u drugi laboratorij za daljnju kultivaciju i istraživanje. Ako se u ovome procesu kultivacije stanične linije promijeni kemijski sastav staničnoga medija ili površina posudice za kultivaciju, ili se pak same stanice modificiraju retrovirusnom insercijom specifičnih gena, one podliježu procesu diferencijacije te se međusobno

nakupljaju da bi stvorile embrionalna tijela. Znanstvenici se nadaju da će u budućnosti generirati kulture specifičnih tipova diferenciranih stanica (Potten, 1981).

Adultne ili somatske matične stanice ranije su smatrane nediferenciranim stanicama koje se nalaze među specijaliziranim stanicama u tkivima i organima. Glavna zadaća somatskih matičnih stanica jest održavanje i popravak tkiva u kojima se nalaze. Naziv somatska matična stanica oznaka je da se takve stanice nalaze u tkivima u tijelu, a nisu embrionalnoga podrijetla. Dok kod embrionalnih matičnih stanica sam naziv označava njihovo podrijetlo (stanice od predimplantacijskog stadija embrija), podrijetlo pojedinih vrsta somatskih matičnih stanica u pojedinim zrelim tkivima i dalje je nejasno. Nadalje, dok su embrionalne matične stanice pluripotentne, tj. mogu postati bilo kojom specijaliziranom stanicom, somatske matične stanice ipak imaju ograničene mogućnosti diferencijacije – one mogu diferencirati samo u one specijalizirane stanice tkiva u kojem se izvorno nalaze, pa mogu biti unipotentne ili multipotentne. Tipično se u zrelim tkivima nalazi relativno malen broj somatskih matičnih stanica. Stoga je jasna problematika s izolacijom somatskih matičnih stanica iz tkiva, a jednom izvađene iz tkiva one pokazuju ograničen kapacitet za dijeljenje što čini teškoće u stvaranju velikih količina takvih matičnih stanica tj. u stvaranju matičnih staničnih linija. Somatske matične stanice nalaze se u mnogim tkivima: u mozgu, koštanoj srži, perifernoj krvi, krvnim žilama, skeletnoj muskulaturi, srcu, crijevima, jetri, testisima i ovarijima. Prema današnjim shvaćanjima somatske matične stanice u tkivima borave u specifičnom mjestu svakoga tkiva koje se naziva nišom matičnih stanica. U mnogim tkivima, somatske matične stanice su zapravo *periciti*, stanice koje se nalaze u stijenci malih krvnih žila. U pojedinim tkivima, kao što su crijeva, skeletna muskulatura i koža, matične stanice se neprestano induciraju i diferenciraju i tako obnavljaju tkivo, dok se u drugim tkivima kao što su mozak, srce i gušterača, ove stanice uobičajeno nalaze u stanju mirovanja i bivaju inducirane tek u izvanrednim okolnostima za tkivo, napose u bolesti ili tkivnoj ozljedi (Costarelli et al., 1990).

4.3. Matične stanice kože

Koža je najveći organ našeg organizma, a kao takvoj povjerene su joj mnoge funkcije nužne za preživljenje. One uključuju osiguravanje mehaničke barijere, zaštitu od dehidracije i penetracije kemijskih tvari iz okoliša, zaštitu od ultraljubičastih (UV) zraka, zaštitu od patogenih mikroorganizama te ulogu u termoregulaciji te omogućuje senzornu percepciju okoliša. Osim ovih fizioloških funkcija, koža ima i sociološku te estetsku ulogu, a daje informacije i o dobi, spolu pa i socijalnom statusu jedinke. (Blanpain & Fuch, 2006).

Koža odraslog čovjeka sastoji se od različitih ali organiziranih nakupina stanica različitog embrionalnog podrijetla. U svih sisavaca, ubrzo nakon gastrulacije, neuroektodermalne stanice koje zaostaju na površini embrija postaju epidermisom, koji započinje kao jedan sloj nespecijaliziranih stanica. Tijekom razvoja ovaj sloj stanica formira stratificirani epidermis (nazivan još i interfolikularni epidermis, IFE), folikule dlake (engl. hair follicle, HF), lojne žlijezde a na goljoj koži još i apokrine mirisne žlijezde. Stanice koje potječu od mezoderma tvore fibroblaste priležećega dermisa koji formiraju kolagen, krvne žile koje opskrbljuju kožu krvlju, mišiće podizače dlaka (lat. *m. arrector pili*), subkutane masne stanice te imunosne stanice koje se nalaze u koži. Stanice koje potječu od neuralnog grebena tvore melanocyte, senzorne živčane završetke kože i sudjeluju u nastanku dermisa u predjelu glave. Sveukupno, oko dvadesetak različitih staničnih vrsta nalazi se u koži i tvori jedinstvenu funkcionalnu cjelinu.

Epidermis, kao i mnogi drugi epiteli organizma, neprestano se obnavlja u tijeku života jedinke održavajući tako homeostazu i sudjelujući u popravljaju štete izazvane bolešću ili ozljedom. Folikuli dlake pak prolaze cikluse rasta i degeneracije. Sve ovo omogućeno je postojanjem somatskih matičnih stanica u koži. Kako je koža organ kojega čine funkcionalno i morfološki različite stanice, tako se u koži nalazi više vrsta somatskih matičnih stanica. Osim toga, pojedine se matične stanice, a koje sudjeluju u obnovi kožnih staničnih tipova, nalaze i izvan kože (primjerice matične stanice koje obnavljaju kožne limfocite nalaze se i u koštanoj srži). Ovaj se rad međutim temelji na prikazu uloge dva najvažnija tipa somatskih matičnih stanica kože: epidermalnih matičnih

stanica i folikularnih matičnih stanica. Obje vrste posjeduju jedinstvena svojstva zajednička svim matičnim stanicama: mogu se neprestano dijeliti simetričnom diobom kroz prolongirano vremensko razdoblje, obnavljajući tako vlastiti rezervoar ili se pak induksijski mogu dijeliti asimetrično i diferencirati u multiple tkivno specifične specijalizirane stanice kože (Rochat et al., 1994).

4.3.1. Različite stanične linije epidermisa

Zreli epidermis sastoji se od pilosebacealne jedinice koju sačinjavaju folikul dlake, s pripadajućom lojnicom i interfolikularnog epidermisa.

Interfolikularni epidermis je stratificirani skvamozni epitel sačinjen od različitih slojeva stanica. Najdublji sloj zove se bazalni sloj (lat. *stratum basale*), čvrsto je povezan sa priležećim dermisom a sadrži mitotski aktivne progenitorske stanice, koje se neprestalno dijele stvarajući tako diferencirane suprabazalne stanice. Osim toga bazalni sloj sadržava i ekstracelularni matriks (ECM) koji u najvećem dijelu tvori priležuću bazalnu membranu koja odvaja epidermis od dermisa. Najznačajniji ekstracelularni matriks je *laminin*5. Kako stanice napuštaju bazalni sloj i kreću se prema površini kože, one se povlače iz staničnoga ciklusa, gube ekspresiju laminina i ulaze u terminalni diferencijacijski program. Prvi suprabazalni sloj stanica je nazubljeni sloj (lat. *stratum spinosum*), koji sadržava tri do sedam redova pločastih stanica koje su međusobno povezane dezmosomima. Slijede granularni sloj (lat. *stratum granulosum*) koji stvara biokemijske komponente kožne barijere te naposljetku i *stratum corneum* koji odgovara mrtvim stanicama bez jezgara koje se neprestano ljušte s površine kože (Candi et al., 2005). IFE se bez prestanka obnavlja tijekom cijeloga života jedinke kako bi se zamijenile stanice koje se konstantno ljušte s površine kože. I u miševa i u ljudi potrebno je između tri i četiri tjedna kako bi se zamijenile sve stanice interfolikularnog epidermisa.

Razvoj folikula dlake uključuje seriju epitelijalno – mezenhimalne interakcije. Prvo priležeći dermis šalje niz signala u epidermis kako bi se stvorio epidermalni privjesak. Kao reakciju, epidermis emitira signal dermalnim stanicama koji potiče njihovo

sažimanje i formaciju dermalne papile (DP). U konačnici, novoformirana DP šalje signal kako bi inducirala proliferaciju i diferencijaciju potrebnu za formiranje epidermalnog privjeska (Paus et al. 1999). Prvi morfološki znak u razvoju dlačnog folikula jest stvaranje dlačne placode, u kojoj bazalni epitel postaje izduljen i invaginira na mjestima gdje se vrši sažimanje dermalnih stanica. Folikul u nastanku spušta se prema dermisu i obuhvaća sada formiranu dermalnu papilu čije stanice zadržavaju stanje visoke proliferacije. Kako folikul sazrijeva te se proliferirajuće stanice počinju diferencirati u unutarnju ovojnicu korijena dlake (engl. inner root sheath, IRS) koji predstavlja unutarnji kanal buduće dlake (engl. hair shaft, HS) koja predstavlja strukturu terminalno diferenciranih keratinocita koja se izbočuje na površini kože. On degenerira prema površini kože omogućujući protruziju iznad površine kože. Vanjski sloj stanica postaje vanjskom ovojnicom korijena dlake (engl. outer root sheath, ORS) koja se nastavlja na epidermis i bazalnu membranu. Osmog postnatalnog dana u miševa razvoj folikula prema dermisu je završen, a kroz sljedećih sedam dana stanice matriksa proliferiraju i diferenciraju u šest koncentričnih slojeva unutarnje ovojnice korijena dlake i stabiljike dlake. Time je proces morfogeneze završen. Šesnaestog postnatalnog dana u miševa proliferacija stanica u matriksu prestaje i ubrzo potom donje dvije trećine folikula dlake degeneriraju procesom apoptoze stanica. Ovo je katagena faza ciklusa. Epitelni tračak retrahira DP prema gore, gdje se u konačnici smješta neposredno ispod zadebljanja trajnog dijela folikula na mjestu gdje se veže *m. arrector pili*. U ovoj izbočini (engl. bulge) nalaze se folikularne matične stanice. One tada ulaze u telogenu fazu tj. fazu mirovanja. U ovom prvom ciklusu razvoja dlake, telogena faza u miševa traje oko jedan dan, no sa svakim sljedećim ciklusom produžuje se vrijeme telogene faze, ukazujući na potrebnu biokemijsku razinu koja mora biti postignuta kako bi se aktivirao sljedeći ciklus rasta folikula i dlake. Na početku novog ciklusa razvoja dlake, matične stanice u fazi mirovanja bivaju inducirane signalima što potječu od mezenhimalnih stanica dermalne papile. Matične stanice, a riječ je o relativno slabo diferenciranim keratinocitima, tada izlaze iz izbočine tj. matične niše i aktivno proliferiraju kako bi osigurale stanice potrebne za razvoj nove dlake. Ovo je anagena, zrela faza ciklusa rasta dlake. Potpuno formiran i zreo dlačni folikul sastoji se od sedam koncentričnih slojeva diferenciranih stanica; a to su vanjska ovojnica korijena dlake koji je u kontinuitetu s bazalnom

membranom IFE, zatim tri sloja stanica koje formiraju unutarnju ovojnici korijena dlake a koji tvori kanal dlake te na poslijetku tri sloja diferenciranih keratinocita koji tvore dlaku (Blanpain i Fuchs, 2006). Molekularni mehanizmi koji upravljaju morfogeneza folikula dlake kao i ciklusom folikulogeneze su još uvijek nedovoljno istraženi.

