

# Određivanje genotipskih i fenotipskih biomarkera kožne barijere u bolesnika s atopijskim dermatitisom

---

Jurakić Tončić, Ružica

Doctoral thesis / Disertacija

2020

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:875771>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-07**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Ružica Jurakić Tončić**

**Određivanje genotipskih i fenotipskih  
biomarkera kožne barijere u bolesnika  
s atopijskim dermatitisom**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2020.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Ružica Jurakić Tončić**

**Određivanje genotipskih i fenotipskih  
biomarkera kožne barijere u bolesnika  
s atopijskim dermatitisom**

**DISERTACIJA**

Zagreb, 2020.

Disertacija je izrađena u Klinici za dermatovenerologiju i Kliničkom zavodu za kliničku i molekularnu mikrobiologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Coronel Institutu Akademskog medicinskog centra Amsterdam i na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Voditeljice rada: prof. dr. sc. Branka Marinović i dr. sc. Sanja Kežić

*Zahvaljujem mojim mentoricama, prof. dr. sc. Branki Marinović i dr. sc. Sanji Kežić, koje su me svojim znanjem, strpljenjem i trudom usmjeravale u izradi ovog rada. Profesorici Marinović od srca zahvaljujem na velikoj podršci od samog početka planiranja ovog rada i što je uvijek bila tu kad sam je trebala. Doktorici Kežić zahvaljujem što mi je osim iznimnog znanja i stručnosti pružila mogućnost studijskih boravaka u Amsterdamu, te se uvijek potrudila da se daleko od Zagreba osjećam kao u drugom domu. Posebno joj zahvaljujem što je s iznimnim strpljenjem odgovarala na moja pitanja i nedoumice. Velika hvala i profesorici Ljubojević koja me podupirala tijekom skupljanja ispitanika u Alergološkoj ambulanti Klinike za dermatovenerologiju te profesorici Jakaša koja me je strpljivo usmjeravala u traženju rješenja za tehničke probleme i znanstvene nedoumice. Veliku zahvalu također upućujem svim prekrasnim ljudima, kolegama s mikrobiologije kao i mlađim kolegama iz Klinike za dermatovenerologiju bez kojih ovaj rad ne bi bilo moguće ostvariti. Na kraju bih zahvalila svojim najbližima, svojoj obitelji, bez čije podrške ništa ne bi bilo moguće i bez kojih ništa na svijetu ne bi bilo važno.*

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. EPIDEMIOLOGIJA BOLESTI.....	1
1.2. POJAM ATOPIJSKOG MARŠA.....	2
1.3. ULOGA EPIDERMALNE BARIJERE .....	2
1.4. STRUKTURA EPIDERMALNE BARIJERE.....	3
1.5. ULOGA OŠTEĆENE BARIJERE U ETIOPATOGENEZI BOLESTI.....	4
1.6. FILAGRIN I NJEGOVA CENTRALNA ULOGA .....	4
1.7. MUTACIJA FILAGRINSKOG GENA.....	6
1.8. FILAGRIN I PRIRODNI OVLAŽIVAČI .....	7
1.9. UČINAK FILAGRINA NA pH, KISELI OMOTAČ I ANTIMIKROBNO DJELOVANJE.....	8
1.10. MODULACIJA AKTIVNOSTI SERINSKIH PROTEAZA.....	8
1.11. ULOGA LIPIDA U EPIDERMALNOJ BARIJERI .....	9
1.12. LIPIDNA ORGANIZACIJA ZDRAVE KOŽE .....	10
1.13. PROMJENE U LIPIDIMA KOD BOLESNIKA S ATOPIJSKIM DERMATITISOM .....	10
1.14. IMUNOLOGIJA ATOPIJSKOG DERMATITISA .....	11
1.15. ULOGA KOŽNOG MIKROBIOMA I <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> .....	15
1.16. UTJECAJ OKOLIŠA.....	16
1.17. SVRBEŽ I NJEGOVA ULOGA U PODRŽAVANJU BOLESTI .....	17
1.18. UDRUŽENOST S DRUGIM BOLESTIMA.....	18
1.19. POSTAVLJANJE DIJAGNOZE.....	19
1.20. KLINIČKI FENOTIPOVI .....	20
1.21. ENDOTIPOVI BOLESTI I VAŽNOST BIOMARKERA U STRATIFIKACIJI BOLESTI .....	23
<b>2. HIPOTEZA</b> .....	<b>26</b>
<b>3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b> .....	<b>27</b>
<b>4. ISPITANICI I METODE</b> .....	<b>28</b>
4.1. ISPITANICI.....	28
4.2. ETIČKA NAČELA.....	28

4.3.	KLINIČKA PROCJENA BOLESNIKA.....	29
4.4.	LABORATORIJSKA I DIJAGNOSTIČKA OBRADA BOLESNIKA.....	30
4.5.	KVANTITATIVNA KULTURA <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> IZ BRISEVA KOŽE .....	30
4.6.	MJERENJA TRANSEPIDERMALNOG GUBITKA VODE (TEWL) i pH .....	31
4.7.	<i>FLG</i> GENOTIPIZACIJA.....	31
4.8.	UZORKOVANJE KOŽE .....	32
4.9.	ODREĐIVANJE KOMPONENATA PRIRODNOG OVLAŽIVAČA KOŽE .....	32
4.10.	ODREĐIVANJE RAZINE CITOKINA .....	33
4.11.	ODREĐIVANJE CERAMIDA.....	34
4.12.	STATISTIČKA ANALIZA.....	35
<b>5.</b>	<b>REZULTATI .....</b>	<b>36</b>
5.1.	KLINIČKA I DEMOGRAFSKA OBILJEŽJA POPULACIJE .....	36
5.2.	FUNKCIJA KOŽNE BARIJERE .....	39
5.3.	UČESTALOST MUTACIJA FILAGRINSKOG GENA .....	41
5.4.	BIOMARKERI U STRATUM CORNEUMU .....	42
	5.4.1. Degradacijski produkti filagrina (NMF) .....	42
	5.4.2. Lipidi .....	43
5.5.	BIOMARKERI IMUNOLOŠKOG ODGOVORA .....	48
<b>6.</b>	<b>RASPRAVA.....</b>	<b>58</b>
<b>7.</b>	<b>ZAKLJUČCI.....</b>	<b>70</b>
<b>8.</b>	<b>KRATKI SADRŽAJ NA HRVATSKOM JEZIKU .....</b>	<b>72</b>
<b>9.</b>	<b>KRATKI SADRŽAJ NA ENGLESKOM JEZIKU .....</b>	<b>73</b>
<b>10.</b>	<b>POPIS LITERATURE.....</b>	<b>74</b>
<b>11.</b>	<b>ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>95</b>

## POPIS KRATICA

A	$\alpha$ -hidroksi masna kiselina
AA	alergijska astma
AC	alergijski konjunktivitis (engl. <i>allergic conjunctivitis</i> )
AD	atopijski dermatitis
AD <sub>L</sub>	klinički zahvaćena koža atopijskog dermatitisa (engl. <i>lesional skin in atopic dermatitis</i> )
AD <sub>NL</sub>	klinički nezahvaćena koža atopijskog dermatitisa ( engl. <i>nonlesional skin in atopic dermatitis</i> )
ADHD	poremećaj pozornosti s hiperaktivnošću (engl. <i>attention-deficit hyperactivity disorder</i> )
AMP	antimikrobni peptidi
AR	alergijski rinitis
CCL	kemokin ligand (engl. <i>chemokine ligand</i> )
CCR	kemokinski receptor (engl. <i>chemokine receptor</i> )
CER	ceramidi
CHOL	kolesterol (engl. <i>cholesterol</i> )
CLA+	kožno limfocitno udružen antigen (engl. <i>cutaneous lymphocyte associated-antigen</i> )
CNV	varijacija broja kopija (engl. <i>copy number variation</i> )
Ctrl	kontrola (engl. <i>control</i> )
CXCL	kemokin ligand (engl. <i>chemokine (C-X-C motif) ligand</i> )
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
dS	dihidrosfingozin, sfinganin
eAD	ekstrinzički oblik atopijskog dermatitisa
EASI	indeks proširenosti i težine ekcema (engl. <i>eczema area and severity index score</i> )
ELOVL	elongaza
EO	$\varphi$ -hidroksi masna kiselina
FFA	slobodna masna kiselina (engl. <i>free fatty acid</i> )
FLG	filagrin (engl. <i>filaggrin</i> )
FLG	gen za filagrin

GBA	glukozil-ceramidna- $\beta$ -glukozidaza
iAD	intrinzički oblik atopijskog dermatitisa
IFN	interferon
IL	interleukin
ILC	urođene limfoidne stanice (engl. <i>innate lymphoid cells</i> )
KC	keratinocit
LB	lamelarna tjelešca (engl. <i>lamellar bodies</i> )
LEKTI	serinski imfoepitelijalni proteazni inhibitor Kazal tipa (engl. <i>lymphoepithelial Kazal type inhibitor</i> )
LOF <i>FLG</i>	nul-mutacija gena za filagrin (engl. <i>loss-of-function mutation of filaggrin gene</i> )
LPP	duga periodična faza (engl. <i>long periodicity phase</i> )
MALDI-TOF	bakterijska identifikacija spektrometrijom masa (engl. MALDI-matrix assisted laser desorption/ionisation, TOF- Time of flight mass spectrometry)
N	masne kiseline bez hidroksilne skupine
NMF	prirodni faktor ovlaživanja (engl. <i>natural moisturising factor</i> )
OH	hidroksina skupina
P	fitosfingozin
PCR	polimerazna lančana reakcija (engl. <i>polymerase chain reaction</i> )
ProFLG	profilagrinska molekula
$R^2$	koeficijent determinacije
RNK	ribonukleinska kiselina
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
SB	<i>stratum basale</i> - bazalni sloj epidermisa
S	sfingozin
SC	<i>stratum corneum</i> - rožnati sloj epidermisa
SCORAD	<i>severity scoring of atopic dermatitis</i>
SEM	standardna pogreška aritmetričke sredine (engl. <i>standard error of the mean</i> )
SG	<i>stratum granulosum</i> - zrnati sloj epidermisa
SP	serinska proteaza



SPI	serinski proteazni inhibitor (engl. <i>serin protease inhibitor</i> )
SPINK5	serinski proteazni inhibitor Kazal-tipa 5 (engl. <i>serin protease inhibitor Kazal type 5</i> )
SPP	kratka periodična faza (engl. <i>short periodicity phase</i> )
SS	<i>stratum spinosum</i> - nazubljeni sloj epidermisa
TEWL	transepidermalni gubitak vode (engl. <i>transepidermal water loss</i> )
Th	T pomoćnička stanica (engl. <i>T-helper cell</i> )
TJ	uski spojevi (engl. <i>tight junctions</i> )
TLR	<i>toll-like</i> receptor
TNF- $\alpha$	čimbenik tumorske nekroze $\alpha$ (engl. <i>tumor necrosis factor-<math>\alpha</math></i> )
<i>trans</i> -UCA	<i>trans</i> -urokanična kiselina
TSLP	timični stromalni limfopoetin (engl. <i>thymic stromal lymphopoietin</i> )
UV	ultraljubičasto (engl. <i>ultraviolet</i> )
UK	United Kingdom - Ujedinjeno Kraljevstvo

# 1. UVOD

Atopijski dermatitis (AD) je kronična upalna bolest kože karakterizirana složenom patofiziologijom i raznolikošću kliničkog fenotipa. Bolest karakteriziraju ponavljajući ekcemi, izraženi svrbež i značajno snižena kvaliteta života. Usprkos izraženoj raznolikosti kliničke slike, još uvijek se smatra jedinstvenim poremećajem i u bolesnika se primjenjuje općeniti terapijski pristup (1, 2). Razumijevanje etiopatogeneze AD-a je značajno napredovalo posljednjih godina (3, 4). Danas se u eri personalizirane medicine nameće potreba za što preciznijom definicijom bolesti. Pojedine fenotipove možemo bolje okarakterizirati određivanjem biomarkera, odnosno određivanjem endotipova (1). Jasna definicija fenotipova i potencijalnih biomarkera koji mogu karakterizirati fenotipove predstavlja ključni preduvjet za razvitak ciljanih terapijskih opcija i primjenu terapije prilagođene individualnim karakteristikama bolesnika (1).

## 1.1. EPIDEMIOLOGIJA BOLESTI

AD kao najučestalija upalna bolest kože današnjice predstavlja veliko socioekonomsko opterećenje, ponajprije zbog nedostatka dugoročno djelotvorne terapije, kao i sve češćeg prisustva bolesti i u odrasloj dobi (2, 5, 6). Opažen je trend rasta prevalencije AD-a. Prema današnjim saznanjima AD zahvaća 20 % opće populacije razvijenih zemalja (7). AD je bolest koja se najčešće javlja u dječjoj dobi. Prevalencija u dječjoj dobi iznosi 15-25 %. Smatra se da 70 % bolesnika izgubi simptome tijekom kasnog djetinjstva, međutim oko 10-30 % bolesnika kod kojih je bolest započela u djetinjstvu ne gubi simptome, već se bolest nastavlja u odraslu dob (8-10). Ne postoje epidemiološke studije o učestalosti AD-a u Republici Hrvatskoj. Postojeći podaci s kojima raspolažemo se odnose na studije pedijatrijske populacije, podaci su dostupni samo za grad Zagreb, sjeverozapadnu Hrvatsku i Primorsko-goransku županiju. Podaci u tim

studijama se odnose većinom na alergijsku astmu (AA) i alergijski rinitis (AR), dok je AD samo razmatran u sklopu drugih atopijskih bolesti, ali ne kao zasebna bolest (11-13). Procijenjena 12-mjesečna prevalencija za AA iznosi 9,7-8,4 %, AR 16,9-17,5 a za AD 5,6-6,7 % za mlađu dob i 5,4-3,4 % za stariju pedijatrijsku populaciju. Prema postojećim podacima Republika Hrvatska je uvrštena u zemlje s umjerenom prevalencijom atopijskih bolesti u pedijatrijskoj populaciji (10, 11).

## **1.2. POJAM ATOPIJSKOG MARŠA**

AD tipično prethodi pojavi drugih atopijskih bolesti, a ovaj slijed atopijskih bolesti se opisuje terminom "atopijski marš". Atopijski marš započinje najčešće s AD-om u dojenačkoj dobi, kasnije se u dječjoj dobi javlja AA, a u odrasloj dobi AR. Tipičan slijed (AD-AA-AR) ne mora biti prisutan uvijek, redoslijed javljanja bolesti može biti različit, a poznato je da je atopijski marš moguće razviti i u odrasloj dobi (4). Udruženost atopijskih bolesti je snažna. Podaci govore da među bolesnicima s AD-om trećina bolesnika razvije AA-u a dvije trećine AR (8). U atopijskom maršu je odavno prepoznata obiteljska predispozicija. Smatra se da je ta snažna udruženost posljedica djelovanja istih genetskih i okolišnih čimbenika unutar jedne obitelji (3).

## **1.3. ULOGA EPIDERMALNE BARIJERE**

Koža služi kao važan organ za zaštitu od okolišnih čimbenika. Ona sprječava ulazak patogena i štiti organizam od djelovanja toksičnih tvari i ultraljubičastog zračenja (UV, engl. *ultraviolet*). Osim stvaranja vitamina D, sve se ostale funkcije epidermisa mogu smatrati zaštitnim. Većina ovih kritično važnih funkcija se odvija u *stratum corneum-u* (SC), površinskom sloju epidermisa. Za funkciju barijere najvažniju ulogu imaju strukturni proteini, lipidi i brojne proteaze (14).

#### 1.4. STRUKTURA EPIDERMALNE BARIJERE

Epidermis se sastoji od različitih slojeva: *stratum corneum* (SC), *stratum granulosum* (SG), *stratum spinosum* (SS) i *stratum basale* (SB) (15). SC je vanjski sloj epidermisa, građen od denukleiranih korneocita smještenih u sloju međustaničnih lipida, dok su tzv. uski spojevi (engl. *tight junctions* - TJ) međustanični spojevi koji reguliraju transport vode i makromolekula kroz izvanstanični prostor (16, 17). Mreža uskih spojeva se nalazi između stanica SG i sastoji se od transmembranskog dijela u kojem proteini kladini i okcludini čine glavninu sastavnice. Oštećenja uskih spojeva za posljedicu imaju oštećenu funkciju barijere i kod bolesnika s AD-om (18).

SC je strukturno organiziran kao sustav s dva funkcionalna dijela kojeg čine keratinociti okruženi lipidnim matriksom (14). Prijelaz keratinocita (KC) u korneocite je praćen morfološkim i biokemijskim promjenama. Brojni proteini imaju ulogu u stvaranju epidermalne barijere, a ovdje ćemo navesti samo najbitnije. Keratin 5 i 14 su glavni keratini bazalnog sloja, dok suprabazalno nalazimo keratin 1, 2 i 10. Dodatni proteini koji sudjeluju u diferencijaciji SC-a su involukrin, lorikrin i filagrin.

Proces terminalne diferencijacije počinje u bazalnim stanicama. U intermedijarnom dijelu, stanice su očvrsnute citoskeletnom mrežom keratinskih filamenata. U *stratum granulosum-u* lipidi se stvaraju unutar lamelarnih tjelešaca, keratini se vežu u makrofibrile združene s filagrinom, a orožnjena ovojnica se slaže ugradnjom prekursorskih proteina direktno ispod plazmatske membrane. Kako se stanična membrana razgrađuje, ulazak  $Ca^{2+}$  aktivira transglutaminazu koja je odgovorna za ireverzibilno križno povezivanje proteina orožnjene ovojnice, čime se stvara snažna, netopljiva ovojnica koja okružuje keratinska vlakna. U konačnici se lipidi ispuštaju u međustanični prostor (19). Izgrađena barijera pokazuje analogiju sa strukturom cigle i cementa („*bricks and mortar model*“) gdje korneociti zajedno s orožnjelom ovojnicom predstavljaju cigle a lipidi cement (20).

Lamelarna tjelešca (LB, engl. *lamellar bodies*) su specijalizirane organele koje sadrže smjesu lipida, hidrolitičkih enzima, strukturnih proteina, inhibitora enzima i antimikrobnih peptida (AMP), kao i korneodezmosina (strukturnog proteina

vanjskog dijela korneodezmosoma). Lamelarna tjelešca sadržavaju barem dva antimikrobna peptida, najmanje tri proteazna inhibitora i serinske proteaze (14, 20-22).

Iako su učinjene brojne studije o etiopatogenezi AD-a, patogeneza bolesti ipak dosad nije kompletno razjašnjena (21).