4.3.2. Obilježja matičnih stanica kože

Interfolikularni epidermis obnavlja se neprestano tijekom cijeloga života jedinke, no prolazi i reepitelizaciju uslijed ozljeda. Upravo ove karakteristike epidermisa ukazuju na postojanje matičnih stanica u epidermisu, a koje osiguravaju ove značajne funkcije. Histološke analize mišje kože pokazale su kako je mišji epidermis organiziran u nakupine stanica heksagonalne površine koje leže na bazalnom sloju (Mackenzie 1970; Potten 1981). Upravo je za temeljni sloj pretpostavljeno da funkcionira kao epidermalna proliferativna jedinica (engl. epidermal proliferative unit, EPU) s jednom epidermalnom matičnom stanicom po jedinici. Daljnje analize mišje kože otkrile su postojanje diskretnih kolumni malih stanica kroz sve slojeve epidermisa - od bazalnoga do najgornjega terminalno diferenciranoga sloja stanica. Ova istraživanja, provedena mahom sedamdesetih godina prošloga stoljeća, potvrdila su postojanje EPU u bazalnom sluju IFE-a. Takve domene objašnjene su mehanizmom gdje se bazalne stanice dijele asimetrično kako bi dale jednu proliferativnu stanicu kćer koja ostaje u bazalnom sloju i jednu početno diferenciranu stanicu koja napušta bazalni sloj i sudjeluje u obnovi epidermisa (Lechler & Fuchs, 2005). Ova istraživanja međutim nisu dala odgovor koliko se matičnih stanica nalazi u jednoj EPU niti koja je njihova točna lokalizacija unutar jedinice.

U ljudskoj koži epidermis je deblji i ne posve ravan; on naime undulira tvoreći tako duboke epidermalne grebene (engl. *rete ridges*) koji se protežu kroz epidermis usmjereni prema dolje, a potpomažu vezanje epidermisa za priležeći dermis. Upravo su baze tih grebena mjesta u kojima su smještene epidermalne matične stanice u ljudi jer predstavljaju bolje zaštićeno mjesto nego igdje drugdje u interfolikularnom epidermisu (Lavker & Sun, 1982). Sredinom sedamdesetih godina prošloga stoljeća

definirani su uvjeti za uzgoj humanih epidermalnih matičnih stanica *in vitro* (Rheinwald & Green, 1975). Tako kultivirane matične stanice mogu formirati tri vrste kolonija: (i) visoko proliferativne kolonije malih okruglih stanica nediferencirane morfologije (holokloni); (ii) abortirane kolonije velikih stanica izravnote morfologije tipične za terminalno diferencirane stanice (parakloni), te (iii) relativno male heterogene kolonije stanica limitiranog proliferativnog potencijala koje ostare kroz nekoliko ciklusa diobe (merokloni). Iako termin "holokloni" označava proliferativni kapacitet kolonija *in vitro*, stanice koje potječu od jedne jedine epidermalne holoklone kolonije uistinu mogu diferencirati *in vitro* i obnoviti epidermis prenesene *in vivo* (Barrandon & Green, 1987). Ovo ukazuje kako stanice iz holoklonih kolonija posjeduju fundamentalne karakteristike matičnih stanica – one se mogu samoobnavljati ili pak diferencirati u funkcionalne tkivne stanice (Rochat et al., 1994). Suprotno tomu, stanice meroklonih kolonija odgovaraju početno induciranim stanicama koje zadržavaju limitirani kapacitet stanične diobe, prije nego što postanu terminalno diferencirani keratinociti. Ovo otkriće omogućilo je uzgoj keratinocita s teško opečenih bolesnika i njihovu naknadnu primjenu kao autolognih transplantata kultiviranih stanica koje su bile sposobne reepitelizirati oštećenu kožu (Gallico et al. 1984; O'Connor et al. 1981; Pellegrini et al 1999). U idućih 25 godina ova tehnologija omogućila je spašavanje mnogih života. No ovakva koža sadržavala je međutim, samo interfolikularni epidermis, a bez kožnih adneksa. Dlake i lojne žlijezde su nedostajale što upućuje na potrebu za drugom vrstom matičnih stanica, zaduženih za obnovu pilosebacealne jedinice – folikularnih matičnih stanica.

4.4. Folikularne matične stanice

U dlačnim folikulima, folikularne matične stanice nalaze se u diskretnom mikrookolišu, koji se naziva nišom matičnih stanica ili pak izbočinom vanjske ovojnice korijena dlake. Ovaj dio folikula smješten je na bazi donjeg dijela folikula uspostavljenog u tijeku morfogeneze, a koji ne podliježe degeneraciji u tijeku ciklusa folikulogeneze. Folikularne matične stanice su male nediferencirane stanice koje su u stanju mirovanja. Međutim na početku anagene faze one bivaju inducirane signalima mezenhimalnih stanica podležeće dermalne papile. Nakon indukcije one izlaze iz niše, proliferiraju i

diferenciraju kako bi dale različite stanične tipove zrelog folikula dlake. Uz to one predstavljaju i trajni rezervoar multipotentnih matičnih stanica, koje u slučaju potrebe, radi ozljede tkiva, daju specijalizirane stanice za popravak nastale štete epidermisa. Dakle folikularne matične stanice sudjeluju u održavanju normalnog ciklusa rasta dlake, a uz to potpomažu i popravak ozlijeđenog epidermisa.

Godinama se smatralo kako su matične stanice koje regeneriraju dlačni folikul u toku normalnih ciklusa rasta dlake zapravo visoko proliferativne stanice matriksa (Kligman 1959). Ova teorija tek će kasnije biti opovrgnuta, kada su Montagna i Chase ustanovili kako iradijacija X zrakama ubija stanice matriksa, no dlake i dalje mogu nastati iz stanica vanjske ovojnice korijena dlake (Jahoda et al. 1984). Najprije su provedeni pokusi kako bi se utvrdilo postojanje folikularnih matičnih stanica. Polazeći od teze kako su folikularne, kao i sve ostale somatske matične stanice poglavito u fazi mirovanja, primjenjeni su nukleotidni analozi poput bromodeoksiuridina (*BrdU*) kako bi se označile stanice u s-fazi staničnog ciklusa, a potom se pristupilo promatranju sudbine inkorporiranog nukleotida kroz vrijeme. Visoko diferencirane stanice se neprestano ljušte s kože, a proliferativne stanice u raznim stadijima diferencijacije su kroz diobe izgubile nukleotid (dilucija nukleotida), pa su stoga stanice s najmanjim proliferacijskim kapacitetom označene kao stanice koje zadržavaju nukleotid (engl. label-retaining cells, LRC). LRC po svojstvu mirovanja odgovaraju somatskim matičnim stanicama (Bickenbach, 1981).

Zatim je određen smještaj LRC u folikulu dlake. Lavaker i sur., ponovno su primijenili *BrdU* u miševa starih sedam dana, a potom analizirali lokalizaciju LRC stanica kroz četiri tjedna. Opazili su kako se velika većina ovih stanica u koži zadržava na bazi permanentnog dijela dlačnog folikula, poznatijeg kao izbočina vanjske ovojnice korijena dlake (engl. *bulge*). Ova izbočina opisana je od strane histologa prije više od stoljeća (Stohr, 1903), a smještena je neposredno ispod pripadajuće lojne žlijezde na mjestu gdje se za folikul veže *m. arrector pili*. Kako bi potvrdili da se folikularne matične stanice uistinu nalaze u izbočini dlačnog folikula, Barrandon i sur., promatrali su potencijal rasta različitih segmenata mišjih i ljudskih folikula dlake *in vitro*. Rezultati su bili sljedeći: i u miševa i u ljudi 95% holoklonih kolonija potjecalo je od stanica na mjestu izbočine

dlačnog folikula, a manje od 5% holoklonih kolonija potjecalo je od stanica iz segmenta matriksa folikula (Kobayashi et al., 1993), pri čemu je zona holoklonih, visoko proliferativnih stanica bila znatno šira u slučaju humanih folikula dlake protežući se od izbočine do donjeg dijela vanjske ovojnice korijena dlake. Zaključeno je kako je izbočina folikula dlake tj. niša matičnih stanica u ljudi manje morfološki karakteristična struktura nego što je to u glodavaca (Rochat et al., 1994).

4.4.1. Dosadašnje spoznaje o folikularnim matičnim stanicama i njihovi molekularni biljezi

Istraživanja matičnih stanica epidermisa kao i biotehnologija kožnih tkiva područja su intenzivnog razvoja zadnjih desetljeća. Ostvarena su značajna dostignuća na poljima bazičnih i kliničkih istraživanja. Ovo se napose odnosi na mogućnost prepoznavanja različitih kožnih matičnih stanica *in vivo* te njihove izolacije iz tkiva i kultivacije *in vitro*. Dostignuća na polju kliničkih ispitivanja odnose se na prepoznavanje važnosti matičnih stanica kože u njihovom sudjelovanju u popravku tkivnih ozljeda, ali i otvaranja mogućnosti njihove primjene u liječenju prirođenih i stečenih kožnih bolesti primjerice *epidermolysis bullosa*.