### **1.5. ULOGA OŠTEĆENE BARIJERE U ETIOPATOGENEZI BOLESTI**

U etiopatogenezi bolesti značajnu ulogu imaju složena interakcija genetskih i okolišnih faktora, oštećenje epidermalne barijere, promijenjeni imunološki odgovor i udruženost autoimunih reakcija (21, 23-28). Molekularna genetika je pokazala da je etiologija AD-a vezana ili uz mutacije strukturnih proteina koji imaju ulogu u funkciji barijere ili uz mutacije koje kao posljedicu imaju promjenu sadržaja ili lučenja epidermalnih lamelarnih tjelešaca, dok upala nastaje kao posljedica citokinske kaskade koja nastaje oštećenjem barijere.

Dok većina bolesnika s AD-om u sjevernoj Europi ima mutacije glavnog strukturnog proteina kože, filagrina, danas raste broj poznatih mutacija u genima ostalih strukturnih i enzimatskih proteina uključenih u funkciju barijere, te je primijećeno da ovi naizgled nepovezani proteini imaju utjecaj na sustav lučenja lamelarnih tjelešaca, utječući na isporuku lipida ili ostalih tvari u intersticij SC-a (21).

### **1.6. FILAGRIN I NJEGOVA CENTRALNA ULOGA**

Izraz "filaggrin" (FLG) dolazi od "*filament-aggregating protein*". FLG je protein koji vezuje intermedijarne keratinske filamente, čime predstavlja integralnu strukturnu komponentu barijere (29).

FLG ima mnogo važnih funkcija u epidermalnoj barijeri. Najbitniju funkciju strukturne čvrstoće ostvaruje vezivanjem intermedijarnih keratinskih filamenata (29). Kompaktnost barijere je bitna u kontroli transepidermalnog gubitka vode (TEWL, engl. *transepidermal water loss*). Degradacijski produkti FLG-a sudjeluju

u održavanju hidracije SC-a. Budući da su degradacijski produkti aminokiseline, održavanjem idealnog pH utječu na stabilnost serinskih proteaza, imaju važnu antimikrobnu ulogu, vezane su uz lipidni metabolizam i sudjeluju u UV zaštiti (23, 25, 30-35).

FLG se stvara i sprema u obliku proFLG polimera u keratohijalnim granulama *stratum granulosum-a*. ProFLG molekula se sastoji od N-terminalne domene na koju se nastavlja 10, 11 ili 12 identičnih FLG ponavljanja, i C-terminalne domene (36, 37). Svaka od ovih komponenti ima drugačiju funkciju tijekom diferencijacije epidermisa (37, 38). Na granici *stratum granulosum-a* i *stratum corneum-a* djelovanjem proteaza dolazi do cijepanja u FLG-monomere (25, 39, 40). FLG daje funkciju čvrstoće povezivanjem keratinskih vlakana. Monomeri FLG vežu keratin 1 i 10 i druge intermedijarne filamentne proteine unutar staničnog citoskeleta stvarajući čvrste nakupine, a potom olakšavaju kolaps i splošnjivanje stanica u SC-u (31, 41). Keratin 1 i 10 se udružuju s orožnjenom ovojnicom tijekom terminalne diferencijacije, te zajedno s FLG-om i njegovim degradacijskim produktima čine većinu citosola denukleiranih korneocita SC-a. FLG monomeri se zajedno s ostalim proteinima odgovornim za epidermalnu diferencijaciju križno vežu u orožnjeloj ovojnici djelovanjem transglutaminaza (25). Proces splošnjivanja stanica se zbiva i u odsustvu FLG no, čini se da je mutacija FLG gena udružena s gubitkom organizacije keratinskih filamenata, oštećenjem punjenja lamelarnih tjelešaca i nenormalnom strukturom lamelarnog dvosloja (42). FLG predstavlja bitnu poveznicu između strukturnih proteina i lipida *stratum corneum-a*.

FLG doprinosi stvaranju proteinsko-lipidne orožnjele stanične ovojnice koja zamjenjuje membrane keratinocita i time formira barijeru prema gubitku vode i priječi ulazak alergena i mikroorganizama (43).

Kako se keratinociti pomiču prema površini, funkcija čvrstoće nije više potrebna. FLG se odvaja od orožnjele ovojnice i odvija se proteolitička razgradnja FLG-a unutar citosola u aminokiseline (glutamin, arginin i histidin), a potom deiminacija u njegove metabolite (25). Cijepanje FLG monomera se zbiva djelovanjem kaspaze 14, kalpaina 1 i bleomicin hidrolaze (25, 44). Ovim procesom nastaju

degradacijski produkti FLG – aminokiseline koje se grupnim nazivom nazivaju prirodni ovlaživači (NMF, engl. *natural moisturising factor*).

### 1.7. MUTACIJA FILAGRINSKOG GENA

Od 2006. godine i otkrića da je mutacija filagrinskog gena (*FLG*) uzrok nastanka vulgarne ihtioze i najjači genetski faktor rizika za AD, dolazi do značajnog napretka u razumijevanju patogeneze AD-a (31, 45). U bolesnika s AD-om ekspresija *FLG* je smanjena, a nul-mutacija *FLG* gena (LOF *FLG*, engl. *loss of function*) se danas smatra najjačim faktorom rizika za razvitak AD-a. Genetske studije na blizancima su pokazale da je nasljednost u slučaju LOF *FLG* 75 %, što ovu mutaciju čini najsnažnijim genetskim faktorom fizika (kromosom 1q21.3) (46). Bolesnici koji nositelji LOF *FLG* imaju bolest karakteriziranu ranim početkom, težom kliničkom slikom i visokom prevalencijom IgE-posredovane senzibilizacije (25, 31, 33, 45). LOF *FLG* rezultira ili u redukciji (heterozigoti) ili potpunom odsustvu (homozigoti) epidermalnog *FLG* i njegovih degradacijskih produkata (25). Navedena mutacija nosi rizik za više atopijskih bolesti (37, 45). Bilo koja od LOF *FLG* rezultira istim biološkim efektom, odnosno za rezultat ima nestabilni, oštećeni pro*FLG* koji ne može biti procesiran u funkcionalni *FLG* (31).

Struktura filagrinskog gena je kompleksna (47, 48). Velika i repetitivna struktura predstavlja veliki izazov za rutinsko PCR (engl. *polymerase chain reaction*) sekvencioniranje (37). Prisustvo intragenskih varijacija broja kopija gena (*copy number variation* - *CNV*) doprinosi kompleksnosti analize takvog gena (48). *Southern blot* analizom određena su 3 alela koji kodiraju 10, 11 ili 12 filagrinskih kopija (47). Stoga je *CNV FLG* također bitan i poznato je da u populaciji varira između 20 i 24 (31, 48). U irskoj populaciji je nađeno da najkraći genotip (10,10) ima 11,5 % populacije što nosi rizik od 1,67 za razvitak AD-a (rizik neovisan o prisustvu LOF *FLG*). Ukoliko se isključi učinak nul-mutacije *FLG*, svako dodatno *FLG* ponavljanje smanjuje omjer vjerojatnosti (engl. «*odds ratio*») za AD za 0,88 (48).

Deficijencija FLG se smatra ključnim elementom patogeneze AD-a budući da FLG ima brojne funkcije u barijeri (25, 49). Na deficijenciju FLG ne utječe samo prisustvo mutacije, broj kopija gena, metilacija DNK, nego ekspresiju ovog proteina mijenjaju i mnogi drugi čimbenici. Ekspresija FLG može biti sekundarno smanjena, odnosno deficijencija FLG-a može biti stečena (49). Danas se zna da su vrijednosti FLG-a i degradacijskih produkata u epidermisu ne samo posljedica *FLG*-genotipa, nego su pod utjecajem upale i egzogenih stresora (25). Razlozi smanjenih razina FLG mogu biti višestruki i uključuju promjene gena za FLG, djelovanje okolišnih čimbenika, djelovanje citokina (upala), mikroorganizma i djelovanje lokalne terapije (25). Funkcija i uloga FLG-a u epidermalnoj barijeri je višestruka. U nastavku teksta bit će objašnjeno zašto se manjak FLG-a smatra centralnim i najznačajnijim poremećajem u etiopatogenezi AD-a.

#### **1.8. FILAGRIN I PRIRODNI OVLAŽIVAČI**

U gornjim dijelovima SC-a, FLG se razgrađuje u aminokiseline, od kojih su najzastupljenije serin, histidin, arginin, glutamin i glicin. Mješavina aminokiselina koje nastaju razgradnjom FLG-a i njihovih derivata se naziva prirodnim faktorima ovlaživača (engl. "*natural moisturizing factor*"- NMF) zbog njihovih higroskopskih svojstava (28, 31, 50, 51). U korneocitima, histidin se metabolizira se u *trans*-urokaničnu kiselinu (*trans*-UCA), koja je važna za održavanje pH gradijenta epidermisa (51) i zaštitu od UVB-zračenja (25, 32, 35, 44). Glutamin se pretvara u pirolidon-5-karboksiličnu kiselinu, glavnu komponentu NMF-a, te predstavlja potentni ovlaživač koji je zaslužan za zadržavanje vode u SC (25). Degradacija FLG-a je posredovan proteazama (kaspaza 14, kalpain 1 i bleomicin hidrolaza) (52, 53). LOF *FLG* su povezane s niskim vrijednostima NMF-a, povišenjem TEWL-a i s oštećenjem integriteta i kohezije SC-a (25, 26, 28, 50). Razgradni produkti FLG-a djeluju na mnoge funkcije koje su nužne za održavanje homeostaze epidermisa, ne samo na zaštitu od UV zraka, hidraciju, održavanje kiselosti i pH koja inhibira kolonizaciju patogenim mikroorganizmima, nego potiču i oslobađanje IL-1 $\alpha$  i IL-1 $\beta$  koje stimuliraju upalu (54, 55).



## **1.9. UČINAK FILAGRINA NA pH, KISELI OMOTAČ I ANTIMIKROBNO DJELOVANJE**

Nositelji LOF *FLG* imaju povišeni pH na površini SC-a (56). Kiseli pH je od iznimne važnosti za stabilnost i funkciju barijere. Redukcija FLG-a olakšava kolonizaciju kože mikroorganizmima, dijelom zbog gubitka kiselog omotača, a dijelom zbog gubitka neutralizirajućeg efekta na  $\alpha$ -toksin *Staphylococcus aureus*-a koji je posredovan lučenjem sfingomijelinaze, enzima u lamelarnim tjelešcima keratinocita za čije adekvatno lučenje je FLG potreban (57, 58). Osim toga, povišene vrijednosti pH koje nastaju kao posljedica nedostatka razgradnih produkata FLG-a rezultiraju u povišenoj aktivnosti serinskih proteaza (59).

## **1.10. MODULACIJA AKTIVNOSTI SERINSKIH PROTEAZA**

Kiseli pH regulira aktivnost kaskade serinskih proteaza čija je funkcija usklađivanje epidermalne diferencijacije i stvaranje orožnjene ovojnice (60). Povišene vrijednosti pH pojačavaju funkciju serinskih proteaza kalikreina koje su odgovorne za odljuštenje korneocita (61). Odljuštenje korneocita je precizno regulirano djelovanjem serinskih proteaza (SP) i njihovih inhibitora ( engl. *serin protease inhibitor*, SPI). Među inhibitorima je bitno spomenuti serinski limfoepitelijalni Kazal-tip 5 proteazni inhibitor (eng. *lymphoepithelial Kazal type inhibitor* - LEKTI), kodiran serin proteaznim inhibitorom Kazal-tipa 5 (eng. *serin protease inhibitor Kazal type 5* - *SPINK5*). LEKTI ima centralnu ulogu u patogenezi Nethertonova sindroma koji je karakteriziran teškim oblikom dermatitisa nalik na AD, alergijskim rinitisom i astmom i visokim vrijednostima ukupnog IgE (62). Interesantno je napomenuti da su polimorfizmi *SPINK5* povezani s AD-om. Nađene su razlike u polimorfizmima ovisno radi li se o ranom ili kasnom početku bolesti. Polimorfizam koji je nađen kod ranog početka bolesti, (rs2303067 *SPINK5*) je uključen u funkciju barijere, dok je kod kasnog početka bolesti nađen polimorfizam (rs4950928 u *CHI3L1*) uključen u imunološki odgovor (63).

## 1.11. ULOGA LIPIDA U EPIDERMALNOJ BARIJERI

Međustanični prostor rožnatog sloja kože čine lipidi organizirani u kontinuirane lipidne dvoslojeve. Glavne klase lipida u SC su ceramidi (CER), kolesterol (CHOL) i slobodne masne kiseline (engl. *free fatty acid*, FFA), koji su prisutne u ekvimolarnim omjerima (64). FFA imaju lance duljina između 14 i 34 ugljikovih atoma (C-atoma), a najčešća duljina je između 24 i 26 C-atoma (64-75). Lipidna kompozicija CER-a je složena (Slika 1). Svaki CER se sastoji od sfingoidne baze koja je povezana preko amidne veze s dugolančanom masnom kiselinom (64). Glavne skupine sfingoidnih baza uključuju sfingoizin (S), sfinganin (dihidrosfingoizin, dS), 6-hidroksisfingoizin (H) i fitosfingoizin (P) (Slika 1) (64, 66). Dugolančane masne kiseline u ceramidima čine masne kiseline bez hidroksilne skupine (N),  $\alpha$ -hidroksi masne kiseline (A) ili esterificirane  $\omega$ -hidroksi masne kiseline (EO) (65). Trenutno vrijedi nomenklatura prema Motta *i sur.* koja koristi strukturu oba lanca kako bi identificirala podklase CER (66). Svaki od lanaca može varirati u broju C-atoma, dvostrukih veza i hidroksilnih skupina vodeći do nekoliko stotina jedinstveno strukturiranih CER.

	Masna kiselina	Masne kiseline bez hidroksilne skupine	$\alpha$ -hidroksi masne kiseline	Esterificirane $\omega$ -hidroksi masne kiseline
<b>Sfingoidna baza</b>		[N]	[A]	[EO]
<b>Sfingoizin</b>		[NS]	[AS]	[EOS]
<b>Dihidrosfingoizin (sfinganin)</b>		[NdS]	[AdS]	[EOdS]
<b>Fitosfingoizin</b>		[NP]	[AP]	[EOP]
<b>6-hidroksi-sfingoizin</b>		[NH]	[AH]	[EOH]

**Slika 1.** 12 klasa ceramida (plavo - masna kiselina, crveno - sfingoidna baza, zeleno -  $\omega$ -hidroksi masna kiselina)

## 1.12. LIPIDNA ORGANIZACIJA ZDRAVE KOŽE

Lipidi u SC-u imaju iznimnu lipidnu organizaciju koja se ne može naći niti u jednom drugom organu. Serija lipidnih lamela se ponavlja u nejednakim širinama koje poprimaju široko-usku sekvencu (64, 67). Dvije lamelarne faze se ponavljaju na udaljenostima od 13 ili 6 nm, što se zove duga periodična faza (engl. “*long periodicity phase*”, LPP) i kratka periodična faza (engl. “*short periodicity phase*”, SPP) (64). Ne samo ovakva lamelarna organizacija, već i lateralna organizacija lipida je od presudne važnosti za funkciju barijere. Lateralnu organizaciju predstavlja slaganje lipida unutar razine lamele, perpendikularno na lamelarnu lipidnu organizaciju, te razlikujemo 3 moguće organizacije: vrlo gusto pakiranu ortorombičnu organizaciju, manje gusto heksagonalnu organizaciju i tekuću organizaciju (64). Lipidi SC-a se slažu u gustom, ortorombičnom lateralnom slaganju koje češće nalazimo u dubljim dijelovima SC, dok se heksagonalno slaganje češće nalazi u višim dijelovima SC-a (64).

## 1.13. PROMJENE U LIPIDIMA KOD BOLESNIKA S ATOPIJSKIM DERMATITISOM

Kod bolesnika s AD-om opažene su promjene i sastava i lipidne organizacije (26, 71-75). Na CER-a bolesnika nalazimo više tipova promjena: nađene su promjene u sastavu podklasa (povišenje ili sniženje količine određenih podklasa), povećan je omjer CER-a s kratkim lancima i smanjen udio dugolančanih CER-a (56, 64, 72, 73, 76, 77). Sve su klase acilnih ceramida (acil-CER) snižene u lezionalnoj koži u odnosu na zdravu kožu (64). Osobito snažno smanjenje količine acil-CER-a je nađeno u lezionalnoj koži bolesnika, dok su vrijednosti CER-a C34 izrazito povišene (64, 65, 77). Srednja dužina lanca CER-a u nelezionalnoj koži bolesnika je smanjena u odnosu na zdrave ispitanike (71).

Promjene su nađene i u sljedećoj lipidnoj klasi, FFA. Kod bolesnika je nađena izrazita razlika u distribuciji dužine lanaca, što je osobito izraženo u lezionalnoj koži (64). Nađen je povećan udio kratkolančanih FFA ( $\leq$  C18) i smanjen udio dugolančanih FFA ( $\geq$  C24) (64,78). Sve gore navedeno upućuje na činjenicu da

dužina lanaca lipida igra ključnu ulogu u oštećenju funkcije barijere (64).

Kod bolesnika s AD-om su nađene promjene i u lateralnoj i lamelarnoj organizaciji (64). Kod bolesnika s AD-om raste udio lipida koji poprimaju heksagonalno lateralno slaganje u odnosu na kontrole (79, 80). Kako je heksagonalno slaganje manje čvrsto i kompaktno, ova promjena utječe na barijeru i stoga možemo zaključiti su lipidi SC-a kod AD-a manje prostorno uređeni (70). Analizom lamelarne organizacije, nalazi se smanjena udaljenost ponavljanja lamelarne faze u nelezionalnoj koži, što se objašnjava smanjenjem duljine lanaca lipida u SC-u i smanjenim vrijednostima acil-CER koji su važni za LPP formaciju (80). Stoga su kod AD-a nađene ne samo promjene lipidnog sastava, nego i organizacije, i to lezionalne i nelezionalne kože (64, 80). Duljine lipidnih lanaca FFA i CER su direktno vezane i za lipidnu organizaciju i funkciju epidermalne barijere (81). Ove promjene vezane su i uz veću permeabilnost barijere (64, 70).

Također je oštećeno pražnjenje lamelarnih tjelešaca kod bolesnika, što rezultira smanjenim vrijednostima lipida međustaničnog prostora (82-85).

Više enzima je uključeno u metabolizam lipida: elongaze, serin palmitoil transferaze, ceramidne sintaze. Elongaze (ELOVL) bitne za sintezu FFA su ELOVL1, ELOVL4 i ELOVL6, a skraćenje srednje dužine FFA može nastati zbog smanjene ekspresije/aktivnosti ovih enzima (86). CER sintaze vežu dugi lanac sa sfingoidnom bazom, što je kritični korak u sintezi CER (87). Sfingomijelinaze i glukocerebrozidaze su odgovorne za zadnji korak u sintezi CER, a oba enzima su pod utjecajem pH i serinskih proteaza, te su nađene smanjene aktivnosti u koži bolesnika s AD-om (88).

#### **1.14. IMUNOLOGIJA ATOPIJSKOG DERMATITISA**

U etiopatogenezi AD-a postoji složeni odnos između poremećene imunološke regulacije i oštećenja strukture i funkcije barijere. Citokinska neravnoteža ima veliki učinak na keratinocitnu diferencijaciju i druge segmente barijere (89). Često

se postavlja pitanje što je primarno, poremećena funkcija barijere ili promijenjeni imunološki odgovor, ali odgovor na to pitanje nije nimalo jednoznačan. Poremećaji imunološkog sustava uključuju mehanizme prirodene i stečene imunosti. Patogenetska uloga autoimunosti nije u potpunosti rasvijetljena, ali pokazano je da se elementi autoimunosti mogu naći u 91 % bolesnika, vjerojatno kao posljedica neprepoznatih auto-epitopa (90, 91).

U etiopatogenezi AD-a ulogu ima prirodena i stečena imunost. Glavni nositelji prirodene imunosti su keratinociti, antimikrobni peptidi (AMP), urođene limfoidne stanice grupe 2 (engl. innate lymphoid cells group 2, ILC2) i Toll-like receptori (TLR). Keratinocit luči dvije klase antimikrobnih peptida (katelicidin i humani- $\beta$ -defenzin) (90, 92). Kod bolesnika s AD-om se obje klase smanjeno luče, što uzrokuje sklonost infekcijama (92, 93). Osim važne antimikrobne uloge, ovi peptidi potiču lučenje mnogih citokina/kemokina kojima keratinocit potiče imunološke reakcije.

Bolesnici s AD-om imaju smanjenu ekspresiju TLR-a u koži (94). Dokazano je da ti receptori pojačavaju integritet uskih spojeva, čime utječu na integritet barijere i igraju ulogu u obrani od bakterijskih i virusnih infekcija (94).

U etiopatogenezi AD-a centralnu ulogu ima stečeni imunološki odgovor s glavnom ulogom Th2 staničnog odgovora koji je karakteriziran izrazitom ekspresijom Th2 citokina IL-4 i IL-13 (95). Klinički nezahvaćena, nelezionalna koža također ima oštećenu barijeru i pokazuje blagi upalni odgovor, pretežno Th2 upalnog citokinskog miljea s izraženom ekspresijom IL-13 i visokoafinitetnog IgE receptora (96). Od Th2 medijatora, IL-4 i IL-13 imaju ključnu ulogu u patogenezi AD-a, te su kod bolesnika s AD-om nađeni polimorfizmi IL-4 i IL-13 gena (97, 98). Prvi signal dolazi iz oštećene barijere. Kada antigeni prodru kroz oštećenu barijeru dolaze do dendritičkih stanica (antigen-prezentirajućih stanica) koje potom migriraju u regionalni limfni čvor i ostvaruju interakcije s T stanicama. Među njima je grupa CLA<sup>+</sup> memorijskih/efektorskih T stanica (engl. *cutaneous lymphocyte associated-antigen*, CLA<sup>+</sup>) koje proizvode IL-13 (99). Citokini i kemokini iz keratinocita i dendritičkih stanica nakon izlaganja antigenu stimuliraju T limfocitne stanice- tzv. ILC koje potom proizvode cijeli spektar pretežito Th2 citokina s posljedičnom proliferacijom i aktivacijom upalnih stanica kao što su T

stanice, B stanice, eozinofili i mastociti (100, 101). IL-13 je ključni citokin upalne reakcije u AD-u, uključen u izazivanje svrbeža, remodeliranje tkiva, aktivaciju eozinofila, reguliranje sinteze IgE a također promovira epikutanu senzibilizaciju (102-104). IL-4 i IL-13 su povišeni u akutnim i u kroničnim lezijama AD. Važnost IL-4 i IL-13 u patogenezi potvrđuju dva zapažanja: činjenica da upalni odgovor predvođen IL-4/IL-13 može smanjiti ključne Th1 i Th17-ovisne obrambene mehanizme u AD-u, kao i činjenica da dupilumab čiji se terapijski učinak ostvaruje blokiranjem IL-4 i IL-13 pokazuje uspjehe u liječenju. Ove dvije činjenice potvrđuju centralnu ulogu IL-4 i IL-13 u patogenezi AD-a (105).

Iako se čini da je imunologija AD-a nedvojbeno vezana uz strogu aktivaciju Th2 staničnog odgovora u lezionalnoj i nelezionalnoj koži, Th22, Th17/IL-23 i Th1 citokinski odgovor igra bitnu ulogu, pogotovo u pojedinim podtipovima bolesti (106, 107). Akutni početak AD-a je vezan uz Th2 i Th22 citokinske gene, s izrazitim pojačanjem ove osovine kako bolest napreduje u kroničnu fazu, postajući dijelom kronične faze (89). U akutnim lezijama nastup AD-a je karakteriziran Th2 (IL-4, IL-5, IL-13, IL-31, CCL18) i Th22 (IL-22, S100A proteini) odgovorima (89).

Th1, Th17, i Th22 stanice i njihovi citokini su prisutni u koži bolesnika s AD-om i imaju ulogu u stvaranju spongioze, stimulacije epidermalne hiperplazije i remodeliranju epidermisa (108-110). Zanimljivo je da je AD s vrlo ranim početkom u djetinjstvu karakteriziran sa značajnim Th17/Th22 odgovorom koji se pridružuje Th2 upalnom tipu (110).

T-stanični podtip Th17 je karakteriziran proizvodnjom IL-17 i IL-22, kao i ekspresijom kemokinskog receptora 6 (eng. *chemokine receptor-6*, *CCR6*). Smatra se da ima bitnu ulogu u autoimunosti i da predstavlja prvu liniju obrane ljudskog organizma budući da djeluje na antimikrobne peptide čime predstavlja važnu poveznicu između stečene i prirodne imunosti (108, 111).

Th2 i Th22 odgovori su izraženi u kroničnim lezijama, uz aktivaciju Th1-osovine (IFN- $\gamma$ , CXCL9, CXCL10), te se vjerojatnije radi o paralelnoj aktivaciji Th2 i Th1 osovine, nego o isključivom Th1 odgovoru. Th1 odgovor je odgovoran za kroničnost lezija (97).

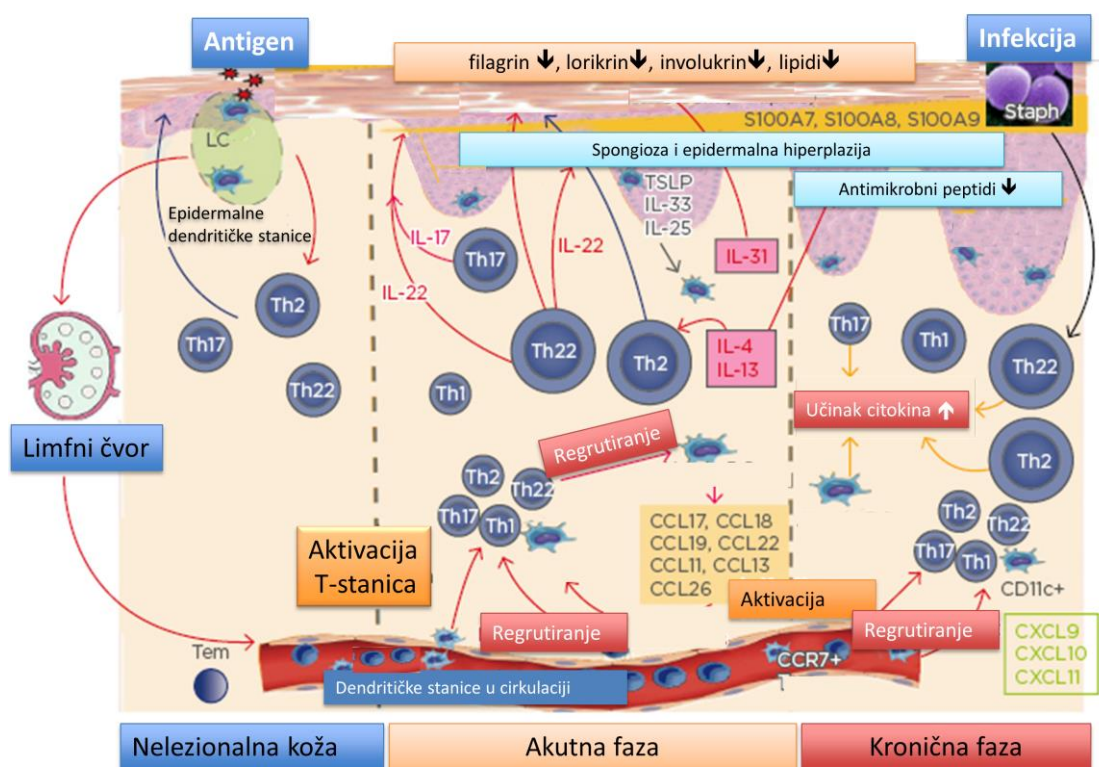
Od bitnih citokina potrebno je spomenuti još i IL-22, koji je ključni medijator epidermalne hiperplazije, dok je IL-31 citokin odgovoran za svrbež i pokazuje visoke vrijednosti u akutnim lezijama, pokazujući korelaciju s težinom bolesti (97, 112).

Th2 upalni odgovor uzrokuje snažne promjene epidermalne barijere, djelujući na strukturu a time i funkciju. Th2 citokini ostvaruju učinak i na strukturne proteine i na ceramidni metabolizam. Th2 medijatori uzrokuju smanjenu ekspresiju gena grupe strukturnih proteina terminalne diferencijacije u epidermisu i produkte uskih sveza pridonoseći defektu barijere kod AD-a (113,114). Th2 (IL-4, IL-13, IL-31) i Th22 (IL-22) citokini uzrokuju smanjenu ekspresiju filagrina i ostalih strukturnih proteina (113-119). KC diferenciran u prisustvu IL-4 i IL-13 pokazuje značajno smanjenu ekspresiju FLG gena (116, 117). IL-4 smanjuje ekspresiju mnogih gena epidermalnog diferencijacijskog kompleksa (118,119). Involukrin i lorikrin su smanjeno izraženi u lezionalnoj i nelezionalnoj koži djelovanjem IL-4 i IL-13, što pridonosi defektu funkcije barijere (119). Također ima dokaza da IL-17 može pridonijeti smanjenoj ekspresiji FLG i djeluje na keratinocit djelovanjem na gene odgovorne za staničnu adheziju (113).

TNF- $\alpha$  sam ili u kombinaciji s Th2 citokinima smanjuje vrijednosti dugolančanih slobodnih masnih kiselina i hidroksi ceramida, čime se remeti lipidna organizacija (77, 120).

IL-4 izaziva smanjenje ceramidne sinteze (121). IL-31 povisuje udio slobodnih masnih kiselina i smanjuje udio ceramida. Sve ovo upućuje na činjenicu da Th2 upalni odgovor direktno djeluje i na strukturu i funkciju barijere (122).

Imunološki odgovor je povezan i s mikrobiomom i antimikrobnom zaštitom. Th2 polarizacija olakšava vezanje i kolonizaciju *Staphylococcus aureus-a* (SA), budući da IL-4 i IL-13 inhibiraju stvaranje antimikrobnih peptida (123-125). U antimikrobnoj zaštiti veliku ulogu igra IL-17 koji predstavlja poveznicu specifične stečene i mikrobno-izazvane prirodne imunosti (108). Interakcija između kožne barijere, imunološkog odgovora i mikrobioma prikazana je u Slici 2.



**Slika 2.** Interakcija između kožne barijere i imunološkog odgovora u AD-u. Preuzeto iz rada Gittler i sur. Progressive activation of T(H)2/T(H)22 cytokines and selective epidermal proteins characterizes acute and chronic atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2012;130:1344–54.

### 1.15. ULOGA KOŽNOG MIKROBIOMA I *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Komenzalni *Staphylococcus epidermidis* ima zaštitnu ulogu budući da smanjuje rast patogenih vrsta stvaranjem antimikrobnih peptida i proteaza. Oko 90 % akutnih lezija je kolonizirano SA, što je daleko više u usporedbi s kroničnim lezijama, nelezionealnom kožom i kožom zdravih pojedinaca gdje ga nalazimo u samo 5-10 % lezija (93,126). Razlozi ove povećane kolonizacije kože nalaze se u poremećenoj barijeri, oštećenom lipidnom sadržaju, promjenjenom pH (alkalizacija) i oštećenom prirođenom imunološkom odgovoru. SA ne samo da kolonizira kožu, nego sudjeluje u patogenezi same bolesti (123, 127-129). Mehaničko oštećenje grebanjem, okolišnim faktorima i detergentima pridonosi daljnjem oštećenju barijere i olakšanoj kolonizaciji (129). Sam SA stvara biofilm od hidratiziranog matriksa sačinjenog od polisaharida i proteina koji olakšava staničnu adheziju (93,125,129-131). Adhezija SA je posredovana fibronektinom i



fibrinogenom. Oštećenje barijere dovodi do izlaganja izvanstaničnog matriksa SC-a, a adhezini matriksa uključuju dermalni i epidermalni fibronektin i laminin (131). Grebanje kože mehanički oštećuje barijeru i pokreće oslobađanje citokina koji reguliraju ekspresiju adhezina. IL-4 je ključni Th2 citokin koji potiče stvaranje stafilokoknih adhezina (129, 132). Nadalje, povišene vrijednosti pH potiču kolonizaciju SA, a opaženo je da je optimalni pH za kolonizaciju između 7 i 8 (133).

Promjena lipidnog sastava je sljedeći faktor koji pridonosi povećanoj kolonizaciji SA, budući da povećana suhoća i grubost strukture takvog epidermisa pridonosi kolonizaciji (64). SA stimulira daljnju hidrolizu ceramida djelovanjem bakterijske ceramidaze (64).

Sfingozin je bitna lipidna komponenta barijere i u normalnim uvjetima iskazuje jake antimikrobne učinke protiv SA. Bolesnici s AD-om imaju smanjene vrijednosti sfingozina u SC-u, što je posljedica pojačane aktivnosti ceramidaze i smanjenih vrijednosti CER-a (70-75).

Bolesnici s AD-om pokazuju oštećenje prirođenog imunološkog odgovora što rezultira smanjenim ograničavanjem rasta mikroorganizama. Dokazano je da SA djeluje kao superantigen (134-136). Nadalje, oko 70% izoliranih lanaca proizvodi egzotoksine koji djeluju kao superantigeni, a sam SA može djelovati i kao alergen (134-137).

## **1.16. UTJECAJ OKOLIŠA**

Tijek bolesti ovisi i o okolišnim faktorima. Do treće godine života najvažniju ulogu imaju nutritivnih alergeni. Nakon treće godine života na važnosti dobivaju inhalacijski alergeni, što se očituje progresijom atopijskog marša i pojavom AA i AR. Alergija može, i ne mora biti udružena s AD-om. Ipak, mali broj djece ima IgE-posredovanu alergiju na hranu. Smatra se da se radi o 30 % djece i tada se najčešće radi o ranoj pojavi bolesti i težim kliničkim slikama. Alergija na hranu je iznimno rijetko prisutna u odraslih bolesnika (92, 138). Prisustvo alergije na hranu u ranoj dobi upućuje na teži oblik AD-a. Oko 50–70 % djece s ranim početkom

bolesti je senzibilizirano na jedan ili više alergena, većinom na kravlje mlijeko, kokošje jaje, kikiriki, a u kasnijoj dobi na prašinu, pelud i epitel životinja (92, 138). Primjerice, više od 85 % bolesnika pokazuje preosjetljivost na grinju kućne prašine. Kod nekih bolesnika izrazito je naglašena sezonska varijacija bolesti (92).

Okoliš može imati utjecaj putem epigenetskih alteracija, uključujući microRNK i DNK metilaciju (139-142). Metilacija može modulirati transkriptne vrijednosti gena uključenih u epidermalni diferencijacijski kompleks i prirodenu imunost, što potvrđuje ulogu gensko-okolišnih interakcija u AD-u (139-142). Od okolišnih čimbenika koji utječu na tijek bolesti treba izdvojiti izloženost alergenima majke/fetusa tijekom fetalnog perioda, izloženost iritansima, klimatske utjecaje (temperatura, vlažnost, UV zračenje, vlaga), zagađenost, izloženost duhanskom dimu, tvrdoću vode, urbana/ruralna sredina i prehrana (139-142).

### **1.17. SVRBEŽ I NJEGOVA ULOGA U PODRŽAVANJU BOLESTI**

Patofiziologija svrbeža je složena i nedostatno razjašnjena, no općenito je poznato da tzv. *ciklus svrbeža i grebanja* podržava bolest. Tipično je svrbež izražen noću što dovodi do grebanja tijekom noći i loše kvalitete sna. Dokazano je da blokada histaminskih receptora ne dovodi do smanjenja osjećaja svrbeža kao ni do smanjenja upale kod bolesnika s AD-om (143-144).

Moderni koncepti razumijevanja odnosa živčanog sustava i kože temelje se na činjenici da su oba organa nastala od iste osnove- ektoderma. Identificirana je uloga neuropeptida kao što su kalcitonin, „*gene-related peptide*“, supstanca P, kao i neutrotrofini kao što je „*nerve growth factor*“. Novije identificirani medijatori svrbeža uključuju histamin-4 receptor i IL-31. Uloga opioidnih receptora, ostalih citokina kao i proteinazno-aktiviranih receptora su istraživane, ali nijedna molekula ili put se nije nametnuo kao dominantni medijator svrbeža u AD-u. Istraživani su i histamin-neovisni kolinergični mehanizmi (143,144).

## 1.18. UDRUŽENOST S DRUGIM BOLESTIMA

Opisana je udruženost AD-a s drugim bolestima (145-153). AD je udružen s povećanom sklonošću bakterijskim i virusnim infekcijama kože, većinom težeg tijeka, kao i težim oblicima ekstrakutanih infekcija (125-127). Povezan je s brojnim psihičkim komorbiditetima, osobito tipa sindromom manjka pažnje i hiperaktivnosti (eng. *attention-deficit hyperactivity disorder*, ADHD), anksioznosti i depresijom.

Iako su podaci neujednačeni, čini se da je dugotrajni, teški oblik AD-a povezan s adultnim limfomima. Meta-analiza učinjena 2015. godine je pokazala mali, ali značajno povećani rizik od razvitka limfoma kod bolesnika s AD-om (145,146). Najznačajniji faktor rizika je težina bolesti. Smatra se da kronična upala, uz određene genetske čimbenike može promovirati karcinogenezu, uz činjenicu da Th2 odgovor skreće imunološki odgovor od Th1 imunološkog odgovora koji u imunologiji predstavlja glavni tip odgovora protiv tumora (147). Sustavni imunosupresivni lijekovi koji se koriste u terapiji umjerenog do teškog oblika bolesti (ciklosporin i azatioprin) su povezani s povećanim rizikom od maligniteta (148, 149).