Matične stanice, kako je već naglašeno, posjeduju sposobnost neprestanog dijeljenja i time samoobnove vlastitih zaliha u organizmu ili se pak mogu diferencirati u različite specijalizirane stanice. Folikularne matične stanice kože su multipotentne; one se mogu diferencirati u stanice folikula dlake, lojne žlijezde ali i interfolikularnog epidermisa. Osim mirovanja kao jedne od njihovih glavnih odlika, postoje i druga svojstva folikularnih matičnih stanica koja valja istražiti. Izolacija živih matičnih stanica nužna je za njihovu primjenu, primjerice u polju regenerativne medicine. Iako je manualnom mikrodisekcijom izvršena uspješna izolacija matičnih stanica iz folikula dlake, ovaj postupak vremenski je i kadrovski zahtjevan, a dobiveni izolati često su nedovoljno purificirani. Stoga je daljnje istraživanje folikularnih matičnih stanica moralo pričekati novu eru razvoja molekularne biologije, koja traje zadnjih desetljeća, a kojom su utvrđeni određeni molekularni biljezi za preciznu identifikaciju folikularnih matičnih

stanica. Danas se temeljnim molekularnim biljekom folikularnih matičnih stanica smatra *keratin 15* (K15), dok su *CD34* i *CD200* stanični biljezi. Ekspresiju K15 u humanim matičnim stanicama kože prvi je opisao Lyle sa suradnicima 1998 godine. Iako je visoka ekspresija keratina 15 značajan biljeg folikularnih stanica, niske razine K15 ekspresije nalaze se i u stanicama bazalnog sloja folikula dlake te epidemisa općenito, stoga je ekspresivnost K15 kao kriterij za definiranje folikularnih matičnih stanica ipak nedovoljna. Ekspresiju *CD34* prvi je opisao Trempus i sur. te predstavlja najspecifičniji biljeg folikularnih matičnih stanica u miševa. *CD34* međutim ne pokazuje ekspresiju u humanim matičnim stanicama. Umjesto toga, stanični biljeg *CD200* se pokazao specifičnim poput onog u miševa. Folikularne matične stanice mogu se prepoznati i po još nekim molekularnim biljezima, jedan od kojih je i leucerinom bogat G-proteinski receptor (engl. leucine-rich containing G-protein coupled receptor 5, *Lgr5*), no niti on nije potpuno specifičan budući da je izražen i na drugim stanicama dlačnog folikula (Jaks et al., 2008).

4.4.2. Niša folikularnih matičnih stanica

Sve matične stanice nalaze se u specijaliziranim anatomskim lokalizacijama koje se nazivaju nišama matičnih stanica, a koja predstavljaju mjesta specijalnog mikrookoliša sa specifičnim faktorima rasta koji reguliraju aktivnost matičnih stanica. Osim toga takva mjesta pružaju matičnim stanicama i zaštitu; dakle, to su mjesta relativne imunološke privilegije. Izbočina dlačnog folikula predstavlja najbolje definirano mjesto matičnih stanica u koži. Ono je imunoprivilegirano što se ostvaruje putem supresije molekula MHC klase 1 i stimulacije potentnih imunosupresivnih faktora poput alfa-MSH i *CD200*. Ovo omogućuje folikularnim matičnim stanicama zaštitu od djelovanja vlastitog imunološkog sustava. Upravo se gubitak ove relativne imunoprivilegije sve češće navodi kao mogući uzročni ili pak dodatni čimbenik u patofiziologiji trajnih alopecija (Meyer et al., 2008).

Upravo ovakva lokalizacija folikularnih matičnih stanica, smještenih u izbočini trajnog dijela folikula, barem donekle objašnjava razliku između trajnih i reverzibilnih alopecija.

Naime u trajnim alopecijama, kakve se nalaze u npr. *lichen planopilaris*, upalni proces zahvaća superficijalni segment dlačnog folikula, uključujući i izbočinu folikula dlake, ukazujući na oštećenje folikularnih matičnih stanica i time ireverzibilnost procesa. S druge strane pak, u neožiljkastih alopecija, primjerice u *alopeci areati*, upalni proces zahvaća poglavito bulbarni dio folikula koji obuhvaća inducirane progenitorske stanice potekle od folikularnih matičnih stanica. Iako je bulbarni dio folikula odgovoran za direktnu produkciju dlake, a njegova destrukcija vodi izravnom nestanku dlake, izbočina dlačnog folikula tj. niša folikularnih matičnih stanica u ovom slučaju ostaje pošteđena, a time se omogućava stvaranje novog donjeg dijela folikula i razvoja dlake nastupom nove anagene faze ciklusa (Ohshima, 2012; Whisting, 2003).

4.4.3. Uloga folikularnih matičnih stanica

Kada su folikularne matične stanice izolirane i potom transplantirane na imunodeficientne miševe, pokazale su sposobnost diferencijacije u različite stanične linije kože. Tako su iz njih nastale specijalizirane stanice folikula dlake, pripadajuće lojne žlijezde ali i bazalne a time i suprabazalne, terminalno diferencirane stanice interfolikularnog epidermisa (IFE). Ovim istraživanjem utvrđena je njihova multipotentnost (Oshima et al., 2001). No tijekom iste studije zamijećeno je kako folikularne matične stanice ne sudjeluju u održavanju homeostaze epidermisa, već je odgovornost za to posve dodijeljena unipotentnim progenitorskim stanicama bazalnog sloja epidermisa. Ipak, prilikom opsežnijih ozljeda tkiva, primjerice opekline trećeg stupnja, one bivaju aktivirane, rapidno migrirajući prema leziji sudjelujući u popravljaju epidermisa. One se tada dijele u više staničnih tipova obnavljajući pilosebacealnu jedinicu i interfolikularni epidermis (Ito et al., 2007; Levy et al., 2007; Nowak et al., 2008; Taylor et al., 2000).

Danas je sve više dokaza koji upućuju na to kako su epidermalne matične stanice smještene u bazalnom sloju epidermisa manje potentne od folikularnih matičnih stanica koje se nalaze u izbočini folikula dlake. Dokazi upućuju na to kako je uistinu riječ o unipotentnim matičnim stanicama, koje vjerojatno nastaju migracijom pojedinih

aktiviranih folikularnih matičnih stanica iz HF. Primjerice, nasuprot folikularnim matičnim stanicama koje imaju točno definiranu nišu, niša epidermalnih matičnih stanica do danas nije jasno i precizno lokalizirana, a upravo je protektivni mikrokoliš niše esencijalan za očuvanje i integritet rezervoara matičnih stanica. Nadalje, folikularne matične stanice su mirnije stanice od onih u interfolikularnom epidermisu (Costarelli et al., 1990), a i označene radioaktivnim nukleotidom ostaju dulje uočljive (LRC) nego što je to slučaj sa stanicama u interfolikularnom epidermisu. Stanice kultivirane od folikularnih matičnih stanica pokazuju veći holokloni potencijal *in vitro* nego one koje su kultivirane od stanica interfolikularnog epidermisa (Rochat et al., 1994). U konačnici, a u prilog ovoj tezi, govori i činjenica kako površinske opekline koje zahvaćaju epidermis, ali pri kojima folikuli dlake ostaju sačuvani, ne zahtijevaju transplantaciju kože, što nije slučaj sa opsežnim dubokim opeklinama kada nestaju i dlačni folikuli (Alonso & Fuchs, 2003). Stoga je predložena teorija kako multipotentne folikularne matične stanice, povremeno izlaze iz niše kako bi naselile bazalni sloj epidermisa, tu se djelomično diferenciraju i postaju zadužene za održavanje homeostaze isključivo interfolikularnog epidermisa.

4.4.4. Folikularne matične stanice – nada za primjenu u regenerativnoj medicini

S obzirom na njihovu lokalizaciju, folikularne matične stanice predstavljaju obećavajući izvor lako dostupnih somatskih matičnih stanica. Razvojem molekularnih tehnika koje su omogućile izolaciju i kultivaciju autolognih somatskih epidermalnih, mezenhimalnih i neuronalnih stanica podrijetla matičnih stanica dlačnog folikula, otvorena je mogućnost za brojne terapijske mogućnosti primjene ovih stanica. Posebice se to odnosi na polje nove, regenerativne medicine i liječenje bolesnika s opsežnim opeklinama, ubrzavanje cijeljenja velikih, kroničnih kožnih ulceracija, *de novo* stvaranje dlačnih folikula u bolesnika s alopecijom te u konačnici otvaranje novih strategija genske terapije. Upravo bi genska terapija imala ulogu u liječenju naslijednih kožnih bolesti (npr. *epidermolysis bullosa*), gdje bi se genetski modificirane i potpuno funkcionalne autologne folikularne

matične stanice transplantirale sa svrhom postupne zamjene oštećenog kožnog tkiva (Ferrari et al., 2006; Mavilio et al., 2006).

Iako su spoznaje o folikularnim matičnim stanicama sve brojnije, ipak mnoga pitanja ove domene ostaju nerazjašnjena, a cijelo polje regenerativne medicine i genske terapije putem folikularnih matičnih stanica ostaje za sada na razini predkliničkih istraživanja. Za sada, jedino se epidermalne matične stanice bazalnog sloja interfolikularnog epidermisa koriste u kliničkom radu, u liječenju bolesnika s opsežnim opeklinama. Ova metoda liječenja prvi put je opisana sada već davne 1979. godine (Green et al., 1979), kada je utvrđeno kako humane epidermalne matične stanice posjeduju veliki proliferativni potencijal. Svega nekoliko *in vitro* kultiviranih matičnih stanica moglo je regenerirati, diferencirati i time stvoriti potpuno funkcionalnu kožu (interfolikularni epidermis bez adneksa), koja se potom transplantirala teško opečenim bolesnicima. Ovim pristupom omogućena je transplantacija velikih dijelova autologne kože, daleko većeg kapaciteta nego što je to dopuštala dotadašnja metoda izravne autologne transplantacije kože. No i ova metoda limitirana je s više čimbenika; odnosi se to u prvom redu na visoke troškove izolacije i kultivacije matičnih stanica *in vitro*, kao i na vrijeme potrebno za uzgoj i formiranje ovakvih epidermalnih presađaka, te u konačnici na nedostatnost cjelokupnih kožnih adneksa, poglavito folikula dlake. S ciljem postizanja regeneracije folikula dlake stanice dermalne papile moraju biti transplantirane istodobno s epidermalnim matičnim stanicama kako bi se stimulirala regeneracija folikula dlake. Naime, morfogeneza i regeneracija folikula dlake mnogo je kompleksniji proces nego regeneracija interfolikularnog epidermisa, jer razvoj folikula ovisi, kao što je to slučaj sa svim tkivima ektodermalnoga podrijetla, o recipročnim epitelijalno – mezenhimalnim interakcijama i prisutnosti više tipova matičnih stanica: epidermalnih i folikularnih (Pispa & Theseleff, 2003). Stoga, kako bi se postigla regeneracija folikula dlake, potrebno je transplantirati i regenerirati multiple vrste matičnih stanica kao i njihove niše. Mnoge studije pokušale su razviti tehnologije transplantacije matičnih stanica za obnovu donjih dijelova dlačnog folikula kako bi se postigla *de novo* folikulogeneza i regeneracija svih staničnih struktura koje su rezultat epitelijalno – mezenhimalne interakcije (Weinberg et al., 1993; Kishimoto et al., 1999; Lichti et al., 2008).