AD može biti povezan s pretilošću, kardiovaskularnim bolestima, autoimunim bolestima, osobito alopeciom areatom i gastrointestinalnim imunološko-posredovanim poremećajima (150). U posljednje vrijeme se sve više obraća pažnja na udruženi povišeni kardiovaskularni rizik, koji raste s težinom kliničke slike, što je potvrđeno meta-analizom (151).

Udruženost AD-a i kontaktne preosjetljivosti je duži niz godina kontroverzna tema. Bolesnici s AD-om, često u odrasloj dobi, pate od učestale pojave ekcema ruku i alergijskog kontaktnog dermatitisa, iako se navedeno ne smatra dijelom atopijskog marša. Rezultati studija različitih autora su različiti, što je vjerojatno posljedica različitog odabira izučavane populacije (ambulantni vs. hospitalno liječeni bolesnici; opća populacija ili selekcionirana populacija), težine bolesti bolesnika s AD-om, dobi u kojima su rađena testiranja (različitosti pedijatrijske i odrasle populacije), kao i specifičnosti navika i okoliša pojedinih populacija.

Budući da bolesnici s AD-om imaju trajno oštećenu barijeru (oštećenost barijere je prisutna i u lezionalnoj i nelezionalnoj koži), koja zbog trajno prisutne upale predstavlja “*locus minoris*” rezistencije, ova populacija predstavlja bolesnike s vrlo visokim rizikom i olakšanim prolaskom alergena kroz barijeru. Također ne treba zanemariti činjenicu da se radi o bolesnicima koji će cijeli život svakodnevno koristiti razne lokalne pripravke tipa emulijensa, kortikosteroida i drugih lokalnih pripravaka (152, 153).

### **1.19. POSTAVLJANJE DIJAGNOZE**

Dijagnoza bolesti se postavlja na temelju kliničke slike, a daljnja karakterizacija bolesti se može učiniti dopunskim pretragama, kao što su alergološki testovi, ukupni IgE i specifični IgE. Postoji više kriterija za postavljanje kliničke slike, a najčešće korišteni kriteriji su Hanifin i Rajka kriteriji i UK Working Party Criteria (Tablica 1)(154, 155).

**Tablica 1.** Dijagnostički kriteriji prema Hanifin i Rajka i The UK Working Party

<b>Hanifin and Rajka Diagnostic Criteria for Atopic Dermatitis (AD)</b>	
<p><b>Glavni kriterij:</b> mora biti zadovoljeno 3 ili više</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Pruritus</li> <li>2. Tipična morfologija i distribucija                             <ul style="list-style-type: none"> <li>-Lihenifikacija fleksura ili linearnost kod odraslih</li> <li>-Zahvaćanje lica ili ekstenzornih područja kod djece</li> </ul> </li> <li>3. Kroničan ili kronično-ponavljajući dermatitis</li> <li>4. Osobna ili obiteljska anamneza atopije (astma, alergijski rinitis, atopijski dermatitis)</li> </ol>	<p><b>Mali kriterij:</b> treba biti 3 ili više:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Kseroza</li> <li>2. Ihtioza, palmarna hiperlinearnost ili keratosis pilaris</li> <li>3. Rana reaktivnost u kožnim testovima (tip 1)</li> <li>4. Povišen serumski IgE</li> <li>5. Rana dob nastupa</li> <li>6. Sklonost kožnim infekcijama (osobito <i>S.aureus</i> i herpes simplex) ili oštećenje T-stanične imunosti</li> <li>7. Sklonost nespecifičnim ekcemima ruku ili stopala</li> <li>8. Ekcem bradavica</li> <li>9. Heilitis</li> <li>10. Rekurentni konjunktivitis</li> <li>11. Dennie-Morgan infraorbitalna brazda</li> <li>12. Keratokonus</li> <li>13. Anteriorna subkapsularna katarakta</li> <li>14. Periorbitalno zatamnjenje</li> <li>15. Bljedilo lica ili eritem lica</li> <li>16. Pityriasis alba</li> <li>17. Nabori prednjeg dijela vrata</li> <li>18. Svrbež prilikom znojenja</li> <li>19. Intolerancija na vunu i lipidna otapala</li> <li>20. Perifolikularno naglašenje</li> <li>21. Intolerancija na hranu</li> <li>22. Tijek ovisan o okolišnim ili emotivnim faktorima</li> <li>23. Bijeli dermografizam ili odgođeno blijedenje</li> </ol>
<p><b>“UK working party” kriteriji</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Podatak o zahvaćanju fleksura</li> <li>2. Anamnestički podatak o suhoći kože</li> <li>3. Nastup prije dobi od 2 godine</li> <li>4. Osobna anamneza astme</li> <li>5. Anamnestički podatak o pruritičkoj leziji kože</li> <li>6. Vidljivi dermatitis fleksura</li> </ol>	

Kako bi se bolest mogla okarakterizirati kao ekstrinzički ili intrinzički oblik bolesti, osim kliničke slike, potrebno je učiniti dodatnu kliničku i laboratorijsku obradu (krvna slika, ukupni i specifični IgE u serumu, kožno alergološko testiranje).

## 1.20. KLINIČKI FENOTIPOVI

Ne postoji jedinstvena klasifikacija bolesti. Podjela, osim na ekstrinzički i intrinzički oblik, može biti prema kliničkoj slici, dobi, dobi pojave i težini kliničke slike (1). Različiti imunološki mehanizmi mogu biti uključeni u etiopatogenezu bolesti. AD se klasično može podijeliti u dva oblika bolesti, ekstrinzički (IgE-posredovan, alergijski oblik, eAD) i intrinzički (nealergijski, iAD). eAD je daleko

češći oblik i nalazimo ga u 80 % bolesnika. Dok oba oblika bolesti pokazuju slični klinički fenotip, samo eAD pokazuje povezanost s tzv. alergijskim odgovorom (156, 157). Bolesnici s eAD-om pokazuju visoke vrijednosti ukupnog IgE i prisustvo specifičnih IgE usmjerenih prema okolišnim ili nutritivnim alergenima, dok bolesnici s iAD-om imaju normalne vrijednosti ukupnog IgE i odsustvo alergen-specifičnih protutijela. Danas se smatra da je LOF *FLG* glavni faktor rizika za razvitak eAD-a. Bolesnici ovog tipa karakteristično imaju rani nastup bolesti, teže oblike bolesti, udruženost s atopijom, prisutnost bolesti u odrasloj dobi i veći stupanj razvika komplikacija u kasnoj životnoj dobi. Oblik iAD češće ima kasniji početak bolesti. Ipak, strogo razlikovanje ova dva oblika je ponekad više akademske prirode i preklapanja nisu neuobičajna, budući da jedan oblik može prijeći u drugi. Oblik iAD s vremenom može prijeći u eAD, što se tumači činjenicom da oštećena barijera olakšava prodor alergena i olakšava senzibilizaciju na okolišne alergene. Također, opisan je trend pada ukupnih vrijednosti IgE ovisno o dobi, što se može povezati s klinički opaženim padom učestalosti alergijskih bolesti u odrasloj dobi. Periferna eozinofilija može biti prisutna u oba oblika bolesti. Dio autora smatra da je iAD onaj koji se javlja kod bolesnika kod kojih je senzibilizacija posredovana primarno staničnim, a ne IgE-posredovanim odgovorom (156,157).

Klinička slika AD-a se razlikuje ovisno o dobi bolesnika (1, 7). Klasifikacija prema dobi je klasifikacija prema prirodnom tijeku bolesti, te razlikujemo infantilni AD, AD dječje dobi, adolescentni/AD odrasle dobi i AD starije dobne grupe (1). Intenzivan svbež je karakterističan simptom u svim dobnim grupama.

Infantilni AD (dob 3 mjeseca do 2 godine) čini 60-80 % svih bolesnika (1). Prve kožne promjene se javljaju nakon drugog mjeseca života, tipično zahvaćaju obraze i prezentiraju se edematoznim papulama i papulovezikulama koje mogu konfluirati u plakove koji vlaže i prekriveni su krustama (1). Osim obraza može biti zahvaćeno vlasište, vrat, ekstenzorne strane ekstremiteta i trup, uz poštedu pelenske regije. Oko 60 % bolesnika s ovim oblikom bolesti ulazi u remisiju bolesti prije druge godine života, dok 40 % ima bolest kroz dulji period i predstavlja najrizičniju grupu za razvitak atopijskog marša.

AD dječje dobi (2 do 12 godina) je karakteriziran kroničnim lezijama uz lihenifikaciju, iako mogu biti prisutne i akutne lezije. Predilekcijska mjesta su poplitealna, antekubitalna jama (fleksuralni ekcemi) kao i periorficijalna područja glave (1). Na rukama i zapešćima vrlo često opažamo numularne plakove s vlaženjem i krustama, što odgovara numularnom obliku bolesti. Suhoća kože je izraženija (1).

AD adolescenata i odrasle dobi (12 do 60 godina) se prezentira lezijama na tipičnim lokacijama kao što su glava, vrat i fleksuralna područja. Također se može očitovati kao kronični dermatitis ruku, a kod bolesnika periorbitalnim promjenama. Bolesnici s dugotrajnim oblikom bolesti mogu razviti i kliničku sliku eritrodermije.

AD treće životne dobi (dob > 60 godina) se smatra podcijenjenim oblikom bolesti. Radi se o obliku bolesti koji je karakteriziran pojavom opsežnih ekcematoidnih lezija, sve do kliničke slike eritrodermije sa snažnim osjećajem svrbeža. Najčešće se dijagnoza postavlja isključenjem drugih dermatoloških dijagnoza, kao što su diseminirani alergijski kontaktni dermatitis i primarni kožni oblik T-staničnog limfoma (1).

Ukoliko analiziramo dob prve pojave bolesti, tada razlikujemo 6 grupa (1). Grupa vrlo rane pojave bolesti (3 mjeseca - 2 godine), grupa rane pojave (2-6 godina), grupa pojave u dječjoj dobi (6-12 godina), grupa pojave u adolescentnoj dobi (14-18 godina) i grupa pojave u odrasloj dobi (20-60 godina).

Danas je poznato da oblik bolesti koji se javlja nakon kasne dječje dobi nije vezan uz mutacije *FLG-a* (63, 158). U grupi vrlo kasne pojave bolesti razlikujemo grupu onih koji su imali AD ranije u životu (najčešće u dječjoj dobi), a potom je uslijedio dugi period remisije i ponovna pojava bolesti u odrasloj dobi, i grupu bolesnika kod koje se AD po prvi puta javlja u ovoj životnoj dobi. Često se radi o teškim oblicima bolesti uz visoke vrijednosti ukupnog IgE (1).

AD se može prezentirati spektrom od blagih promjena do izrazito teške kliničke slike. U procjeni težine kliničke slike najčešće se koristi dvije ljestvice, SCORAD „*Severity scoring of atopic dermatitis* (SCORAD) ili „*Eczema Area and Severity*

*Index Scores*“ (EASI) (1, 159, 160). Težina bolesti je trenutno jedini kriterij prema kojem se bolesniku propisuje terapija. Nažalost svi sustavi stupnjevanja bolesti podliježu subjektivnosti ispitivača, te postoji potreba za definicijom objektivnih, mjerljivijih parametara/ biomarkera težine bolesti.

## **1.21. ENDOTIPOVI BOLESTI I VAŽNOST BIOMARKERA U STRATIFIKACIJI BOLESTI**

Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji biomarkeri su „bilo koja tvar, struktura ili proces koja može biti mjerena u tijelu a koja utječe ili predviđa incidenciju ili ishod bolesti“ (1). Prema definiciji *National Institutes of Health Biomarker Definition Working Group*, biomarker je karakteristika koja se objektivno mjeri i evaluira kao indikator normalnog biološkog procesa, patogenog procesa ili farmakološkog odgovora na terapijsku intervenciju, stoga svaka mjerljiva karakteristika koja ima dijagnostičku, prognostičku ili prediktivnu vrijednost se može smatrati biomarkerom (1). Endotip se definira kao mjerljiva komponenta nevidljiva golim okom unutar etiopatološkog puta između bolesti i genotipa, stoga se endotip sastoji od kolekcije biomarkera između kliničkog fenotipa i genotipa (1). Naime, danas se smatra da su fenotip, biomarkeri i endotipovi osnovni instrumenti koji nam omogućuju podjelu visoko etiološki složenih poremećaja, kao što je i AD, u podgrupe, prema čemu je moguće precizno odrediti prevenciju i razvijati terapijske strategije (1). Ovaj princip se već naveliko koristi u području moderne onkologije koja danas na tome bazira svoje terapijske pristupe (1). Danas još nisu jasno definirani endotipovi za AD, ali postoje kandidatni biomarkeri. AD je heterogena bolest i trenutna klasifikacija AD-a nije dovoljno precizna i ne omogućava predviđanje terapijskog odgovora kod primjene pojedinih bioloških lijekova. Određivanje endotipova i biomarkera je od iznimne važnosti za razvoj terapijskih opcija budući da zadnjih desetljeća nije bilo osobitog napretka u terapiji, sve do pojave dupilumaba kao terapijske opcije(89). Pravovremena i učinkovita terapija AD-a je od velike važnosti iz više razloga, ponajprije zbog snažnog utjecaja na kvalitetu života bolesnika i obitelji,



ekonomsko-socijalnih razloga, udruženosti s komorbiditetima i činjenice da 1/5 opće populacije je zahvaćena bolešću što predstavlja veliki teret svakom zdravstvenom sustavu (5). Prema trenutnim europskim smjernicama za liječenje, terapijski pristup bolesniku mora biti individualno prilagođen uzimajući u obzir specifičnosti bolesti pojedinca te se strogo pridržavanje standardiziranim terapijskim shemama ne savjetuje (161, 162). Odluka o uvođenju terapije bazira se na vrijednostima SCORAD/EASI i odgovoru na dosadašnju terapiju. Napomenimo da SCORAD predstavlja mjerenje težine bolesti na dan kontrole, uključuje subjektivni dojam bolesnika, te može varirati ovisno o ispitivaču, stoga se savjetuje da procjenu SCORAD-a uvijek radi isti liječnik. U nedostatku objektivnih parametara, SCORAD je trenutno jedini kriterij prema kojem se određuje terapija, te se većina istraživačkih napora danas polaže na određivanje objektivnih pokazatelja težine bolesti, odnosno određivanju biomarkera bolesti (159).

**Tablica 2.** Potencijalni biomarkeri kod atopijskog biomarkera, prema radu Bieber T *i sur.* Allergy 2012; 67:969–75.

<b>GRUPA BIOMARKERA</b>	<b>POTENCIJAL UPOTREBE</b>	<b>BIOMARKERI</b>
<b>Dijagnostički biomarkeri</b>	Potvrda entiteta	IgE, FcERI=DC
<b>Biomarkeri težine bolesti</b>	Implementacija kliničkog stupnjevanja bolesti na endotipskom stupnju	CCL17/TARC CCL26/Eotaxin-3 IL/16 CCL22/MDC IL-31 sCD-30 NaPCA, UcA ECP IgE TSLP
<b>Prognostički biomarkeri</b>	Stratifikacija unutar kliničkog fenotipa koja sugerira progresiju bolesti	FLG IgE
<b>Prediktivni biomarkeri</b>	Stratifikacija odgovora na primjenjenu terapiju	Nije određeno dosad
<b>Farmaceutski dinamički biomarkeri</b>	Stratifikacija metabolizma i procjena rizika razvijanja nuspojava	Nije određeno dosad

Sve ovo upućuje na činjenicu da je AD izrazito klinički heterogeni poremećaj, s različitim kliničkim slikama ovisno o životnoj dobi bolesnika, uz činjenicu da postoje mnogobrojni dijagnostički kriteriji, kao i kriteriji za procjenu težine bolesti koji su vrlo subjektivni i ovise o procjenama ispitivača, s vrlo oskudnim terapijskim opcijama u najtežoj grupi bolesnika koja predstavlja veliki socioekonomski problem svakog zdravstvenog sustava. Bolest značajno oštećuje kvalitetu života bolesnika i udružena je s drugim ozbiljnim komorbiditetima. Stoga, određivanje biomarkera, odnosno panel markera koji bi dijagnostički, prognostički i u terapijskom smislu bolje rasvijetlili ovu bolest predstavlja izuzetno važan zadatak.

## **2. HIPOTEZA**

Prisustvo mutacije filagrinskog gena, količina degradacijskih produkata filagrina, lipidni sadržaj, kolonizacija kože sa SA, vrijednost pH i TEWL-a bitni su biomarkeri kožne barijere čiji je poremećaji najznačajniji etiološki faktor za razvitak atopijskog dermatitisa.

### 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

#### OPĆI CILJ

Opći cilj ovog istraživanja je odrediti važnost različitih biomarkera epidermalne barijere kod bolesnika s atopijskim dermatitisom i njihovu povezanost s kliničkim karakteristikama i *FLG* genotipom.

#### SPECIFIČNI CILJEVI:

1. odrediti prisustvo, učestalost i tip mutacije *FLG* u bolesnika s atopijskim dermatitisom
2. odrediti sadržaj NMF-a, evaluirati pH i TEWL kože kao parametre funkcionalnosti barijere
3. usporediti bolesnike s alergijskim (ekstrinzičkim) i nealergijskim (intrinzičkim) tipom atopijskog dermatitisa
4. korelirati mutacije filagrinskog gena i poremećaje ostalih biomarkera barijere s fenotipom bolesnika
5. na temelju rezultata definirati najvažnije biomarkere atopijskog dermatitisa

Glavna svrha ovog istraživanja je ispitati odnos između filagrinskih mutacija, funkcijskih i kliničkih parametara te sastava NMF-a i lipida u *stratum corneum-u* kao mogućih biomarkera atopijskog dermatitisa.

## **4. ISPITANICI I METODE**

### **4.1. ISPITANICI**

U studijsku populaciju uključeno je ukupno 150 ispitanika, od čega 100 odraslih bolesnika s AD-om i 50 zdravih ispitanika. Bolesnici su uključivani u razdoblje od siječnja 2016. do srpnja 2017. godine.

Uključni kriteriji su bili postavljena dijagnoza AD-a od strane dermatologa, minimalno trajanje bolesti 3 godine i životna dob iznad 16 godina. Dijagnoza AD-a je morala biti potvrđena od strane dermatologa, kako bi se isključile druge dermatoze koje se ubrajaju u diferencijalnu dijagnozu AD-a. Bolesnici su prije samog uzorkovanja morali biti minimalno tjedan dana bez neutralne terapije (emolijensa), lokalnog kortikosteroida i lokalnog imunomodulatora. Bolesnici koji su bili u tijeku liječenja fototerapijom, sustavnom kortikosteroidnom terapijom, ciklosporinom, metotreksatom ili biološkom terapijom nisu uključivani, a minimalno vremensko razdoblje od prethodne fototerapije ili sustavne terapije do uključivanja u studiju je bilo mjesec dana.

Kontrolna grupa studijskih ispitanika sastojala se od 50 zdravih pojedinaca koji nisu imali osobnu anamnezu AD-a ili drugih atopijskih bolesti i nisu bolovali od drugih upalnih dermatoloških ili težih sustavnih bolesti. Dobna grupa za kontrolnu grupu je definirana na isti način kao i za bolesnike, te su uključivani ispitanici stariji od 16 godina. Ispitanicima u kontrolnoj grupi data je uputa da ne koriste emolijense u njezi kože tjedan dana prije ispitivanja. Svi ispitanici iz kontrolne grupe podvrgnuti su kliničkom pregledu dermatologa, kako bi se osiguralo da ispitanici nemaju blažu, neprepoznatu kliničku sliku AD-a, dodatno je uzeta detaljna anamneza o eventualnim podacima o ekcemima u dojenačkoj dobi.

### **4.2. ETIČKA NAČELA**

Ispitivanje je provedeno u skladu sa Helsinškom deklaracijom (163) i odobreno je od strane Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Zagreb i

Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Prije uključivanja u studiju svi su ispitanici potpisali informirani pristanak.

### 4.3. KLINIČKA PROCJENA BOLESNIKA

Dijagnoza AD-a je postavljena prema Hanifin i Rajka i UK working party kriterijima (154, 155). Dijagnoza bolesti, klinička procjena, procjena težine bolesti kao i liječenje svih bolesnika provedeno je od strane jednog dermatologa. Zabilježena je dob pojave AD-a, pojavnost alergijske astme, alergijskog rinitisa i konjunktivitisa. Osim kliničkih kriterija u dijagnostici bolesti, učinjena je i dodatna dijagnostička obrada (krvna slika, ukupni i specifični IgE u serumu, kožno alergološko testiranje), koja predstavlja zlatni standard obrade i praćenja bolesnika s AD-om.

**Tablica 3.** Način bodovanja težine bolesti (SCORAD), prema Severity scoring of atopic dermatitis: the SCORAD index. Consensus Report of the European Task Force on Atopic Dermatitis. Dermatology 1993;186:23-31.

A. STUPANJ ZAHVAĆENOSTI Navedi zahvaćenu površinu		SCORAD = A/5+7B/2+C	
B. INTENZITET			
C. SUBJEKTIVNI SIMPTOMI SVRBEŽ+GUBITAK SNA			
KRITERIJ	INTENZITET		NAČIN RAČUNANJA
Eritem			0 = ODSUTNOST
Edem/papule			1 = BLAGO
Vlaženje/kruste			2 = UMJERENO
Ekskorijacije			3 = TEŠKO
Suhoća* *procjenjuje se na nelezionalnoj koži			
VIZUALNA ANALOGNA SKALA Uključuje zadnja 3 dana i noći	SVRBEŽ Minimalno 1-2-3-4-5-6-7-8-9-10 Maksimalno		
	GUBITAK SNA Minimalno 1-2-3-4-5-6-7-8-9-10 Maksimalno		

Za procjenu težine bolesti korištena je SCORAD ljestvica. Procjena težine bolesti provedena je prilikom dermatološkog pregleda. Bolesnici koji su imali manje od 15 bodova prema SCORAD ljestvici okarakterizirani su kao grupa bolesnika s blagim oblikom bolesti. Bolesnici koji su imali 15 do 40 bodova okarakterizirani su kao grupa s umjerenim oblikom bolesti, dok su bolesnici s više od 40 bodova okarakterizirani kao grupa s teškim oblikom bolesti (159).

Mjerenja i izuzimanje uzoraka za analizu provedena su na klinički zahvaćenoj (lezionalnoj) i klinički nepromijenjenoj (nelezionalnoj) koži, a ukoliko je bolesnik bio u remisiji, mjerenja i izuzimanje uzoraka provedena su na klinički nepromijenjenoj koži.

#### **4.4. LABORATORIJSKA I DIJAGNOSTIČKA OBRADA BOLESNIKA**

Za što bolju karakterizaciju bolesti, usmjerenu prvenstveno prema jasnom razlikovanju ekstrinzičnog i intrinzičnog oblika bolesti, evaluacija kliničke slike je dopunjena dijagnostičkom obradom. Od bolesnika su zatraženi na uvid podaci o prethodno učinjenoj laboratorijskoj obradi ili je dana preporuka da se učine sljedeće laboratorijske pretrage: kompletna i diferencijalna krvna slika, vrijednosti ukupnog i specifičnog IgE na inhalacijske alergene, ubodno testiranje na inhalacijske i nutritivne alergene i epikutani test na standardnu seriju alergena. Ukoliko bolesnik nije ulazio u remisiju zbog prirode bolesti, alergološko testiranje nije učinjeno zbog nemogućnosti provođenja testiranja na koži zahvaćenoj ekcemom te zbog utjecaja lokalne ili sistemske terapije.

#### **4.5. KVANTITATIVNA KULTURA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* IZ BRISEVA KOŽE**

Uzorci su uzimani brisom ovlaženim u fiziološkoj otopini u Klinici za dermatovenerologiju i istog dana dostavljani na obradu u Klinički zavod za kliničku i molekularnu mikrobiologiju KBC Zagreb. Za svakog ispitanika označene su 3 ploče krvnog agara. Nakon što je bris stavljen je u 5 mL Ringerove otopine

i vorteksiran, bris je bačen, a na svaku od 3 ploče krvnog agara pipetom je kapnuto 1  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$  i 100  $\mu\text{L}$  Ringerove otopine. Plastičnom ezom ploče su razmazane u 3 smjera, na svakoj je obilježeno razrjeđenje i stavljene su u termostat do drugog dana. Ploče su se očitavale nakon 24, odnosno 48 sati. Sumnjive kolonije identificirane su klasičnom metodom (preparat, pozitivan DNA test) i MALDI-TOF metodom (bakterijska identifikacija masenom spektrometrijom). Kolonije su brojane na onoj ploči krvnog agara na kojoj se mogao izbrojati točan broj kolonija, a zatim se ukupan broj kolonija u brisu računao na slijedeći način: broj kolonija (npr. 7) x 5 (otopina za homogenizaciju) x  $10^3$  (razrjeđenje na krvnom agaru) =  $35 \cdot 10^3$ , odnosno  $3,5 \cdot 10^4$  CFU/brisu (164).

#### **4.6. MJERENJA TRANSEPIDERMALNOG GUBITKA VODE (TEWL) i pH**

Mjerenja transepidermalnog gubitka vode (eng. *trans-epidermal water loss*, TEWL) i pH provedena su pri standardiziranim uvjetima (uvijek u istoj prostoriji, kod temperature prostorije od 22-25 °C i relativnoj vlažnosti 30-33 %) na klinički zahvaćenoj (lezionalnoj), klinički nepromijenjenoj koži (nelezionalnoj) koži kod bolesnika s AD-om, odnosno zdravoj koži kod zdravih ispitanika. Ispitanici su prije samog mjerenja bili aklimatizirani u vremenskom razdoblju od najmanje 10 minuta. Odabir lokalizacija na kojima su izvršena mjerenja ovisio je o prisustvu lezija kod pojedinog bolesnika. Kod zdravih ispitanika mjerenja su provedena na zdravoj koži podlaktice desne ruke. Za mjerenje TEWL-a i pH vrijednosti korišten je Tewameter 300 (Courage + Khazaka electronic GmbH, Köln, Njemačka).

#### **4.7. FLG GENOTIPIZACIJA**

Svim ispitanicima uzet je bukalni bris (Isohelix Swab Pack, UK) u kojem su zatim određene tri mutacije na genu za filagrin s najučestalijom pojavnosti u europskoj populaciji i to: R501X, 2282del4, R2447X. Određivanje prisutnosti mutacija u stanicama bukalnih briseva potpunosti je provedeno prema postupku detaljno opisanom u radu Sandilands *i sur.* (165).



#### 4.8. UZORKOVANJE KOŽE

Rožnati sloj je uzorkovan komercijalno dostupnim adhezivnim vrpčama (3,8 cm<sup>2</sup>, D-Squame; Monaderm, Monako, Francuska). Adhezivne vrpce bile su pritisnute na površinu kože uređajem za kontrolu pritiska (225 g cm<sup>-2</sup>, CuDerm, Dallas, TX, SAD) u trajanju od 10 sekundi radi smanjenja varijacije količine izuzetog rožnatog sloja. Ukupno je izuzeto 8 uzastopnih adhezivnih vrpki s istog mjesta, a prve dvije vrpce su odbačene zbog moguće kontaminacije na samoj površini kože. Uzorci kože izuzeti su s lokacije klinički zahvaćene (lezionalne) i klinički nezahvaćene kože kod bolesnika (nelezionalne), odnosno na podlaktici zdravih ispitanika. Adhezivne vrpce pohranjene su individualno u mikroepruvetama od 2 mL (Sarstedt, Etten-leur, Nizozemska) na -80 °C na način da je površina vrpce koja je obložena adhezivnim ljepljivom okrenuta prema unutrašnjosti do provođenja analiza.



**Slika 3.** Uzorkovanje *stratum corneum*-a adhezivnim vrpčama s lezionalne (L) i nelezionalne kože (NL).

#### 4.9. ODREĐIVANJE KOMPONENATA PRIRODNOG OVLAŽIVAČA KOŽE

Za određivanje razine prirodnog ovlaživača kože, provedena je analiza produkata razgradnje proteina filagrina i to, histidina, piroglutaminske kiseline te *trans*- i

*cis*-izomera urokanske kiseline primjenom tekućinske kromatografije u sprezi s detektorom s nizom dioda. Za analizu je uzeta peta uzastopna vrpca. Modificirani postupak ekstrakcije komponenata NMF-a iz rožnatog sloja izuzetog adhezivnom vrpcom proveden je dodatkom 600  $\mu$ L ultra čiste vode i snažnim miješanjem (IKA vibrax-VXR Model 2200, IKA-works Inc., Wilmington, NC, SAD) tijekom 30 minuta prema metodi detaljno opisanoj u radu Dapic *i sur.* (166). S obzirom na činjenicu da količina SC izuzeta adhezivnim vrpcama varira, koncentracija komponenata NMF-a u SC izuzetom svakom adhezivnom vrpcom normalizirana je za ukupnu količinu proteina određenu u pojedinom uzorku. Ekstrakcija proteina vodom također nije potpuna, pa je u tu svrhu provedena i dodatna ekstrakcija s vodenom otopinom jake baze, natrijevim hidroksidom. Ukupna količina proteina u oba ekstrakta određena je pomoću Pierce Micro BSA eseja (Thermo Fischer Scientific, Rockford, IL, SAD) Razina NMF-a u rožnatom sloju kože izražena je u jedinicama mmol NMF-a/g proteina.

#### **4.10. ODREĐIVANJE RAZINE CITOKINA**

Razina citokina određena je u rožnatom sloju izuzetom osmom adhezivnom vrpcom. Za ekstrakciju citokina svakom individualnom uzorku dodano je 1,2 mL fosfatnog pufera koji je sadržavao 0,005 % Tween 20 (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Nizozemska). Ekstrakcija citokina i topljivih proteina provedena je uz pomoć ultrazvučnih valova (Salm & Kipp, Breukelen, Nizozemska) u ledenoj vodi kroz 15 minuta. Razina ukupno 21 citokina izmjerena je na unaprijed konfiguriranim, komercijalno dostupnim multi-plex pločama (U-Plex assays, MSD, Rockville, MA, SAD) na instrumentu MESO QuickPlex SQ 120 (MSD, Rockville, MA, SAD) slijedeći upute proizvođača. Citokini su određeni u izvornim ekstraktima bez razrjeđenja i to: CCL11 (Eotaxin), CCL26 (Eotaxin-3), CXCL8 (IL-8(HA)), CXCL10 (IP-10), CCL2 (MCP-1), CCL13 (MCP-4), CCL22 (MDC), CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CCL4 (MIP-1 $\beta$ ), CCL17 (TARC), IL-18, IL-17A, IL-1 $\beta$ , CCL20 (MIP-3  $\alpha$ ), IL-31, TLSP, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27, IL-33. Isto kao i slučaju određivanja NMF-a, koncentracija citokina u rožnatom sloju normalizirana je za

ukupnu količinu topljivih proteina pojedinom uzorku. Koncentracija topljivih proteina određena je pomoću Pierce Micro BSA eseja (Thermo Fischer Scientific, Rockford, IL, SAD), a konačna razina citokina izražena je u jedinicama pg citokina/ $\mu$ g proteina.

Za statističku analizu podataka koncentracije citokina ispod granice detekcije (ali unutar raspona kalibracijske krivulje) ili iznad granice određivanja korištene su kao nepromijenjene vrijednosti. U svrhu očuvanja koncentracijskog poretka, citokinima čija je koncentracija bila ispod donjeg dijela kalibracijske krivulje (bez dodijeljene vrijednosti koncentracije) dodijeljena je vrijednost koncentracije jednaka polovici vrijednosti najniže koncentracije za pojedini citokin u uzorcima. Granica detekcije za svaki pojedini citokin izračunata je primjenom softvera Discovery Workbench 4.0 software (MSD, Rockville, MA, SAD) kao 2,5 standardne devijacije iznad pozadinskog signala. Budući da su koncentracije citokina IL-22, IL-23 i IL-31 imali veliki broj vrijednosti ispod granice detekcije ili ispod donjeg dijela kalibracijske krivulje (> 30 %), isključeni su iz daljnje analize.

#### **4.11. ODREĐIVANJE CERAMIDA**

Određivanje pojedinih klasa ceramida, odnosno sfingoidnih baza provedeno je samo na dijelu studijske populacije, i to 25 bolesnika i 23 zdravih ispitanika. Istraživane lipidne skupine uključivale su slobodne sfingoidne baze sfingozin (d18:1) i sfinganin (d18:0), ceramide koji su sintetizirani iz te dvije sfingoidne baze (Cer (d18:0) i Cer (d18:1)), glukozil-ceramid (GlcCer (d18:1)) i glukozil-kolesterol. Ceramidi su mjereni kao slobodne sfingoidne baze nakon termičkog uklanjanja lanaca masnih kiselina. Određivanje je provedeno prema metodi detaljno opisanoj u radu Gold *i sur.* (167) a koja se temelji na tekućinskoj kromatografiji u sprezi s tandemskom spektrometrijom masa. Koncentracija ceramida i sfingoidnih baza u SC normalizirana je za ukupnu količinu proteina u pojedinom uzorku. Koncentracija proteina određena je pomoću Pierce Micro BSA eseja (Thermo Fischer Scientific, Rockford, IL, SAD), a konačna razina ceramida i sfingoidnih baza izražena je u jedinicama pg/ $\mu$ g proteina (167).

#### 4.12. STATISTIČKA ANALIZA

Statistička analiza provedena je u programima Prism 7 (GraphPad, La Jolla, CA, SAD) i SPSS 23 (IBM, Armonk, NY, SAD). Raspodjela podataka testirana je primjenom Shapiro-Wilksovog testa. Za određivanje razlike u razini NMF-a, pH, TEWL-a, citokina, ceramida i sfingoidnih baza između zdravih ispitanika i bolesnika s AD-om korišten je dvostrani Studentov *t*-test ili dvostrani Mann-Whitney test u slučaju asimetrične raspodjele podataka. Razlike između lezionalne i klinički zdrave kože kod bolesnika testirane su primjenom dvostranog parnog *t*-testa ili dvostranog Wilcoxonovog testa u slučaju asimetrične raspodjele podataka. Povezanost između kliničke težine bolesti (SCORAD-a), NMF-a i TEWL-a i razine citokina, ceramida i sfingoidnih baza kod bolesnika i zdravih ispitanika ispitana je primjenom dvostranog Spearmanovog neparametrijskog testa. Povezanost između težine bolesti, SCORAD-a (nezavisna varijabla) i većeg broja biomarkera (ovisne varijable) testirana je primjenom višestruke linearne regresije metodom isključivanja prema unatrag. Vrijednost razine statističke značajnosti (*P*) postavljena je na  $P < 0,05$ , a za višestruku korekciju *P*-vrijednosti korištena je Benjamini-Hochbergova korekcija višestrukih testiranja, osim u slučaju višestruke linearne regresije (168).

## 5. REZULTATI

### 5.1 KLINIČKA I DEMOGRAFSKA OBILJEŽJA POPULACIJE

Klinička i demografska obilježja izučavane populacije su prikazana u Tablici 4. Od ukupno 100 bolesnika uključenih u studiju, 31 su bili muškarci, a 69 žene. Raspon dobi bolesnika je bio od 17 do 43 godine, u kontrolnoj skupini od 29 do 45 godina. Srednja dob bolesnika je iznosila 25 godina, kontrolne skupine 32 godine.

Prema dobi pojave bolesti bolesnici su podijeljeni u sljedeće grupe: vrlo rana pojava (0-3 godine), rana pojava (3-5 godina), pojava u djetinjstvu (5-18 godina), odrasla dob (18-40 godina) i grupa kasne pojave (> 40 godina). Većina bolesnika je imala pojavu bolesti nakon 3. mjeseca života. U grupi vrlo ranog nastupa bolesti nađeno je 72 % bolesnika, u grupi ranog nastupa 9 % bolesnika, grupi nastupa u djetinjstvu 15 % bolesnika i u grupi nastupa u odrasloj dobi 4 % bolesnika. U ispitivanoj populaciji nije bilo bolesnika s kasnom pojavom bolesti (Tablica 4).

Procjena težine bolesti učinjena je od strane jednog dermatologa, te je korišten SCORAD. Prema vrijednostima SCORAD-a bolesnici su podijeljeni u 3 grupe: blagi oblik AD-a (< 15 bodova), srednje teški oblik AD (16-40 bodova), teški oblik AD-a (> 40 bodova). U našoj ispitivanoj populaciji blagu bolest je imalo 10 % bolesnika, 40 % bolesnika srednje teški oblik AD-a, a teški oblik AD-a 50 % bolesnika. Raspon vrijednosti za SCORAD je iznosio 0-87,3, a srednja vrijednost SCORAD-a 40,17 (Tablica 4).

Udružene alergijske bolesti AA, AR, AC su određivane na temelju upitnika, prethodno učinjenih dijagnostičkih laboratorijskih pretraga i alergološkog testiranja (Tablica 5).