Najnovije studije pokazuju kako se funkcionalno potpuna regeneracija folikula dlake može dobiti korištenjem više tipova matičnih stanica i njihovih niša u laboratorijski stvorenim folikulima dlake. Upravo ove studije omogućile su daljnje usavršavanje biotehnologija za razvoj folikula dlake *in vitro*, a koje će sasvim sigurno omogućiti daljnje strategije regenerativne terapije gubitka dlaka i/ili vlasi uzrokovanog ozljedom ili bolestima poput alopecije areate ili androgenetske alopecije (Asakawa et al., 2012; Toyoshima et al., 2012).

5. ALOPECIA AREATA

Mnoge se lekcije iz autoimunosti, posebice one o ulozi relativne imunološke privilegije, kao i one o važnosti međusobne interakcije između genetike i neuroimunologije, daju iščitati iz proučavanja alopecije areate (AA), najučestalijeg uzroka upalom izazvanog gubitka vlasi i/ili dlake. No, iako je alopecija areata jedna od najučestalijih organ-specifičnih autoimunih bolesti u ljudi, svakodnevna klinička imunologija kao i istraživanja na polju autoimunosti pomalo zanemaruju ovu autoimunu bolest folikula dlake. Nasuprot toga, alopecija areata pruža izvrsne mogućnosti istraživanja organ-specifične autoimunosti i uloge imunogenetike, neuroimuno – endokrinih čimbenika kao i teorije imunološkoga kolapsa na ljudskome modelu. Dodatno, postojanje kompatibilnog, životinjskoga modela ovog poremećaja, kao i postojanje *in vitro* kultura humanih dlačnih folikula, čine AA atraktivnim i uzornim modelom za istraživanje autoimunosti općenito (Safavi & Muller, 1995; Paus et al., 1989; Gilhar & Kalish, 2006).

5.1. Kliničke značajke

Alopecija areata najčešće se manifestira u vidu oštro ograničenih okruglih ili ovalnih područja s potpunim gubitkom dlaka, bez znakova upale, koje se pojavljuju na vlasištu, rukama, nogama, pubičnoj regiji trepavicama ili obrvama. No osim ovoga, najučestalijeg oblika, AA može se javiti i u još dva oblika: kao *alopecija totalis* (AT) koja se očituje potpunim gubitkom kose i dlaka u predjelu lica ili kao *alopecija universalis* (AU) - potpuni gubitak kose i svih dlaka na tijelu. Karakteristično se nalaze kratke dlake, svinute prema svojoj bazi (dlake u obliku upitnika) te nove kratke nepigmentirane dlake na mjestu lezije. Bolest može zahvatiti i nokte na kojima se nalaze foveole ili, u težim slučajevima, distrofija nokta (primjerice trachyonychia). Iako bolest najčešće započinje na vlasištu (u 90% slučajeva), moguća je progresija bolesti na bradu, trepavice i obrve.

Iako se literaturni podaci razlikuju, procijenjena stopa prevalencije iznosi 0.1% (Tazi-Ahnini et al., 2002). Bolest zahvaća oba spola podjednako kao i sve dobne i etničke skupine. Iako se bolest može manifestirati bilo kada u životu, vršak incidencije (u više

od 60% bolesnika) je u dobi od 20. do 25. godine života (Madani i Saphiro, 2000). Bolest zahvaća podjednako oba spola; ipak, muškarci češće obolijevaju od težih oblika bolesti (AT ili AU). AA je povezana i s drugim autoimunim bolestima i poremećajima, ponajprije s vitiligom i autoimunim tireoiditisom.

Postoje dokumentirani slučajevi o iznenadnoj depigmentaciji skupine vlasi preko noći na kojima je potom uslijedio fulminantni napad AA, što predstavlja rijetku varijantu AA (Plinck et al., 1993). AA zahvaća isključivo dlačne folikule u anagenoj fazi ciklusa, koji aktivno sudjeluju u procesu melanogeneze. Upravo ove kliničke i histološke opservacije dovele su do postavljanja teze prema kojoj melanocitni i anageni folikularni autoantigeni imaju ključnu ulogu u patogenezi AA (Paus et al., 1994).

U suprotnosti s ožiljkastim alopecijama, folikuli dlaka u lezijama AA bivaju pošteđeni i zadržavaju sposobnost regeneracije i ponovnoga rasta dlaka. Blagi oblici bolesti pokazuju visoke stope spontane remisije, a čak i teški slučajevi AA universalis ponekad pokazuju spontane i potpune remisije. Lošija prognoza bolesti povezuje se s nastupom bolesti u ranijoj životnoj dobi, velikom proširenošću bolesti, zahvaćenošću ruba vlasišta (ofijaza), pozitivnom obiteljskom anamnezom i atopijom (Tosti et al., 2006).

Terapija AA je nažalost problematična, a vrlo često i frustrirajuća. Iako blaži oblici bolesti, definirani kao izolirani ili limitirani areali gubitka dlake, pokazuju visoke stope spontane remisije i u većini slučajeva dobro reagiraju na intralezionalnu primjenu kortikosteroida, teži oblici bolesti, poput AA totalis ili AA universalis, obično predstavljaju veliki terapijski problem. Dodatni problem predstavlja i činjenica kako danas ne postoje opće prihvaćene, a na temelju dokaza striktno definirane smjernice za liječenje alopecije areate (Sladden et al., 2005).

5.2. Histološke značajke

Ključnu histološku karakteristiku AA predstavlja limfocitni infiltrat donjeg dijela anagenog folikula, koji se može pojaviti u obliku "roja pčela" (engl. "*swarm of bees*" pattern). CD4+ T limfociti prevladavaju u infiltratu koji okružuje dlačni folikul, dok su T stanice koje

infiltriraju folikularni epitel predominantno CD8+ fenotipa. Kako perifolikularne imunostne stanice pošteđuju izbočinu trajnog dijela HF (nišu folikularnih matičnih stanica), zahvaćeni folikuli zadržavaju mogućnost regeneracije i ponovnog rasta dlake. Zahvaćeni folikuli prerano završavaju anagenu fazu ciklusa i regrediraju putem indukcije masivne apoptoze donjih dijelova folikula (katagena faza), što rezultira uspostavom telogene faze - zahvaćeni folikuli su u mirovanju. Oni tada mogu ponovno ući u anagenu fazu ciklusa, no zbog prisutnosti limfocitnog infiltrata opet prerano podliježu katagennoj fazi i završavaju ponovno u fazi mirovanja, što rezultira smanjenjem dlačnih folikula, koji se na histološkim presjecima tkiva uočavaju kao "mimi" i minijaturizirani folikuli dlake. Alopecija areata stoga predstavlja poremećaj folikularnog ciklusa u dvostrukom smislu: T limfociti napadaju isključivo anagene folikule dlake, a potom remete normalan ciklus rasta dlake, inducirajući prijelaz anagene u katagenu fazu rasta i konačno u telogenu fazu (McDonagh & Messenger, 1996).

5.3. Patofiziologija alopecije areate

Prema suvremenim shvaćanjima etiologije AA, genetski čimbenici, psihoemocionalni stres, imunološki i neuroendokrini sustav redovito se navode kao uzroci ovoga poremećaja, iako je vjerojatno riječ o složenim i ne posve razjašnjenim mehanizmima interakcija između ovih etiopatogenetskih čimbenika.

5.3.1. Imunološki čimbenici

Vanjski čimbenici, poput infekcija, okolišnih čimbenika, čimbenika stresa, toksina pa i načina prehrane, inkriminirani su za odgovornost induciranja bolesti. U jednoj studiji nađena je i citomegalovirusna (CMV) DNK u lezijama AA (Tosti et al., 1996), no ovo je otkriće ipak uzeto s rezervom, tim više što u sljedećim studijama, primjenom tehnike lančane reakcije polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) na mononuklearnim stanicama periferne krvi bolesnika, nije pokazana korelacija između AA i aktivne ili latentne CMV infekcije. Slično tomu je i povezanost između *Helicobacter pylori* infekcije i AA do danas nerazjašnjena (Dudda-Subramanya et al., 2007).

Danas većina studija pruža dokaze koji ukazuju na autoimunu etiologiju ove bolesti, s procesom koji je posredovan T staničnim odgovorom. Protutijela na anagene folikularne strukture nađena su u zahvaćenim lezijama kako u ljudi tako i na mišjem modelu. Ova su autoantitijela utvrđena imunofluorescencijom u više od 90% bolesnika s AA, za razliku od 30% pozitivnih nalaza protutijela u kontrolnoj skupini. Na autoimuni process ukazuje i histološki nalaz gustog perifolikularnoga (CD4+) i interfolikularnoga (CD8+) staničnoga infiltrate u anagenoj fazi, mogućnost transmisije AA putem kultivacije T limfocita sa zahvaćenog vlasišta, a potom prenesenih na imunodeficientne miševe (engl. *severe combined immunodeficiency*, SCID) te u konačnici i klinički odgovor na primjenu imunosupresivnih lijekova i imunomodulatora. (Gilhar et al., 1998).