**Tablica 4.** Demografska obilježja ispitivane populacije

	<b>Bolesnici s AD-om</b>	<b>Kontrolna skupina</b>
<b>UKUPNI BROJ, <i>n</i></b>	100	50
<b>Spol</b>		
Ženski	69	27
Muški	31	23
<b>Dob (godine), srednja vrijednost i raspon vrijednosti</b>	25 (17 - 43)	32 (29 - 45)
<b>Dob pojave AD-a (godine)</b>		
Vrlo rana pojava (0 - 3)	72	-
Rana pojava (35)	9	-
Djetinjstvo (5 - 18)	15	-
Odrasla dob (18 - 40)	4	-
Kasna pojava (> 40)	0	-
<b>SCORAD, srednja vrijednost (raspon)</b>	40,17 (0 - 87,3)	-
Blagi AD (< 15 bodova), <i>n</i>	10	-
Umjereni AD (15 - 40 bodova), <i>n</i>	40	-
Teški AD (> 40 bodova), <i>n</i>	50	-

**Tablica 5.** Prikaz udruženih alergijskih bolesti, osobne i obiteljske atopijske dijateze

<b>UDRUŽENA ATOPIJSKA BOLEST</b>	<b>postotak</b>
Astma	36 %
Alergijski rinitis	51 %
Alergijski konjunktivitis	11 %
Osobna atopijska dijateza	71 %
Obiteljska atopijska dijateza (razmatrane sve atopijske bolesti zajedno)	66 %
Kontaktni alergijski dermatitis	35 %

Osobna atopijska dijateza je bila pozitivna u 71 % bolesnika. AA je imalo tijekom života ili i dalje ima u osobnoj anamnezi 36 % bolesnika, AR 51 % bolesnika i AC u 11 % bolesnika. Dio bolesnika je imao više od jedne atopijske bolesti. Najčešća udružena atopijska bolest je bio AR, a nakon toga AA.

Obiteljska atopijska dijateza za jednu ili više atopijskih bolesti (AD, AA, AR, AC) je bila pozitivna u 66 % bolesnika. U ovoj grupi bolesnici navode podatke o atopijskoj bolesti u obitelji: u 50 % slučajeva 1 bliski srodnik, 13 % ima 2 bliska srodnika, 4 % bolesnika ima 3 ili više bliskih srodnika pozitivno na atopijske bolesti (Tablica 5).

Dokazani kontaktni alergijski dermatitis je imalo 35 % bolesnika s AD-om, što je potvrđeno s pozitivnim epikutanim testom na standardnu seriju alergena. 23 % bolesnika je imalo negativan epikutani test u osnovnoj seriji, dok 42 % bolesnika nije imalo učinjen epikutani test, najčešće zbog prirode bolesti (kontinuirani ekcemi i nemogućnost provođenja testa).

Pozitivan ubodni test imalo je 65 % bolesnika, negativan test 16 % bolesnika, dok 19 bolesnika nije imalo učinjen test. Vrijednosti ukupnog IgE i specifičnog IgE su zatražene kod svakog bolesnika. Povišen ukupni IgE je imalo 36 % bolesnika. Povišen specifični IgE je imalo 31 % bolesnika.

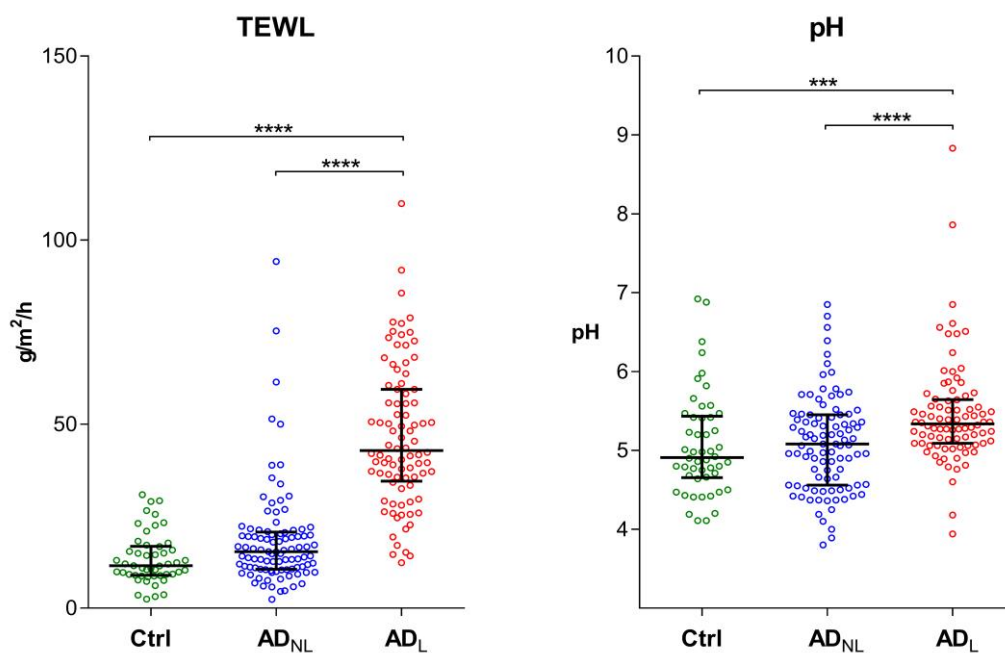
Ekstrinzički oblik bolesti je imalo 79 % bolesnika, intrinzički 21 % bolesnika. Nije bilo značajne razlike u SCORAD vrijednostima između grupa bolesnika sa intrinzičkim i ekstrinzičkim oblikom ( $P > 0.05$ ; dvosmjernan Mann-Whitney test).

Prema pojavnosti ekcema (pogoršanja bolesti) tijekom godine naša ispitivana populacija je u najvećem postotku imala bolest tijekom cijele godine. U remisiji bolesti je bilo 8 % bolesnika u tijeku uključivanja u istraživanje.

## **5.2 FUNKCIJA KOŽNE BARIJERE**

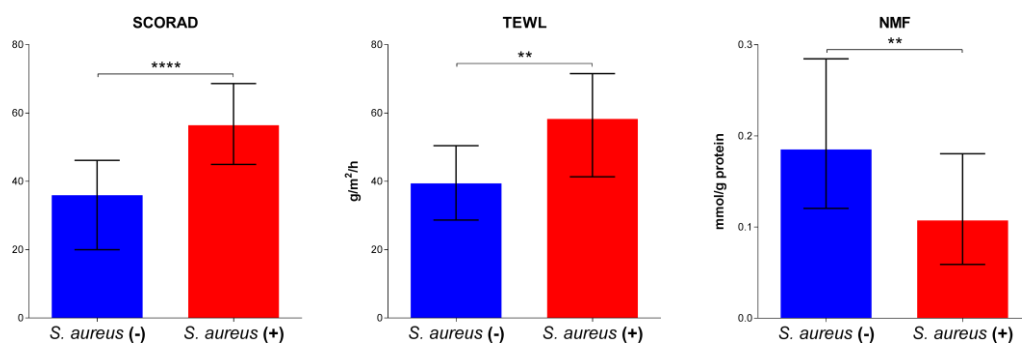
Funkcija kožne barijere određena je mjerenjem transepidermalnog gubitka vode (TEWL). Povišene vrijednosti TEWL-a ukazuju na oštećenje funkcije kožne barijere. Slika 4 pokazuje vrijednosti TEWL-a mjerene u lezionalnoj i nelezionalnoj koži i u zdravoj koži kontrolne skupine. U našoj izučavanoj populaciji TEWL je značajno povišen u koži bolesnika u usporedbi sa zdravom kožom, te je porast TEWL-a izraženiji u lezionalnoj koži. Isti obrazac se opaža kod pH vrijednosti mjerene na površini kože, te su vrijednosti pH značajno povišene kod bolesnika u usporedbi s pH zdrave kože (Slika 4). Nije bilo značajne razlike u funkciji kožne barijere (TEWL) i pH između bolesnika s iAD-om i eAD-om, bilo da je analizirana lezionalna ili nelezionalna koža.





**Slika 4.** Razine TEWL-a i pH vrijednosti u koži zdravih kontrola (Ctrl) te nelezionalnoj (AD<sub>NL</sub>) i lezionalnoj (AD<sub>L</sub>) koži bolesnika s AD-om. Razlike u razinama TEWL-a i pH vrijednosti koži zdravih kontrola te nelezionalnoj i lezionalnoj koži bolesnika određene su primjenom dvosmjernog Mann-Whitney testa. Prikazane *P*-vrijednosti (\*\*\*\**P* < 0,0001, \*\*\**P* < 0,001) korigirane su primjenom Benjamini-Hochbergove metode korekcije višestrukih testiranja. Vrijednosti su prikazane kao medijan i kvartile.

Povišena količina SA nađena je u lezionalnoj koži u 28 od 98 bolesnika (28 %) te u nelezionalnoj koži u 6 bolesnika (6 %). Kako bismo istražili moguće razlike u težini bolesti i funkciji kožne barijere u bolesnicima sa i bez prisutnosti SA uspoređene su vrijednosti SCORAD-a, TEWL-a i NMF-a za te dvije grupe, uzevši u obzir bolesnike kod kojih je SA bio prisutan bilo u nelezionalnoj ili lezionalnoj koži. Kao što je prikazano na Slici 5, bolesnici kod kojih je nađena povišena količina SA imaju oslabljenu kožnu barijeru, teži oblik bolesti i niže razine NMF-a.



**Slika 5.** Vrijednosti SCORAD-a te TEWL-a i NMF-a u lezionalnoj koži kod bolesnika s prisutnosti (*S. aureus* (+), n = 28) i bez prisutnosti (*S. aureus* (-), n = 70) *S. aureus*. Razlike u vrijednosti SCORAD-a i TEWL-a između dvije grupe bolesnika s AD-om određene su primjenom dvosmjernog *t*-testa, dok je za određivanje razlike u vrijednosti NMF-a korišten dvosmjerni Mann-Whitney test. Prikazane *P*-vrijednosti (\*\*\*\**P* < 0,0001, \*\**P* < 0,01) korigirane su primjenom Benjamini-Hochbergove metode korekcije višestrukih testiranja. Vrijednosti su prikazane kao medijan i kvartile.

### 5.3 UČESTALOST MUTACIJA FILAGRINSKOG GENA

Rezultati učestalosti izučavanih mutacija *FLG*-a su prikazani u Tablici 6. Kombinirana frekvencija u grupi bolesnika je iznosila 4 %, dok u kontrolnoj grupi nije pronađen niti jedan nositelj *FLG* mutacija. Najčešća *FLG* mutacija kod bolesnika u izučavanoj populaciji je 2282del4 (3 %), zatim R501X (1 %). Interesantno je da su svi bolesnici s otkrivenim mutacijama bili homozigoti za nađenu mutaciju. U našoj grupi ispitanika nije detektirana R2447X.

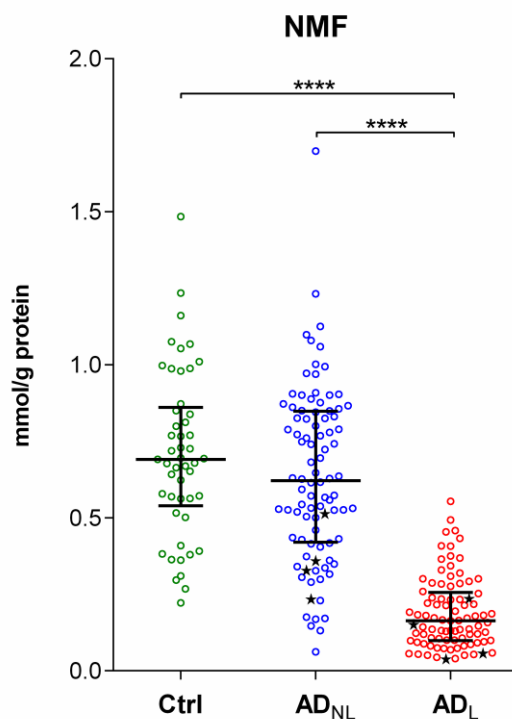
**Tablica 6.** Rezultati genotipizacije *FLG* mutacija kod bolesnika s AD-om i zdravih ispitanika.

	AD	Ctrl
2282del4	3/91 (3,2 %)	0
R501X	1/91 (1,1 %)	0
R2447X	0	0
<b>Kombinirana frekvencija mutacija</b>	<b>4,3 %</b>	<b>0</b>

## 5.4 BIOMARKERI U STRATUM CORNEUM-U

### 5.4.1 Degradacijski produkti filagrina

Vrijednosti NMF-a su pokazane u Slici 6. Najviše vrijednosti su nađene u zdravoj koži kontrolne skupine, dok su najviše snižene vrijednosti opažene u lezionalnoj koži bolesnika. Razlika između zdrave kože kontrolne skupine i lezionalne kože bolesnika je značajna. Nositelji *FLG* mutacija imaju niže srednje vrijednosti NMF-a u usporedbi s bolesnicima bez nul-mutacije (Slika 6). Nije bilo značajne razlike u vrijednostima NMF-a između bolesnika s iAD-om i eAD-om kako za lezionalnu ili nelezionalnu kožu.



**Slika 6.** Vrijednosti NMF-a u koži zdravih kontrola (Ctrl) te nelezionalnoj (AD<sub>NL</sub>) i lezionalnoj (AD<sub>L</sub>) koži bolesnika s AD-om. Bolesnici s AD-om koji su nositelji *FLG* mutacija označeni su crnim zvjezdicama. Razlike u razinama NMF-a u koži zdravih kontrola i nelezionalnoj i lezionalnoj koži bolesnika određene su primjenom dvosmjernog Mann-Whitney testa. Prikazane *P*-vrijednosti (\*\*\*\*  $P < 0,0001$ ) korigirane su primjenom Benjamini-Hochbergove metode korekcije višestrukih testiranja. Vrijednosti su prikazane kao medijan i kvartile.

## 5.4.2 Lipidi

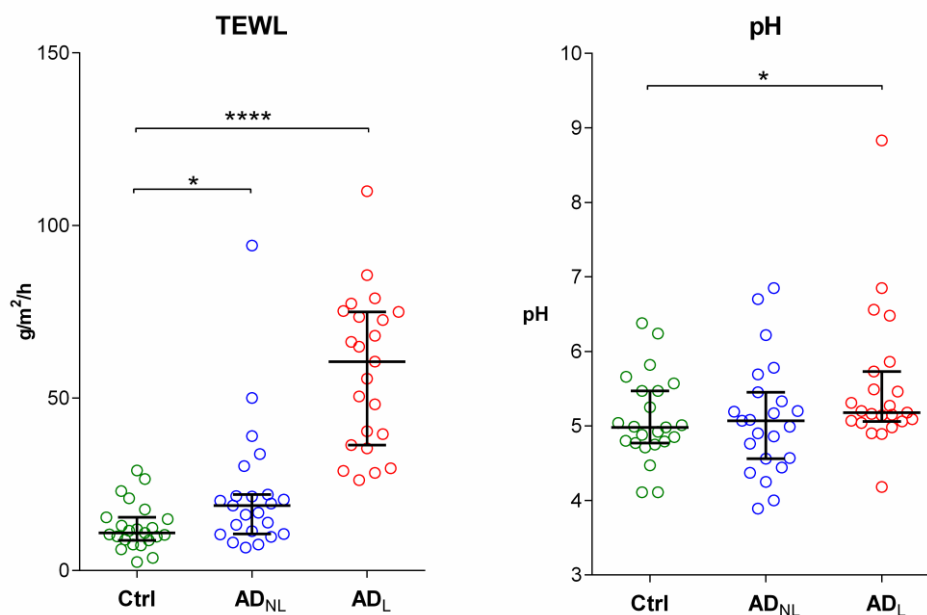
Za analizu pojedinih lipidnih klasa nisu uključeni svi bolesnici, već je učinjen odabir bolesnika. U analizu je uključeno 25 bolesnika i 23 zdrava ispitanika. Uključeni su bolesnici samo s umjereno teškim do teškim oblikom bolesti. Karakteristike ispitanika prikazane su u Tablici 7.

**Tablica 7.** Demografski i klinički podaci o ispitanicima

	<b>Bolesnici s AD-om</b>	<b>Zdravi ispitanici</b>
<b>Ukupni broj, <i>n</i></b>	25	23
<b>Spol</b>		
Ženski	19	15
Muški	6	8
<b>Dob (godine)*</b>	26 (17 - 43)	32 (23 - 45)
<b>SCORAD*</b>	55,77 (33,75 - 81,1)	-
Blagi (< 15 bodova), <i>n</i>	0	-
Umjereno teški (15 - 40 bodova), <i>n</i>	3 (12 %)	-
Teški (> 40 bodova), <i>n</i>	22 (88 %)	-
<b>FLG mutacija (n)</b>	3	0

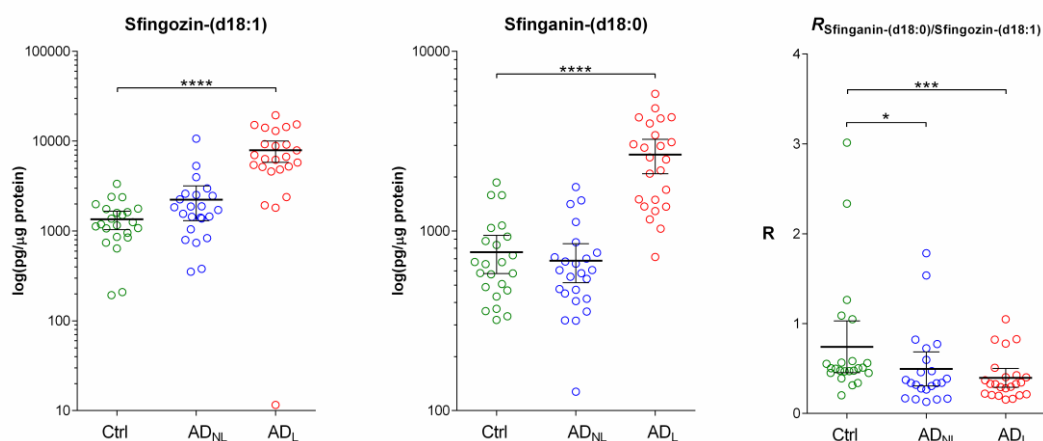
\* srednja vrijednost i raspon

Slika 7 pokazuje vrijednosti TEWL-a i pH mjerene na lezionalnoj, nelezionalnoj i zdravoj koži kontrolne skupine. Slično vrijednostima koje su nađene u cijeloj ispitivanoj populaciji, TEWL vrijednosti su više i u lezionalnoj i nelezionalnoj nego zdravoj koži, ali su vrijednosti bile izraženije u lezionalnoj koži. Sličan obrazac, ali manje izražen je opažen za pH vrijednosti (Slika 7).