5.3.1.1. Alopecija areata i atopija

Atopijske bolesti su u visokom postotku (oko 60%) povezane s AA. Stoga je pretpostavljeno kako su atopijske bolesti poput bronhalne astme ili atopijskog dermatitisa rizičan čimbenik za razvoj AA. Nadalje, u bolesnika s AA koji imaju pozitivnu osobnu ili obiteljsku anamnezu za atopijske bolesti, opažene su rjeđe spontane remisije AA te lošiji odgovor na kortikosteroidnu terapiju. Ova spoznaja potvrđuje činjenicu kako su atopijske bolesti usitinu dodatni čimbenik rizika za obolijevanje od AA. Razlog za ovu očigledno višu incidenciju atopijskih bolesti u osoba pogođenih AA može se pripisati genima koji su uključeni u upalnu komponentu AA, a uz to povećavaju rizik za alergijsku reakciju. Osim toga, povišene serumske vrijednosti imunoglobulina E (IgE), klase imunoglobulina esencijalnog za alergijski odgovor i tradicionalno povezanog s atopijom, nađene su i u bolesnika zahvaćenih AA-om, a koji ne pate od atopijskih bolesti (Roselino et al., 1996).

5.3.2. Genetski čimbenici

Genetski čimbenici važni su u etiopatogenezi AA. Utvrđena je visoka korelacija pozitivne obiteljske anamneze i obolijevanja od AA, koja iznosi između 10 i 40%, a sa sveukupnim rizikom obolijevanja od 2%, što je nešto veći rizik negoli je to slučaj sa

osobama bez pozitivne obiteljske anamneze. Genetska povezanost dodatno je utvrđena u studijama pojavnosti AA u monozigotnih blizanaca, u kojima rizik pojavnosti AA u drugog blizanca raste do 55% (Scerri & Pace, 1992). Više stope incidencije (8.8%) zabilježene su u osoba s Down-ovim sindromom, što je itekako viša stopa nego što je to slučaj sa općom populacijom. AA se danas smatra poligenetskom bolešću, koja je rezultat djelovanja nekoliko velikih gena. Zadnjih desetljeća govori se o multifaktorijskom naslijeđivanju AA, kako bi se opisali fenotipovi, koji za razliku od klasičnih Mendelovih zakona naslijeđivanja nisu rezultat jednog genskog lokusa, ali posjeduju genetsku komponentu. To je potvrđeno u studijama provedenim na blizancima te u epidemiološkim studijama (Lander & Schork, 2001).

Naime, dva su pristupa u istraživanjima genetske komponente u neke bolesti. Prvi pristup predstavlja primjenu asocijativnih studija, u kojima se suspektni gen testira za povezanost s određenom bolešću u nekoj populaciji. No ovakav pristup limitiran je mogućnošću lažno pozitivne povezanosti, stoga je nužno primijeniti i frekvencijske studije pojedinog suspektnog gena na multiplim populacijama. Drugi pristup je pretraga cjeloukupnog genoma (engl. *genome - wide searches*) za pronalazak kromosomskih regija povezanih s povećanim rizikom za razvoj bolesti. U slučaju AA utvrđeno je više mogućih gena kandidata.

5.3.2.1. Geni kandidati

Glavni kompleks gena tkivne podudarnosti (engl. *major histocompatibility complex*, MHC) naziva se u čovjeka humanim leukocitnim antigenima (engl. *human leukocyte antigen*, HLA) a u miša H-2 i sastoji se od tri skupine gena. Riječ je o regiji koja predstavlja suspektibilni lokus na kromosomu 6. Većina gena ovog lokusa kodira površinske proteine koji prezentiraju antigene. Humani leukocitni antigeni klase I (engl. *HLA-I*) subklasificiraju se kao A, B i C, a izraženi su na površini svih enukleiranih stanica i prezentiraju antigene CD8⁺ T limfocitima. Suprotno tome, klasa II humanih leukocitnih antigena (*HLA-II*), koji se subklasificiraju kao DP, DM, DOA, DOB, DQ i DR, normalno su izraženi na antigen prezentirajućim stanicama (engl. *antigen-presenting*

cells, APC) kao što su makrofazi ili Langerhansove stanice kože. Tijekom upale HLA-II ekspresivnost može se naći i na drugim stanicama koje, tvoreći kompleks s antigenom, prezentiraju antigen CD4⁺ T limfocitima. Ostatak gena kodira antigene klase III (*HLA-III*) koji predstavljaju komponente sustava komplementa u serumu, poput faktora komplementa, faktora nekroze tumora (engl. *tumor necrosis factor*, *TNF*) i proteina toplinskog šoka 70 (engl. *heat shock protein 70*, *Hsp70*).

Kao što je to slučaj i s drugim autoimunim bolestima, AA pokazuje povezanost s određenim HLA genima. Ovo se napose odnosi na povezanost s *HLA-DR* i *HLA-DQ*, čime se potvrđuje teza o uključenosti CD4⁺ T limfocita u patogenezu AA. Jedan je nalaz koji se neprestano ponavlja u studijama: *HLA-DQB1*03* prisutan je u preko 80% svih bolesnika, što ga čini generalno prihvaćenim suspektnim genom (McDonagh & Tatzl, 2002; Colombe et al., 1995; de Andrade et al., 1999). S druge strane pak, pojedine povezanosti HLA gena možda pružaju relativnu protekciju za obolijevanje od AA, kao što je predloženo za slučaj *HLA-DRw52a* i *HLA-DRB*03* (Duvic et al., 1991).

No osim gore navedene povezanosti s MHC genima pokazana je povezanost AA i s MHC klase I genom A povezanog s polipeptidom (engl. *MHC class I polypeptide-related sequence A*, *MICA* gene). Ovaj gen kodira polimorfni MHC klase I lančano vezani protein A čiji je ligand *NKG2D* - membranski protein NK stanica. Ovo otkriće ukazuje na ulogu NK stanica u patogenezi AA, a u prilog toj tezi govori i nalaz povišenog broja NK stanica u perifolikularnom infiltratu lezija AA (Ito et al., 2005).

Downow sindrom povezan je s povećanim rizikom nastanka AA, a ova je povezanost potkrijepljena i identifikacijom suspektnoga gena na kromosomu 21 (Tazi-Ahnini et al., 2002). Sindrom autoimune poliendokrinopatije, kandidoze i ekodermalne distrofije (engl. *autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy*, *APECED*), autosomno recesivni je sindrom kojeg čine mukokutana kandidoza zajedno s hipoparatiroidizmom ili Addisonovom bolesti. Ovaj sindrom povezan je sa multiplim autoimunim poremećajima uključujući hipogonadizam, pernicioznu anemiju, vitiligo i AA. Genetska osnova ovoga sindroma je mutacija na genu koji kodira autoimuni regulator (engl. *autoimmune regulator*, *AIRE* gene) smješten na kromosomu 21. Rizik za

obolijevanje od AA u bolesnika s *APECED* sindromom iznosi 30%, a povezuje se s ranim nastupom bolesti i teškom kliničkom slikom. No mutacije na *AIRE* genu nisu povezane s AA u općoj populaciji (Buzi et al., 2003).

Aleli gena koji kodiraju citokine, citokinske antagonist i njihove receptore također se povezuju s AA, a pri tome se nalaze polimorfizmi za *IL-1* receptorske antagonist i faktor inhibicije makrofaga (engl. macrophage inhibitory factor, *MIF*). Ovi polimorfizmi povezuju se s ranim nastupom i težom kliničkom slikom bolesti (Shimizu et al., 2005).

5.3.3. Neuroendokrino - imunološki čimbenici

Akutni ili kronični psihološki stres tradicionalno se smatra provocirajućim čimbenikom za nastanak ili pogoršanje AA. Pokazano je kako emocionalni stres također remeti homeostazu kože, na što najbolje ukazuju pogoršanja AA, ali i drugih kožnih bolesti, poput psorijaze ili atopijskog dermatitis, povezana sa stresom. Ovakvi oblici kožnog stresa regulirani su kožnim ekvivalentom osi hipotalamus – hipofiza – nadbubrežna žlijezda (engl. *hypothalamic–pituitary–adrenal axis*, *HPA axis*), koja predstavlja kožni obrambeni mehanizam, koji koordinira i upravlja lokalnim odgovorom na stresne čimbenike (Solminski et al., 2000). Hormon koji oslobađa kortikotropin (engl. *corticotropin-releasing hormone*, *CRH*) ključni je stresom iducirani hormon, a predstavlja proksimalni dio ove kožne osi i nađen je u ljudskim folikulima dlake, gdje mu ekspresija varira ovisno o fazi ciklusa. Lokaliziran je u bazalnom epidermisu, stanicama ORS, te u matriksu anagenih folikula. Najvišu ekspresiju pokazuje u vrijeme anagene, a najniže tijekom katagene i telogene faze ciklusa (Rollof et al., 1999).

Folikuli dlake, dakle, posjeduju potpuno funkcionalni periferni ekvivalent klasične HPA osi, a koja lokalno upravlja stresnim kožnim podražajima. Još uvijek nije u potpunosti jasno kako emocionalni stres utječe na ovu perifernu kožnu os. Provedena su brojna istraživanja na mišjim modelima, a pojedine studije ukazuju na povezanost između emocionalnog stresa i kožnih reakcija. Tako je u pokusu sa zvučnim stresom na CBA/J miševima, stresni čimbenik uzrokovao preranu katagenu fazu ciklusa. U ovome pokusu stres je inducirao stimulaciju faktora rasta živaca (engl. *nerve growth factor*, *NGF*) koji je

pak stimulirao sintezu neuropeptida P u dorzalnim korjenovima kralježničke moždine. Neuropeptid P se prenosi do kože putem perifernih živčanih vlakana, gdje izaziva mastocitima posredovanu perifolikularnu neurogenu upalu, posljedica koje je prerana indukcija katagene faze i inhibicija rasta dlake (Peters et al., 2006).