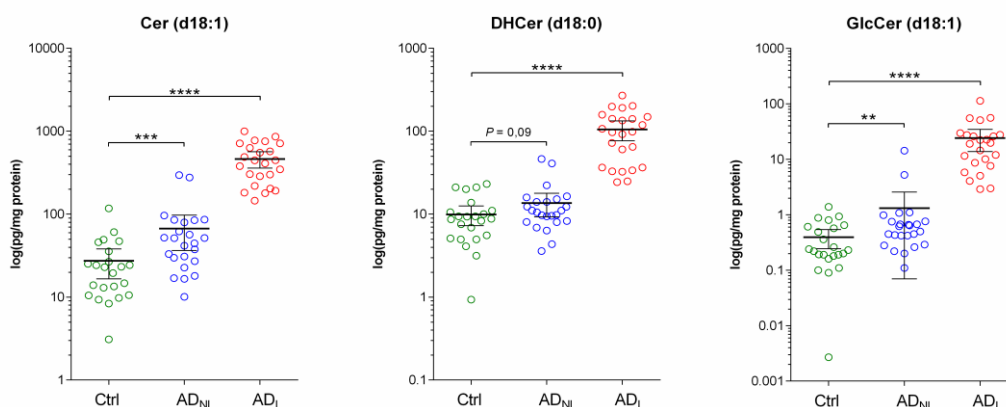
**Slika 7.** Razina TEWL-a i pH vrijednosti u koži zdravih kontrola (Ctrl) i nelezionalnoj (AD<sub>NL</sub>) i lezionalnoj (AD<sub>L</sub>) koži bolesnika s AD-om. Razlike u razinama TEWL-a i pH vrijednosti u koži zdravih kontrola te nelezionalnoj i lezionalnoj koži bolesnika određene su primjenom dvosmjernog Mann-Whitney testa. Prikazane *P*-vrijednosti (\*\*\*\**P* < 0,0001, \**P* < 0,05) korigirane su primjenom Benjamini-Hochbergove metode korekcije višestrukih testiranja. Vrijednosti su prikazane kao medijan i kvartile.

Istraživane lipidne skupine uključivale su slobodne sfingoidne baze sfingozin (d18:1) i sfinganin (d18:0), ceramide koji su sintetizirani iz te dvije sfingoidne baze (Cer (d18:1) i Cer (d18:0)), glukozil-ceramid (GlcCer 8d18:1)) i glukozil-kolesterol. Vrijednosti slobodnih sfingoidnih baza i njihov omjer prikazan je u Slici 8 za bolesnike i zdrave kontrole.



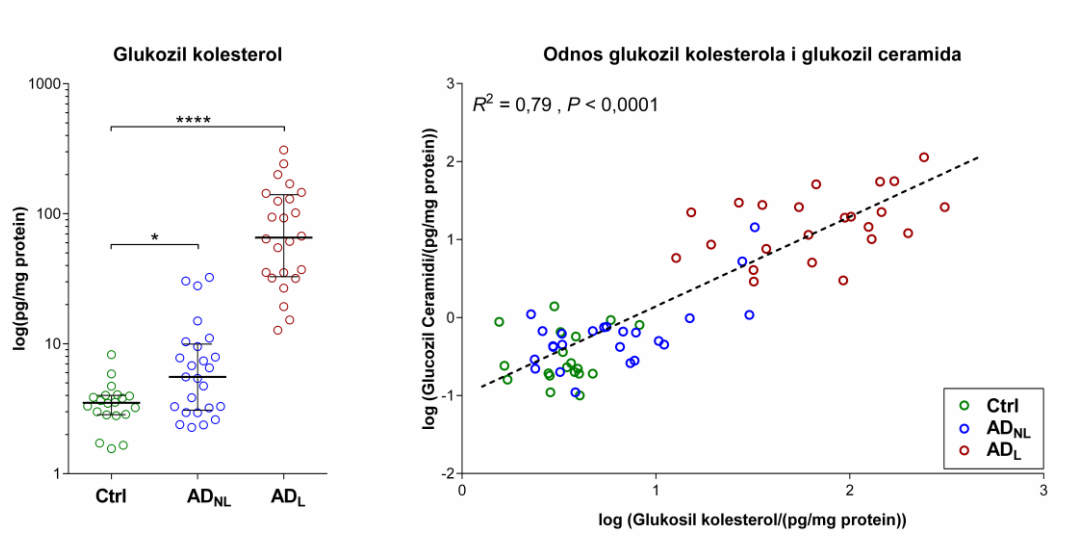
**Slika 8.** Vrijednosti slobodnih sfingoidnih baza sfingozina (sfingozin (d18:1)) i sfinganina (sfinganin (d18:0)), odnosno omjera sfinganina i sfingozina ( $R$ ) u koži zdravih kontrola (Ctrl) te nelezionalnoj (AD<sub>NL</sub>) i lezionalnoj (AD<sub>L</sub>) koži bolesnika s AD-om. Razlike u razinama slobodnih sfingoidnih u koži zdravih kontrola te nelezionalnoj i lezionalnoj koži bolesnika određene su primjenom dvosmjernog Mann-Whitney testa (\*\*\*\* $P < 0,0001$ , \* $P < 0,05$ ). Vrijednosti su prikazane kao medijan i kvartile.

U usporedbi sa zdravom kožom, vrijednosti slobodnih sfingoidnih baza (sfingozina i sfinganina) su povišene, ali samo u lezionalnoj koži (Slika 8). Odnos baza sfinganin/sfingozin pokazuje trend sniženja od zdrave, preko nelezionalne do lezionalne kože bolesnika gdje je sniženje najizraženije. Lezionalna kao i nelezionalna koža pokazuju smanjene vrijednosti navedenih parametara u usporedbi s zdravom kožom.



**Slika 9.** Vrijednosti sfingozin- i sfinganin-baziranih ceramida, (Cer (d18:1) i Cer (d18:1)), te glikozil-ceramida (GlcCer (d18:1)) u koži zdravih kontrola (Ctrl) te nelezionalnoj (AD<sub>NL</sub>) i lezionalnoj (AD<sub>L</sub>) koži bolesnika s AD-om. Vrijednosti su prikazane kao medijan i kvartile. Razlike u razinama sfingozin- i sfinganin-baziranih ceramida te glikozil-ceramida u koži zdravih kontrola te nelezionalnoj i lezionalnoj koži bolesnika određene su primjenom dvosmjernog Mann-Whitney testa (\*\*\*\* $P < 0,0001$ , \*\*\* $P < 0,001$ , \*\* $P < 0,01$ ). Vrijednosti su prikazane kao medijan i kvartile.

U usporedbi sa zdravom kožom, vrijednosti svih istraživanih ceramida i glukozil-ceramida su povišene i u lezionalnoj i nelezionalnoj koži (Slika 9), s izuzetkom sfinganin-povezanog ceramida (Cer (d18:1)) koji je postigao graničnu statističku značajnost ( $P = 0.09$ ). Slično glukozil-ceramidu i glukozil-kolesterol je pokazao povišene vrijednosti u AD koži, lezionalnoj i nelezionalnoj (Slika 10). Nadalje, glukozil-ceramid i glukozil-kolesterol pokazuju značajnu povezanost (Slika 10).



**Slika 10.** Vrijednosti glukozil-kolesterola u koži zdravih kontrola (Ctrl) te nelezionalnoj (AD<sub>NL</sub>) i lezionalnoj (AN<sub>L</sub>) koži bolesnika s AD-om. Razlike u razinama glukozil kolesterola u koži zdravih kontrola te nelezionalnoj i lezionalnoj koži bolesnika određene su primjenom dvosmjernog Mann-Whitney testa ( $****P < 0,0001$ ,  $*P < 0,05$ ). Odnos između glukozil-kolesterola i glukozil-ceramida određen primjenom linearne regresije ( $R^2 \rightarrow$  koeficijent određivanja). Vrijednosti (lijeva slika) su prikazane kao medijan i kvartile.

Korelacijska analiza po Spearmanu je učinjena kako bi se usporedili pojedinačni lipidni biomarkeri s težinom bolesti (SCORAD) i funkcijom kožne barijere (TEWL). Rezultati su pokazani u tablici 8.

Odnos sfinganin/ sfingozin je bio jedini biomarker koji je pokazao značajnu korelaciju sa SCORAD-om, kako za lezionalnu i nelezionalnu kožu (Tablica 8). Osim toga, pokazao je i najjaču povezanost sa SCORAD vrijednostima ( $r = -0,69$ ;  $P = 0,0004$  za nelezionalnu kožu i  $r = -0,43$  i  $P < 0,05$  za lezionalnu kožu).

Sfingozin je značajno korelirao sa SCORAD vrijednostima u nelezionalnoj, ali ne i u lezionalnoj koži. U lezionalnoj koži, sfingozin-ceramid Cer (d18:1) je značajno korelirao sa SCORAD vrijednostima, dok je glukozil-ceramid pokazao tendenciju korelacije bez statistički značajne razlike ( $P = 0,076$ ).

**Tablica 8.** Korelacija (dvostrani Spearmanov test) između SCORAD-a i sfingoidnih baza/ceramida u nelezionalnoj ( $AD_{NL}$ ) i lezionalnoj ( $AD_L$ ) koži bolesnika. Prikazane  $P$ -vrijednosti korigirane su primjenom Benjamini-Hochbergove metode korekcije višestrukih testiranja.

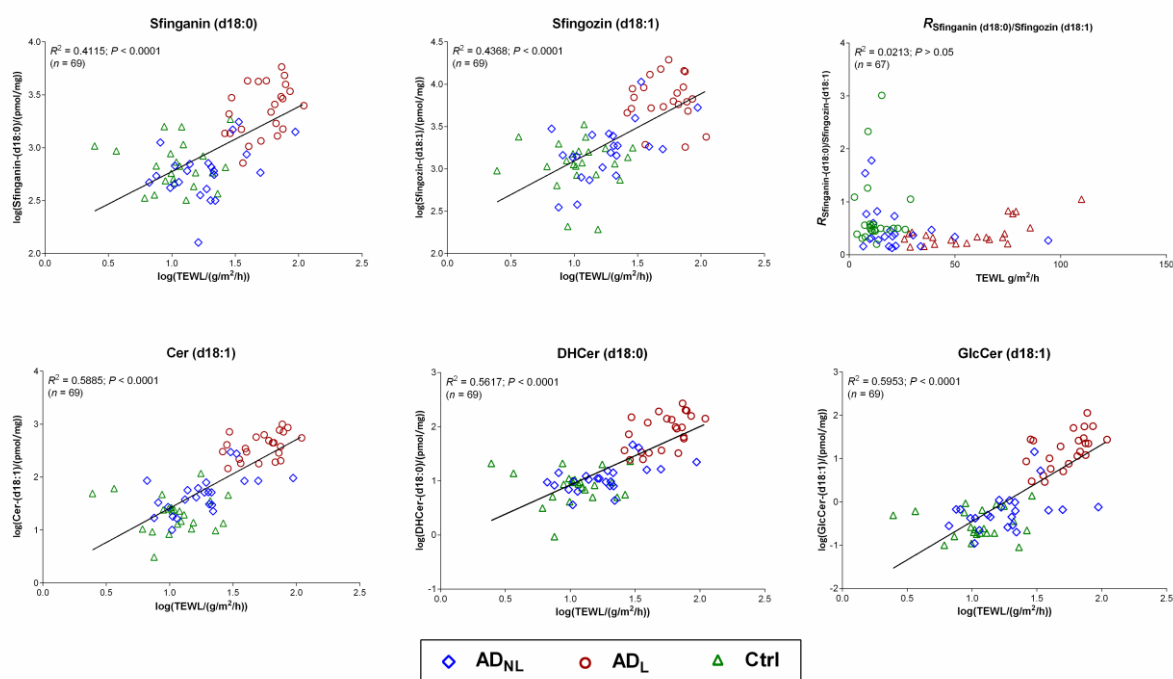
	SCORAD					
	$AD_{NL} (*n = 24)$			$AD_L (*n = 24)$		
	$r$	$P$ -value	95 % C.I.	$r$	$P$ -value	95 % C.I.
Sfinganin-(d18:0)	-0,261	0,219	-0,609 do 0,172	-0,173	0,419	-0,548 do 0,260
Sfingozin-(d18:1)	<b>0,413</b>	<b>0,045</b>	<b>-0,002 do 0,706</b>	0,199	0,351	-0,234 do 0,567
$R_{(Sfinganin-(d18:0)/Sfingozin-(d18:1))}$	<b>-0,686</b>	<b>0,0004</b>	<b>-0,862 do -0,360</b>	<b>-0,434</b>	<b>0,034</b>	<b>-0,719 do -0,024</b>
Cer-(d18:1)	0,057	0,793	-0,366 do 0,460	<b>-0,504</b>	<b>0,012</b>	<b>-0,760 do -0,114</b>
DHCer-(d18:0)	-0,231	0,279	-0,588 do 0,203	-0,334	0,110	-0,657 do 0,092
GlcCer-(d18:1)	-0,267	0,208	-0,613 do 0,166	<b>-0,369</b>	<b>0,076</b>	<b>-0,679 do 0,053</b>

\*kemijska analiza uzorka jednog pacijenta nije uspjela.

C.I. → interval pouzdanosti,  $r$  → Spearmanov korelacijski koeficijent,  $R$  → omjer koncentracija

Kako bi se istražila udruženost lipidnih biomarkera s funkcijom barijere (TEWL) učinjena je linearna regresijska analiza za svaki pojedini lipidni biomarker. Kako je pokazano na Slici 11 nakon pretvorbe u logaritamske vrijednosti, s izuzetkom odnosa sfinganin/sfingozin, svi izučavani biomarkeri su pokazali značajnu povezanost s koeficijentom determinacije ( $R^2$ ) koji je varirao od 0,41 (za sfinganin) do 0,60 (za glukozil-ceramid).



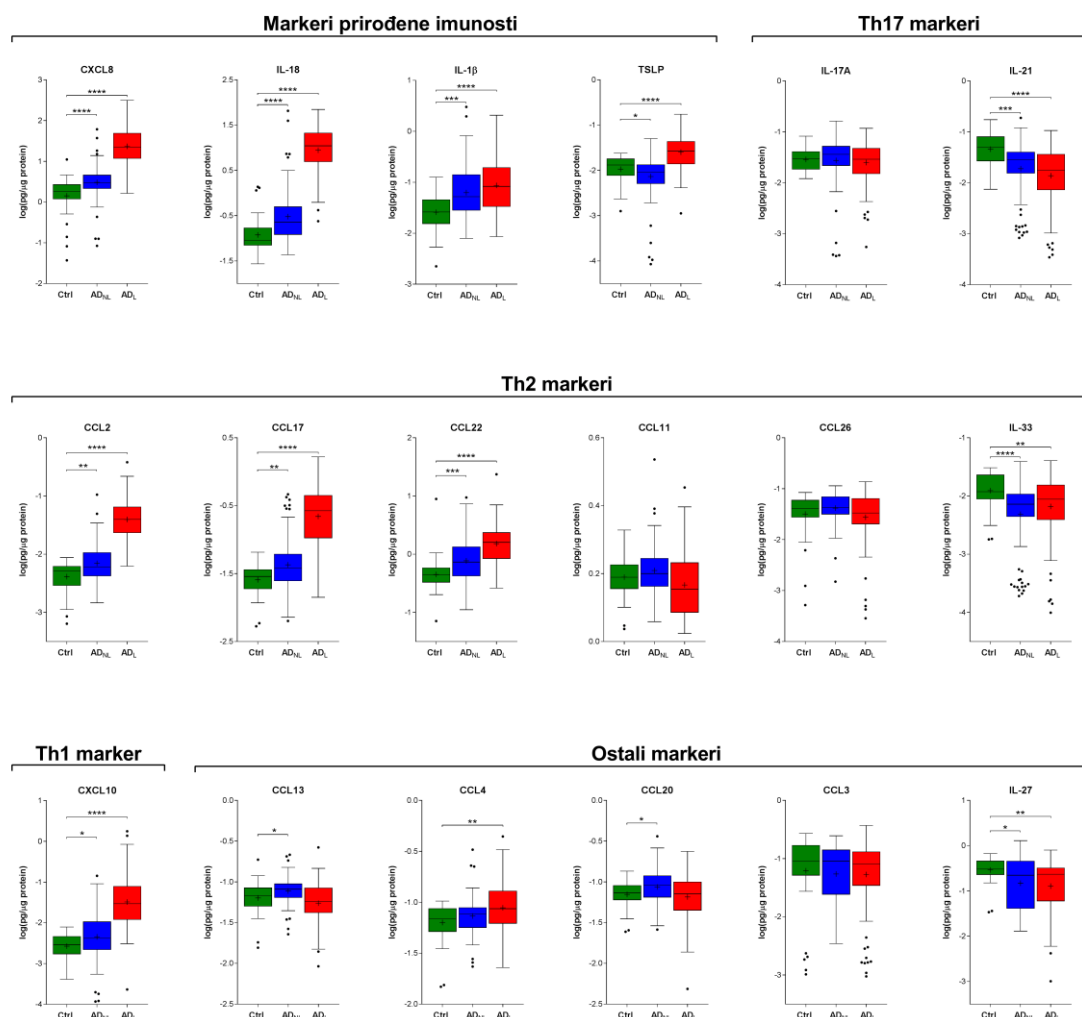


**Slika. 11.** Linearna regresijska analiza odnosa TEWL-a (log-vrijednosti) i sfingoidnih baza (log-vrijednosti), odnosno njihovih odgovarajućih ceramida u koži zdravih kontrola (Ctrl) te nelezionalnoj (AD<sub>NL</sub>) i lezionalnoj (AD<sub>L</sub>) koži bolesnika s AD-om. Regresijska analiza odnosa TEWL-a i omjera sfinganina (d18:0) i sfingozina (d18:1) provedena je na netransformiranim vrijednostima. *P*-vrijednost < 0,05 uzeta je kao značajna.

## 5.5 BIOMARKERI IMUNOLOŠKOG ODGOVORA

Određivanje biomarkera imunološkog odgovora je učinjeno u cijeloj studijskoj populaciji a obilježja te populacije su navedena u Tablici 4. Odredili smo vrijednosti citokina u koži bolesnika i zdravih ispitanika. Osamnaest od dvadeset jednog analiziranog upalnog biomarkera je bilo moguće kvantitativno odrediti u više od 70 % uzoraka: CCL11 (Eotaxin), CCL26 (Eotaxin-3), CXCL8 (IL-8(HA)), CXCL10 (IP-10), CCL2 (MCP-1), CCL13 (MCP-4), CCL22 (MDC), CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CCL4 (MIP-1 $\beta$ ), CCL17 (TARC), IL-18, IL-17A, IL-1 $\beta$ , CCL20 (MIP-3 $\alpha$ ), TLSP, IL-21, IL-27, IL-33. Budući da su IL-22, IL-23 i IL-31 nađeni u velikom broju uzoraka ispod praga otkrivanja (> 30 %), isključeni su iz daljnje analize. Vrijednosti mjerenih citokina u zdravoj i koži bolesnika (nelezionalna i lezionalna koža) su prikazane u Slici 12 podijeljeni u 5 grupa: markeri prirodne imunosti (CXCL8, IL-18, IL-1 $\beta$ , TLSP), Th17 markeri (IL-17A, IL-21), Th2 markeri (CCL2,

CCL17, CCL22, CCL11, CCL26, IL-33), Th1 markeri (CXCL10) i grupa ostalih citokina (CCL13, CCL4, CCL20, CCL3 i IL-27).