Mastociti su distribuirani oko folikula dlake i njihova se degranulacija povezuje s ciklusom rasta dlake. Degranulacija perifolikularnih mastocita se pojačava na kraju anagene i tik pred početak katagene faze. S druge strane, izostanak degranulacije koči progresiju ciklusa u katagenu fazu. Tvari koje uzrokuju njihovu degranulaciju jesu CRH i njime inducirane molekule - neuropeptid P, ali i novootkrivena molekula – faktor matičnih stanica (engl. *stem cell factor*, SCF) (Kumamoto et al., 2003). Time je stvorena povezanost između emocionalnog stresa i AA po sljedećem mehanizmu: u HF stres inducira proizvodnju CRH koji uzrokuje povećanje broja perifolikularnih mastocita i njihovo sazrijevanje. Zatim CRH uzrokuje pojačanu sintezu neuropeptida P i SCF, koji potom uzrokuju degranulaciju mastocita. Degranulacijom mastocita nastaje oslobađanje medijatora poput histamina koji induciraju preranu katagenu fazu ciklusa i inhibiciju rasta dlake. Na temelju navedenoga u pojedinim studijama ukazuje se na uspješnost primjene antihistaminika u terapiji AA (Inui et al., 2007; Ohya et al., 2010).

5.4. Uloga folikularnih matičnih stanica u patofiziologiji AA

U posljednjih nekoliko godina u središtu interesa brojnih istraživanja nalaze se folikularne matične stanice smještene u vanjskoj ovojnici korijena dlake te njihova uloga u etiopatogenezi alopecije areate.

5.4.1. Autoantitijela na folikularne strukture

Cirkulirajuća autoprotutijela na folikularne strukture pokazana su u više istraživanja AA, ali nije utvrđena njihova stvarna autoreaktivnost prema folikulima dlake. Protutijela za folikule dlake nađena su i na mišjim modelima. Ova cirkulirajuća IgG protutijela u bolesnika s AA reagiraju s multiplim komponentama anagenih dlačnih folikula, no zasad

nema dokaza da su ova cirkulirajuća protutijela uistinu patogena za folikule dlaka, kako u ljudi tako i na mišjim modelima. Nadalje, nije moguće prenijeti AA putem ubrizgavanja IgG protutijela bolesnika s AA na transplantate ljudskog vlasišta. Zaključno, do sada nije utvrđena patogena uloga ovih autoprotutijela u AA; ona su redovit nalaz i u humanim i mišjim modelima bolesti, ali se nalaze i u kontrolnim skupinama. Stoga se ona smatraju pokazateljem aktivnosti CD4⁺ T limfocita i njihovog prepoznavanja folikula dlake (Tobbin et al., 1997; Gilhar & Krueger, 1989).

5.4.1.1. Autoantitijela na melanocyte folikula dlake

Postavljena je teza kako su autoantitijela u AA orijentirana na melanocitne antigene. U prilog ovoj tezi govore istraživanja o zahvaćenosti pigmentiranih dlaka AA-om, dok one svijetle obično bivaju pošteđene. U remisiji bolesti, s ponovnim rastom dlaka, tendencija je da nove dlake budu nepigmentirane. Nadalje, melanociti su važna stanična komponenta dlačnog folikula, koji je mjesto nastanka AA. Osim toga AA se povezuje s primarnim poremećajem kožne pigmentacije, vitiligom, a melanociti u folikulima dlaka zahvaćenim AA-om pokazuju histološke i ultrastrukturne abnormalnosti (Paus et al., 1994; Shellow et al., 1992). Pronađena su i cirkulirajuća autoantitijela protiv proteina povezanog s melanocitima (engl. *melanocyte associated protein, MAP*) za kojeg se smatra kako predstavlja melanocitni autoantigen a protiv kojeg su usmjerena ova protutijela. Ova teza potvrđuje se i u pokusima u kojima su korišteni presatci ljudskih vlasišta na imunodeficientim (SCID) miševima, u kojima su MAP bili sposobni inducirati T stanice na pokretanje autoimunog procesa odnosno AA (Gilhar et al., 2001). U konačnici, aktivni proces melanogeneze zbiva se tijekom anagene faze ciklusa, kada folikul dlake predstavlja mjesto relativne imunoprivilegije, koje omogućuje "sakrivanje" melanocitnih antigena od autoreaktivnih T limfocita.

5.4.2. Imunološka privilegiranost folikula dlake

Mjesta imunološke privilegije u organizmu brojna su, a uključuju prednji očni segment, adrenalni korteks, dijelove testisa i ovarija, fetomaternalnu jedinicu placente te dijelove

središnjeg živčanog sustava iznad krvno-moždane barijere. Upravo je specijalizirani okoliš ovih mjesta nužan za prevenciju destruktivnih imunoloških reakcija na ovim mjestima. Radi se o mjestima koja utječu na temeljne funkcije čovjeka, pa tako primjerice, teška upala prednjeg očnog segmenta može dovesti do sljepoće. Iako dlake i kosa u ljudi mogu biti važne za psihičko zdravlje pojedinaca, dlake ne predstavljaju nužnost za ljudsko preživljavanje. No u drugih sisavaca, primjerice polarnih medvjeda, veliki gubitak dlaka potencijalno je smrtonosan.

Imunoprivilegija folikula dlake održavana je pomoću više čimbenika. To se u prvom redu odnosi na nedostatak izraženosti molekula MHC klase I na stanicama proksimalnog dijela vanjske ovojnice korijena dlake i stanica matriksa dlake. No za razliku od ostalih imunoprivilegiranih mjesta u organizmu, folikuli dlake podliježu cikličkim promjenama građe pa tako i relativnoj imunoprivilegiji. Naime, imunoprivilegija folikula dlake izražena je tijekom anagene faze ciklusa, no ne i u tijeku katagene i telogene faze. Tako je imunoprivilegija ograničena na proksimalni epitel anagenih folikula dlake. U tijeku anagene faze nastupa i proces melanogeneze. Pojedina istraživanja ukazala su na moguću ulogu melanocitnih autoantigena (MAP) kao ključnih ciljeva autoimune reakcije u AA (Gilhar et al., 2001), pa je za pretpostaviti kako se ova ciklička imunoprivilegija odvija upravo u anagenoj fazi ciklusa, kako bi se ovi autoantigeni skrili od potencijalnih autoreaktivnih T limfocita.

Osim oskudne ili potpuno odsutne ekspresije MHC klase I na površini folikularnih stanica, imunoprivilegija anagenih dlačnih folikula regulirana je znatno složenijim mehanizmima. Na mišjim modelima je utvrđeno kako su od početka rane anagene faze lokalne razine TNF-alfa uvelike smanjene, a razine antagonista za interleukin-1 receptore povišene (Paus i Stemm, 1991). Kako je anagena faza ujedno i faza aktivne melanogeneze, logično je za pretpostaviti kako je prisutnost snažnih imunosupresiva dodatni mehanizam kojim se nastoji smanjiti autoreaktivnost prema melanocitnim autoantigenima. Osim TNF-alfa, u održavanju privilegije sudjeluju i drugi potentni imunosupresivi. To su imunosupresivni hormoni poput adrenokortikotropnog hormona (engl. *adrenocorticotropic hormone*, ACTH) te hormon stimulacije melanocita alfa (engl. *alfa-melanocyte-stimulating hormone*, alfa-MSH). U ljudskoj koži ovi su potentni

imunosupresivi lokalizirani u anagenim folikulima dlake, a ne nalaze se u okolnom epidermisu i dermisu. Uz to ACTH potiče intrafolikularnu proizvodnju kortizola, kao dodatnog imunosupresivnog hormona. Jedan od najpotentnijih imunosupresivnih faktora rasta jest i faktor tumorskoga rasta beta (engl. *tumor growth factor beta*, TGF-beta). I on je snažno izražen na epitelu folikula u ljudi i u miševa, s najjačom ekspresijom tijekom kasne anagene i na početku katagene faze. Njegova funkcija vjerojatno je izuzimanje anagenih i/ili melanocitnih autoantigena od imunološkog djelovanja autoreaktivnih CD8⁺ T limfocita (Paus et al., 2003).

5.4.2.1. Uloga NK stanica u imunoprivilegiji folikula dlake

Stanice prirodne ubojice (engl. *natural killer cells*, NK) predmet su istraživanja u patogenezi AA. Odsutnost ili niska izraženost molekula MHC klase I u sustavu imunoprivilegije folikula dlake postavlja pitanje kako se održava proces autotolerancije folikula dlake. Naime, NK stanice zadužene su za prepoznavanje i eliminaciju onih stanica na čijoj površini nisu izražene molekule MHC klase I. Ipak, vrlo mali broj perifolikularnih NK stanica nalazi se u okolini zdravih folikula dlake. Zbog ovoga fenomena pretpostavljeno je kako u sklopu održavanja imunoprivilegije folikuli dlake inhibiraju normalne funkcije NK stanica.

Na površini NK stanica nalaze se inhibicijski receptori (engl. *killer-cell immunoglobulin-like receptor*, KIR) te heterodimerni *NKG2A* receptori. S druge strane, stanice koje ne izražavaju MHC I molekule na svojoj površini, poput virusom inficiranih ili tumorom transformiranih stanica, ne blokiraju aktivnost NK stanica i one bivaju aktivirane putem signala koje dobivaju u kontaktu takvih stanica s njihovim aktivirajućim receptorima – *NKG2D*. Ovi receptori se nalaze na NK i CD8⁺ T stanicama, a prepoznaju *MICA* gen na takvim stanicama što dovodi do izravnog napada NK i CD8⁺ T stanica (Bauer et al., 1999).

Humani anageni folikuli dlake ne pokazuju izraženost *MICA*-e. U lezijama AA, međutim, NK kao i CD8⁺ T stanice pokazuju visoki stupanj ekspresije aktivirajućeg receptora *NKG2D*. Ovo ukazuje na mogućnost da je progresija AA ubrzana za sada nepoznatim

čimbenikom koji inducira ekspresiju *MICA*-e na stanicama folikula, olakšavajući time djelovanje *NKG2D* pozitivnih stanica (NK i CD8+ T) na anagene folikule dlake. Dodatno, NK i CD8+ T stanice, izolirane iz periferne krvi bolesnika s AA, također pokazuju povišene razine izraženosti *NKG2D* receptora u odnosu na zdrave kontrole. U istih bolesnika zabilježene su i NK stanice u kojih pak inhibitorni receptori poput *KIR*-a nisu izraženi (Ito et al., 2008).

Zaključno, imunoprivilegirani anageni folikuli dlake zaštićeni su od napada NK stanica putem *MICA* - negativne vanjske ovojnice korijena dlake, niskom ekspresijom aktivirajućih *NKG2D* receptora na površini NK stanica, ekspresijom inhibicijskih receptora te općenito njihovim malenim perifolikularnim brojem. Kolaps bilo kojega od ovih zaštitnih mehanizama može inducirati razvoj AA.

5.4.2.2. Niša folikularnih matičnih stanica i imunološka privilegiranost

Niša folikularnih matičnih stanica predstavlja izbočinu ORS-a koja ne podliježe cikličkim promjenama razvoja i degeneracije. I ona predstavlja mjesto relativne imunološke privilegiranosti. Kao i anageni folikuli dlake, niša matičnih stanica održava imunološku privilegiranost putem složenih mehanizama, u prvom redu supresijom izraženosti MHC klase I i stimulacijom potentnih imunosupresiva poput alfa-MSH, TGF-beta i MIF. Osim toga, specifični biljeg ljudskih folikularnih matičnih stanica jest CD200. Upravo je njegova pretpostavljena funkcija ujedno i održavanje imunološke privilegije. Svrha održavanja imunološke privilegije niše matičnih stanica svakako je zaštita i održavanje rezervoara matičnih stanica od autoagresivnog imunološkoga napada. U lezijama AA i u području niše matičnih stanica uočena je pojačana izraženost MHC klase I, a smanjene su razine lokalnih potentnih imunosupresiva (Meyer et al., 2009). Iako za sada, nije u potpunosti razjašnjeno jesu li ožiljkaste alopecije uzrokovane autoimunom reakcijom usmjerenom protiv autoantigena podrijetlom iz niše matičnih stanica, njihov nestanak svakako vodi do trajnog gubitka vlasi i dlaka.

5.4.3. Teorija kolapsa imunološke privilegiranosti folikula dlake

Iako je Billingham još sedamdesetih godina prošloga stoljeća tvrdio kako su anageni folikuli dlake zapravo mjesta relativne imunološke privilegiranosti, tek se 1994. Godine ova spoznaja primijenila na patogenezu AA. Tada je predloženo kako AA nastaje kao rezultat kolapsa imunoprivilegije dlačnih folikula i posljedičnog CD8⁺ T limfocitnog odgovora na otkrivene autoantigene. Ova teorija podrazumijeva pojavu AA u onih imunogenetski predisponiranih pojedinaca u kojima se odvijaju četiri ključna procesa: (I) kolaps imunoprivilegije anagenih folikula uz pojačanu izraženost MHC klase I molekula na njihovoj površini, induciranu interferonom gama (IFN-gama); (II) ulazak folikula u anagenu fazu ciklusa u kojoj se odvija aktivna melanogeneza; (III) prepoznavanje autoantigena od strane CD8⁺ T limfocita prezentiranih putem MHC klase I molekula na takvim folikulima; te (IV) prisutnost kostimulirajućih signala, napose onih od pomoćničkih CD4⁺ T limfocita, a koji omogućuju učinkovit napad citotoksičnih CD8⁺ T limfocita na anageni folikularni epitel (Paus et al., 2005).

Ova teorija kasnije je nadopunjena ulogom lokalno generiranih potentnih imunosupresiva (alfa-MSH, TGF-beta, TNF-alfa) kao i NK stanica, koji u normalnim uvjetima funkcioniraju kao čuvari imunoprivilegije dlačnih folikula. Njihova nedovoljna aktivnost i funkcija smatra se čimbenikom rizika za nastanak AA, a popravak imunoprivilegije folikula putem ovih stanica smatra se uzrokom spontanih remisija i ponovnoga rasta dlake i vlasi (Paus et al., 2005).

Kako bi dokazali ovu teoriju, Gilher je sa suradnicima proveo seriju pokusa koristeći transplantate ljudskih vlasišta zahvaćenih AA-om na imunodeficijentnim miševima (SCID). Nakon transplantacije, na vlasištima je zamijećen rast kose. Četrdesetog dana nakon transplantacije, graftovima su injicirane aktivirane T stanice podrijetla iz AA lezija. Injicirane su CD4⁺ i CD8⁺ T stanice, odvojeno i u kombinaciji, kako bi se ustvrdila točna uloga ovih stanica u patogenezi AA. Rezultati su pokazali kao injiciranje samo CD4⁺ ili CD8⁺ T aktiviranih stanica ne dovodi do značajnijeg gubitka kose, no injicirane zajedno dovode do gubitka dlaka tipičnog za AA. Ovi rezultati ukazali su kako su za patogenezu AA odgovorne obje populacije stanica, pri čemu ključnu ulogu imaju CD8⁺ T limfociti

kao efektorske stanice uz regulatornu funkciju CD4+ T limfocita kao pomoćničkih stanica. Precizni autoantigeni međutim za sada ostaju neidentificirani, iako je postavljena sumnja kako je riječ o melanocitim vezanim proteinima (MAP) kao mjestima napada. Ovi rezultati u skladu su s teorijom kolapsa imunološke privilegiranosti dlačnog folikula (Gilhar et al., 2006; Paus et al., 2005).

6. ZAKLJUČAK

S obzirom da se trajno obnavlja tijekom života, koža odrasle osobe ima sposobnost regeneracije, a dlačni folikuli pak neprekidno prolaze kroz cikluse rasta i degeneracije. Istraživanje matičnih stanica kože područje je u kojemu je u zadnje vrijeme došlo do značajnoga napretka kako u bazičnim, tako i u kliničkim istraživanjima. Napretci u bazičnim istraživanjima omogućili su istraživanja epidermalnih matičnih stanica *in vivo*, prepoznavanje nezavisnih interfolikularnih matičnih stanica, bolju analizu pojedinih dioba matičnih stanica, kao i nedavno uspjelu regeneraciju dlačnoga folikula putem transplantacije bioinženjeringom stvorene dlačne jedinice u miševa. Napredak u kliničkim istraživanjima uključuje prepoznavanje važnosti epidermalnih matičnih stanica u cijeljenju rane te moguću primjenu matičnih stanica u terapiji nasljednih bolesti kože kao što je nasljedna bulozna epidermoliza. Istraživanja folikularnih matičnih stanica započeta su identifikacijom matičnih stanica kao LRC u izbočini ORS-a. Daljnji napredak u znanstvenim spoznajama uslijedio je nakon prepoznavanja specifičnih molekularnih biljega stanica izbočine ORS-a, kao što su keratin 15 (K15) i CD34 u miševa te CD200 u ljudi, jer su oni omogućili izolaciju folikularnih matičnih stanica i utvrđivanje njihovih značajki.

Folikul dlake predstavlja jedinstveni dinamički “mini-organ” koji utječe na kožne reakcije putem imunološkog i hormonskog sustava. Najzanimljivija je značajka folikula dlaka upravo imunološkim sustavom posredovana relativna imunološka privilegiranost. Ona se održava složenim mehanizmima koji uključuju supresiju izraženosti molekula MHC klase I na površini folikularnih struktura te sintezu i održavanje lokalne razine potentnih imunosupresiva poput alfa-MSH, TGF-beta i drugih. Također je utvrđena povezanost imunoprivilegije folikula dlake s neuroendokrinim sustavom. Najnovija otkrića na ovome polju ukazuju na postojanje potpuno funkcionalne kožne periferne neurohormonalne osi koja predstavlja ekvivalent klasičnoj HPA osi. Stresni čimbenici okoline, a tako i emocionalni stres, mogu utjecati na lokalne imunološke i hormonalne sustave folikula dlake i rezultirati pojavom autoimunih kožnih bolesti, primjerice AA. Stoga se pretpostavlja da bi se farmakoterapijski mogla ponovno uspostaviti imunoprivilegiranost zahvaćenih dlačnih folikula te na taj način zaustaviti progresija bolesti i stimulirati porast

novih vlasi i/ili dlaka na alopecičnim žarištima. Kao dodatni terapijski cilj spominje se modifikacija kožnog stresnog hormonalnog sustava.

Alopecija areata može poslužiti kao model za istraživanje autoimunosti u ljudi općenito, jer istraživanja provedena na ovome polju ukazuju na uloge imunoprivilegije, imunogenetike kao i neuroendokrinih čimbenika, kako u inicijaciji tako i propagaciji autoimunih bolesti. Stoga će sistematizacija i šira znanstvena eksploatacija ovoga autoimunosnog modela pridonijeti daljnjem razumijevanju patogeneze AA i razvoja novih strategija za uspješno liječenje iste te će zasigurno pridonijeti i boljem razumijevanju autoimunih procesa u ljudi općenito.

7. ZAHVALE

Zahvaljujem svojoj mentorici docentici dr. sc. Zrinki Bukvić Mokos na velikoj pomoći i razumijevanju prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem posebno svojoj majci i bližoj rodbini, na bezgraničnom strpljenju, potpori i optimizmu tijekom cjelokupnog školovanja.

I na kraju, zahvaljujem i svojim dragim prijateljima što me motiviraju svakog dana i čine moj život ispunjenim.

8. POPIS LITERATURE

Alonso L, Fuchs E. (2003) Stem cells in the skin: waste not, Wnt not. *Genes Dev* 17: 1189-1200.

Asakawa K, Toyoshima KE, Ishibashi N, Tobe N, Kanayama T, Hasegawa T, Nakao K, Toki, H, Ogawa M, Sato A, Tsuji T. (2012) *Sci Rep* 2: 424.

Barrandon Y, Green H. (1987) Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc Natl Acad Sci* 84: 2302- 6.

Bickenbach JR. (1981) Identification and behavior of label-retaining cells in oral mucosa and skin. *J Dent Res* 60: 1611-20.

Blanpain C, Fuchs E. (2006) Epidermal stem cells of the skin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:339-373.

Candi E, Schmidt R, Melino G. (2005) The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:328-40.

Costarelis G, Sun T.T, Lavker R.M. (1990) Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell* 61:1329-1337.

Dudda-Subramanya R, Alexis AF, Siu K, Sinha AA. (2007) Alopecia areata: genetic complexity underlies clinical heterogeneity. *Eur J Dermatol* 17(5):367-74.

Duvic M, Hordinsky M.K, Fiedler V.C, O'Brien W.R, Young R, Reveille J.D. (1991) HLA-D locus associations in alopecia areata. *Arch Dermatol* 127:64-68.

Ferrari S, Pellegrini G, Matsui T, Mavilio F, De Luca M. (2006) Gene therapy in combination with tissue engineering to treat epidermolysis bullosa. *Expert Opin Biol Ther* 6:367-378.

Gallico G.G, O'Connor N.E, Compton C.C, Kehinde O, Green H. (1984) Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *N Engl J Med* 311:448-451.

Gilhar A, Landau M, Assay B, Shalaginov R, Serafimovich S, Kalish R.S (2001) Melanocyte associated T-cell epitopes can function as autoantigens for transfer of alopecia areata to human scalp explants on Prkdcscid mice. *J Invest Dermatol* 117:1357-1362.

Gilhar A, Landau M, Assay B, Shalaginov R, Serafimovich S, Kalish R.S (2002) Alopecia areata is mediated by cooperation between CD4+ and CD8+ T-lymphocytes: transfer to human scalp explants on Prkdcscid mice. *Arch Dermatol* 138:916-922.

Gilhar A, Kreuger G.G (1989) Hair growth in scalp grafts from patients with alopecia areata and alopecia universalis grafted onto nude mice. *Arch Dermatol* 123:44-50.

Gilhar A, Kalish R.S (2006) Alopecia areata: a tissue specific autoimmune disease of the hair follicle. *Autoimmun Rev* 26:32-40.

Green H, Kehinde O, Thomas J. (1979) Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc Natl Acad Sci* 76:5665-5668.

Ito T, Saathoff M, Nickoloff B.J, Takigawa M, Paus R. (2005) Novel aspects of hair follicle immune privilege and their relevance to alopecia areata. *J Invest Dermatol* 124(Suppl.):A103.

Ito M, Yang Z, Andl T, Cui C, Kin N, Millar S.E, Costarelis G. (2007) Wnt-dependent de novo hair follicle regeneration in adult mouse skin after wounding. *Nature* 447:316-320.

Ito T, Saathoff M, Hashizume H, Fukamizu H, Nickoloff B.J. (2008) Maintenance of hair follicle immune privilege is linked to prevention of NK cell attack. *J Invest Dermatol* 128:1196-1206.

Jahoda C, Horne K, Oliver R. (1984) Induction of hair growth by implantation of cultured dermal papilla cells. *Nature* 311:560-562.

Jaks V, Barker N, Kasper M, Van es J.H, Snippert H.J, Clevers H, Toftgard R. (2008) *Nat Genet* 40:1291.

Kishimoto J, Ehama R, Wu L, Jiang S, Jiang N, Burgeson R.E. (1999) *Proc Natl Acad Sci* 96:7336.

Kligman AM. (1959) The human hair cycle. *J Invest Dermatol* 33:307-316.

Kobayashi K, Rocht A, Barrandon Y. (1993) Segregation of keratinocyte colony-forming cells in the bulge of the rat vibrissa. *Proc Natl Acad Sci* 90:7391-7395.

Kumamoto T, Shalhevet D, Matuze H, Mummert ME, Ward BR, Jester J.V. (2003) Hair follicles serves as local reservoirs of skin mast cell precursors. *Blood* 102:1654-1660.

Lander ES, Schork NJ. (2001) Genetic dissection of complex traits. *Science* 265:2037-48.

Lavker RM, Sun TT. (1982) Heterogeneity in epidermal basal keratinocytes: morphological and functional correlations. *Science* 215:1239-41.

Lecler T, Fuchs E. (2005) Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. *Nature* 437:275-80.

Levy V, Lindon C, Harfe BD, Morgan BA. (2007) Epidermal stem cells arise from the hair follicle after wounding. *FASEB J* 21:1358-1366.

Lichti U, Andreas J, Yuspa SH. (2008) Isolation and short-term culture of primary keratinocytes, hair follicle populations and dermal cells from newborn mice and keratinocytes from adult mice for in vitro analysis and for grafting to immunodeficient mice. *Nat Protoc* 3(5):799-810.

MacKenzie IC. (1970) Relationship between mitosis and the ordered structure of the stratum corneum in mouse epidermis. *Nature* 226:653-55.

Madan S, Shapiro J. (2000) Alopecia areata update. *J Invest Dermatol* 96:68S.

Mavilio F, Pellegrini G, Ferrari S, Di Nunzio F, Di Lorio E, Recchia A, Ferrari G, Provasi E, Bonini C. (2006) Correction of junctional epidermolysis bullosa by transplantation of genetically modified epidermal stem cells. *Nat Med* 12:1397-1402.

McDonagh AJ, Messenger AG. (1996) The pathogenesis of alopecia areata. *Dermatol Clin* 14:661-670.

McDonagh A.J, Tazi-Ahnini R. (2002) Epidemiology and genetics of alopecia areata. *Clin Exp Dermatol* 27:405-409.

Meyer KC, Bodo E, Brzoska T, Abels C, Paus R. (2009) Immunomodulatory effects of the alpha-melanocyte-stimulating hormone on human scalp hair follicles under proinflammatory conditions. *Br J Dermatol* 161:1400-1403.

Nowak JA, Polak L, Pasolli HA, Fuchs E. (2008) Hair follicle stem cells are specified and function in early skin morphogenesis. *Cell Stem Cell* 3:33-43.

O'Connor NE, Mulliken JB, Banks-Schlegel S, Kehinde O, Green H. (1981) Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells. *Lancet* 1:75-78.

Oshima H, Rochat A, Kedzia C, Kobayashi K, Barrandon Y. (2001) Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. *Cell* 104:233-245.

Ohyama M, Shimizu A, Tanaka K, Amagai M. (2010) Experimental evaluation of ebastine, a second generation anti-histamine, as a supportive medication for alopecia areata. *J Dermatol Sci* 58:154-157.

Paus R, Slominski A, Czarnecki B.M. (1994) Is alopecia areata an autoimmune-response against melanogenesis-related proteins, exposed by abnormal MHC class I expression in the anagen hair bulb? *Yale J Biol Med* 66:541-554.

Paus R, Muller-Rover S, Van Der Veen C, Maurer M, Eichmuller S. (1999) A comprehensive guide for the recognition and classification of distinct stages of hair follicle morphogenesis. *J Invest Dermatol* 113:523-532.

Paus R, Nickoloff B.J, Ito T. (2005) A "hairy" privilege. *Trends Immunol* 26:32-40.

Pellegrini G, Ranno R, Stracuzzi G, Bondaza S, Guerra L, Zambruno G, Micali G, De Luca M. (1999) The control of epidermal stem cells (holoclones) in the treatment of massive full-thickness burns with autologous keratinocytes cultured on fibrin. *Transplantation* 68:868-879.

Peters EM, Arck PC, Paus R. (2006) Hair growth inhibition by psychoemotional stress: a mouse model for neural mechanisms in hair growth control. *Exp Dermatol* 15:1-13.

Pispa J, Thesleff I. (2003) Mechanisms of ectodermal organogenesis. *Dev Biol* 262:195-205.

Plinck EP, Peereboom-Wynia JD, Vuzevski VD, Westerhof W, Stolz E. (1993) Turning white overnight, is it possible? *Ned Tijdschr Geneesk* 137:1207-1210.

Potten CS.(1981) Cell replacement in epidermis via discrete units of proliferation. *Int Rev Cytol* 69:271-318.

Rheinwald JG, Green H. (1975) Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6:331-343.

Rochat A, Kobayashi K, Barrandon Y. (1994) Location of stem cells of human hair follicles by clonal analysis. *Cell* 76:1063-1073.

Roloff B, Fechner K, Slominski A, Furkert J, Bulfone-Paus S. (1998) Hair cycle dependent expression of corticotrophin releasing factor (CRF) and CRF receptors in murine skin. *FASEB J* 12:287-297.

Roselino AM, Almeida AM, Hippolito MA, Maffei CM, Menezes JB, Vieira RE, Ali SA. (1996) Clinical – epidermiologic study of alopecia areata. *Int J Dermatol* 35:181-184.

Safavi KH, Muller SA, Suman VJ, Moshell AN, Melton LJ. (1995) Incidence of alopecia areata in Olmsted County, Minnesota, 1975 through 1989. *Mayo Clin Proc* 70:628-633.

Scerri L, Pace JL. (1992) Identical twins with identical alopecia areata. *J Am Acad Dermatol* 27:766-767.

Shellow WV, Edwards JE, Koo JY. (1992) Profile of alopecia areata: A questionnaire analysis of patient and family. *Int J Dermatol* 31:186-189.

Sladden MJ, MacDonald Hull SP, Wood ML, Hutchinson PE, Messenger AG. (2005) Alopecia areata: the need for guidelines and evidence based dermatology. *Br J Dermatol* 152:1086-1087.

Taylor G, Lehrer MS, Jensen PJ, Sun TT. (2000) Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell* 102:451-461.

Trempeus CS, Morris RJ, Bortner CD, Costarelis G, Reece JM, Tennant RW. (2003) Enrichment for living murine keratinocytes from the hair follicle bulge with the cell surface marker CD34. *J Invest Dermatol* 120:501-511.

Tobin DJ, Fenton DA, Kendall MD. (1990) Ultrastructural observations on the hair bulb melanocytes and melanosomes in acute alopecia areata. *J Invest Dermatol* 94:803-807.

Tobin DJ, Hann SK, Song MS, Bystryn JC. (1997) Hair follicle structures targeted by antibodies in patients with alopecia areata. *Arch Dermatol* 133:57-61.

Tosti A, Bellavista S, Iorizzo M. (2006) Alopecia areata: a long term follow-up study of 191 patients. *J Am Acad Dermatol* 55:438-441.

Toyoshima KE, Asakawa K, Ishibashi N, Toki H, Ogawa M, Irie T, Sato A, Takeda A, Tsuji T. (2012) *Nat Commun* 3:784.

Whisting DA. (2003) Histopathologic features of alopecia areata: a new look. *Arch Dermatol* 139:1555-1559.

9. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 29. siječnja 1990. godine u Zagrebu. Osnovnu i srednju školu završio sam u Zaprešiću. Pohađao sam opći gimnazijski smjer Srednje škole Ban Josip Jelačić. Nakon završene srednje škole upisao sam Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Govorim tečno engleski i početno njemački jezik.