**Slika 12.** Razine citokina i kemokina u koži zdravih kontrola (Ctrl) te u nelezionalnoj (AD<sub>NL</sub>) i lezionalnoj (AD<sub>L</sub>) koži bolesnika s AD-om. Razlike u razinama citokina i kemokina u koži zdravih kontrola te nelezionalnoj i lezionalnoj koži bolesnika s AD-om određene su primjenom dvosmjernog Mann-Whitney testa. Prikazane *P*-vrijednosti (\*\*\*\**P* < 0,0001, \*\*\**P* < 0,001, \*\**P* < 0,01 \**P* < 0,05) korigirane su primjenom Benjamini-Hochbergove metode korekcije višestrukih testiranja.

Veliki broj citokina (14 od 18) je pokazao statistički značajne razlike kod bolesnika, u usporedbi s zdravom kožom (Slika 12). Od ovih 14 citokina, 3 citokina su bili značajno drugačiji samo u nelezionalnoj koži CCL13, CCL4 i CCL20. Većina citokina je pokazala povišene vrijednosti u koži bolesnika i ovo povećanje je bilo izraženije u lezionalnoj koži.

Iz grupe biomarkera prirodene imunosti, nađene su značajno povišene vrijednosti za CXCL8, IL-18 i IL-1β kod bolesnika s AD-om, a opažene promjene su bile

izraženije u lezionalnoj koži. Najizraženija razlika između zdrave kože i bolesnika je nađena u lezionalnoj koži za dva biomarkera, IL-18 i CXCL8.

Međutim, TSLP je pokazao drugačiji obrazac, te je nađeno da su vrijednosti bile značajno povišene u lezionalnoj koži, a u nelezionalnoj koži je nađeno upravo suprotno, odnosno smanjene vrijednosti.

U grupi Th17 biomarkera koja se sastojala od IL-17A i IL-21, samo je IL-21 pokazao značajnu razliku između kože bolesnika i zdrave kože. IL-21 vrijednosti u koži bolesnika su bile niže nego vrijednosti u zdravoj koži i nađena je veća razlika u lezionalnoj koži u usporedbi s nelezionalnom kožom.

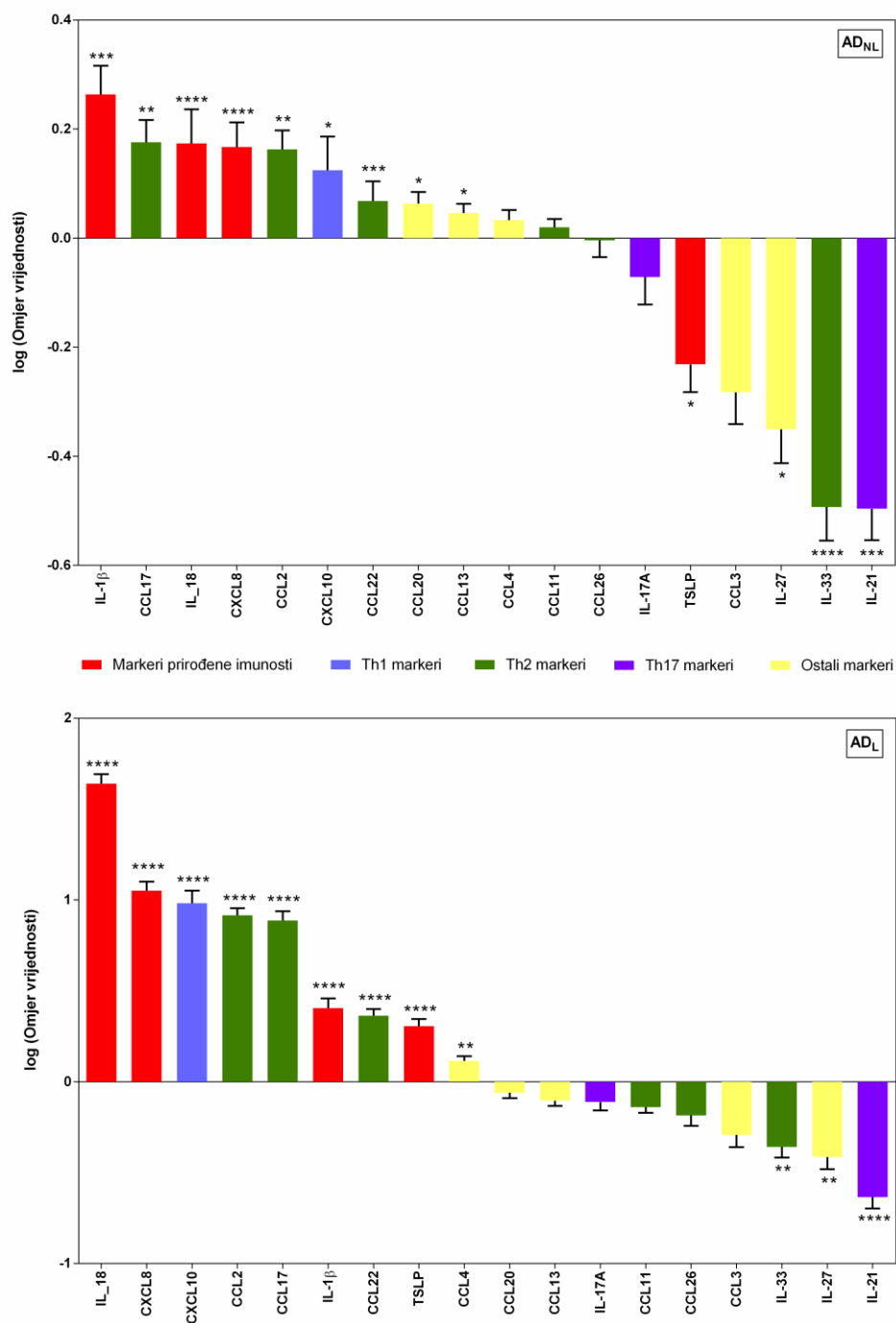
Četiri od šest citokina koji su uključeni u Th2 odgovor je pokazalo statistički značajne vrijednosti u usporedbi kože bolesnika i zdrave kože, i to za lezionalnu i nelezionalnu kožu. CCL2, CCL17, CCL22, i IL-33 su pokazali povišene vrijednosti u koži bolesnika u odnosu na zdravu kožu, dok je IL-33 pokazao suprotan trend.

CXCL10, jedini izučavani Th1 marker, je pokazao značajnu razliku u odnosu na zdravu kožu, i to za lezionalnu i nelezionalnu kožu, a razlika je bila daleko izraženija u lezionalnoj koži.

Iz grupe ostalih citokina, samo IL-27 je pokazao značajnu razliku u lezionalnoj i nelezionalnoj koži, u usporedbi sa zdravom kožom. IL-27 je bio značajno niži u nelezionalnoj i lezionalnoj koži u usporedbi s zdravim kontrolama.

Vrijednosti CCL13 i CCL20 su značajno povišene samo u nelezionalnoj koži, CCL4 samo u nelezionalnoj dok nisu nađene značajne razlike za vrijednosti CCL3 između kože bolesnika i zdrave kože.

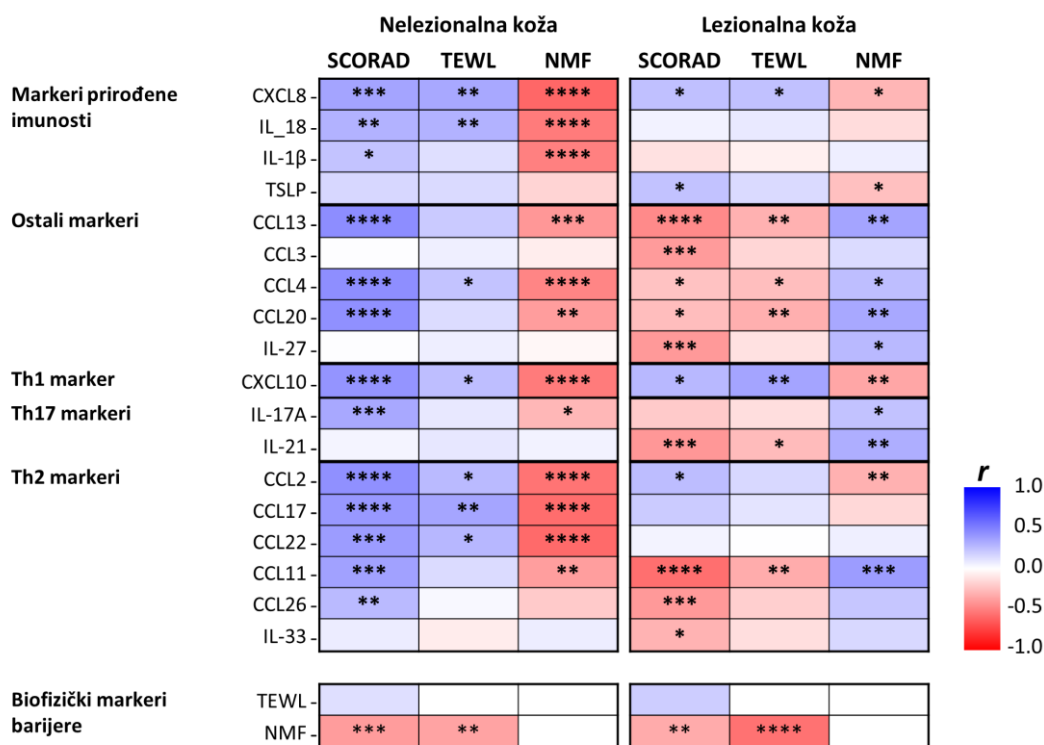
Odnos u razinama biomarkera između bolesnika (za lezionalnu i nelezionalnu kožu) i zdravih kontrola je izražena kao faktor razlike te je pokazana na slici 12 i 13.



**Slika 13.** Omjer vrijednosti citokina u nelezionalnoj (AD<sub>NL</sub>) i lezionalnoj (AD<sub>L</sub>) koži bolesnika s AD-om i koži zdravih kontrola. Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost +/- SEM (standardna pogreška aritmetičke sredine, eng. *standard error of the mean*). Omjer vrijednosti izračunat je na način da su individualne vrijednosti citokina i kemokina podijeljene sa odgovarajućom srednjom vrijednošću citokina i kemokina u koži zdravih kontrola i prikazane kao logaritamske vrijednosti. Razlike u razinama citokina i kemokina u koži zdravih kontrola te nelezionalnoj i lezionalnoj koži bolesnika s AD-om određene su primjenom dvosmjernog Mann-Whitney testa. Prikazane *P*-vrijednosti (\*\*\*\**P* < 0,0001, \*\*\**P* < 0,001, \*\**P* < 0,01 \**P* < 0,05) korigirane su primjenom Benjamini-Hochbergove metode korekcije višestrukih testiranja.

Kako je vidljivo iz slike 12 i 13, većina citokina, s izuzetkom TSLP, IL-21, IL-27, i IL-33 su pokazali povišene vrijednosti u koži bolesnika. Općenito govoreći, lezionalna koža pokazuje izraženiji odgovor od nelezionalne, ali većinom u istom smjeru (povišenje ili smanjenje). Iznimka od ovog pravila je TSLP koji je pokazao niže vrijednosti u nelezionalnoj koži u usporedbi sa zdravom kožom, dok je lezionalna koža pokazala suprotni obrazac. Najizraženiji faktor razlike citokine iz nelezionalne kože je nađen za IL-1 $\beta$ , IL-18, CXCL8 i IL-21. U lezionalnoj koži najviši faktor razlike nađen je za IL-18, CXCL8 i CXCL10.

Spearmanova korelacijska analiza je učinjena kako bi se analizirala povezanost vrijednosti biomarkera s težinom bolesti (SCORAD) i markera kožne barijere (TEWL i NMF). Rezultati za nelezionalnu i lezionalnu kožu bolesnika su prikazani u obliku „*heat-map*“ u Slici 14.



**Slika 14.** Vrijednosti Spearmanovih korelacijskih koeficijenata kao mjere povezanosti SCORAD-a, TEWL-a te NMF-a i biomarkera u nelezionalnoj i lezionalnoj koži bolesnika s AD-om. Prikazane *P*-vrijednosti (\*\*\*\**P* < 0,0001, \*\*\**P* < 0,001, \*\**P* < 0,01 \**P* < 0,05) korigirane su primjenom Benjamini-Hochbergove metode korekcije višestrukih testiranja.

Pronađena je značajna povezanost između većine biomarkera s težinom bolesti (SCORAD) i s funkcijom barijere (TEWL i NMF). Interesantno je da je korelacija između biomarkera sa SCORAD-om, TEWL-om i NMF-om imala drugačije obrasce u lezionalnoj i nelezionalnoj koži. Drugim riječima, u nelezionalnoj koži nađena je pozitivna korelacija između citokina i SCORAD-a i TEWL-a, dok je većina citokina u lezionalnoj koži pokazala suprotan trend (Slika 14).

Iznimka su poneki citokini, kao što su CXCL8, CXCL10 i CCL2 koji su pokazali pozitivnu korelaciju sa SCORAD-om i TEWL-om i u lezionalnoj i nelezionalnoj koži.

Analizom snage povezanosti, najjača pozitivna korelacija ( $P < 0,0001$ ), između biomarkera i SCORAD-a u nelezionalnoj koži nađena je za Th2 biomarkere CCL2 i CCL17, Th1 biomarker CXCL-10 i za CCL13, CCL4 i CCL20.

U lezionalnoj koži, najsnažnija, ali suprotna od nelezionalne kože, negativna povezanost je nađena za CCL13 i CCL11 ( $P < 0,0001$ ).

Nadalje, značajna povezanost za neke biomarkere je samo nađena isključivo samo u nelezionalnoj ili samo u lezionalnoj koži. Primjerice, IL-18, IL-1 $\beta$ , IL-17A, CCL17, i CCL22 su značajno povezani sa SCORAD-om u nelezionalnoj koži, ali ne i lezionalnoj koži.

Suprotan trend je opažen za TSLP, IL-21, IL-27, CCL3 i IL-31.

NMF je značajno korelirao s većinom citokina, a snaga povezanosti je bila veća za nelezionalnu kožu u usporedbi s lezionalnom kožom. Za jedan dio biomarkera, značajna povezanost je nađena samo u nelezionalnoj koži (IL-18, IL-1 $\beta$ , CCL17, CCL22) ili lezionalnoj koži (TSLP, IL-27, IL-21).

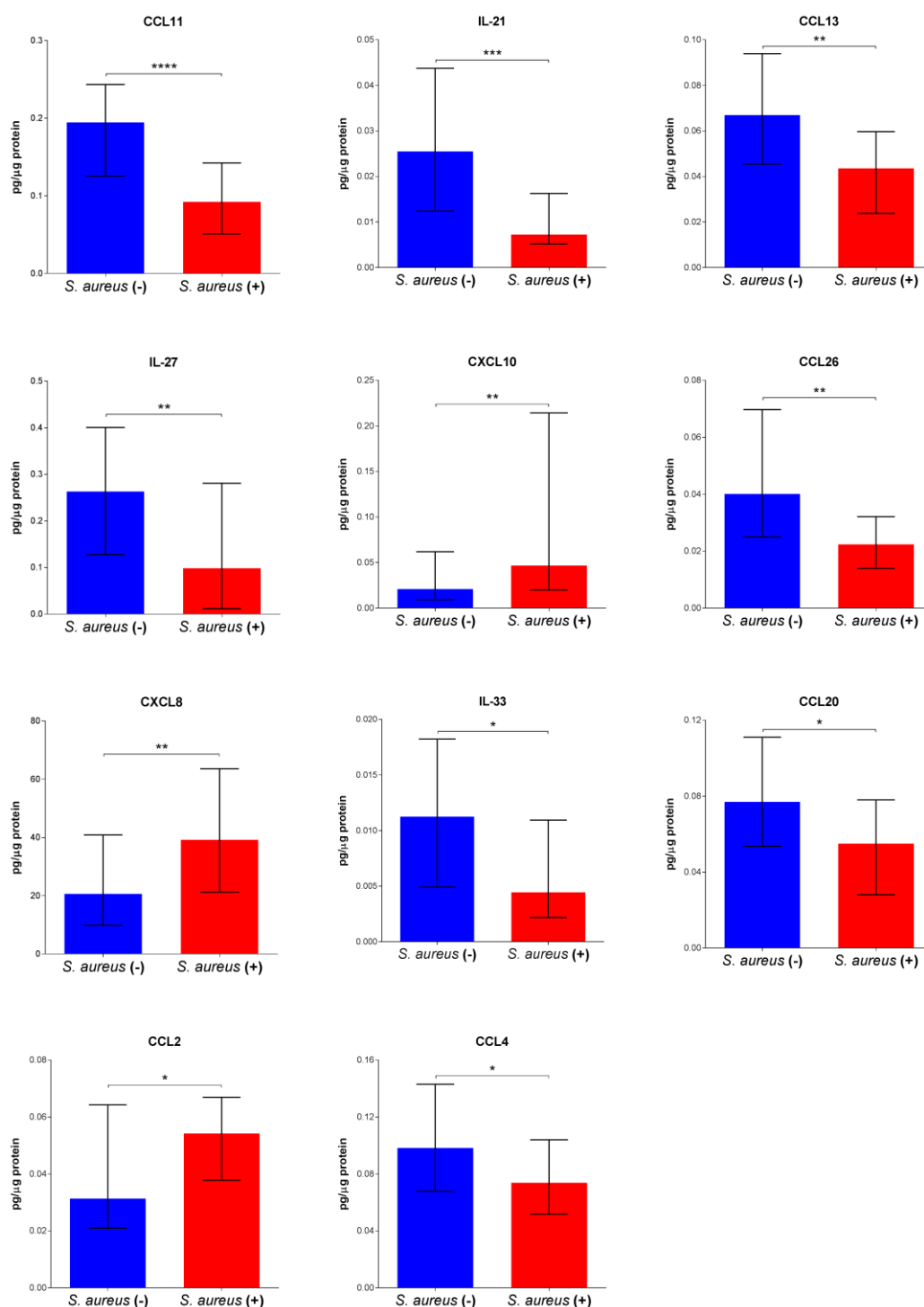
Suprotan trend značajne korelacije biomarkera i NMF-a je opisan za CCL13, CCL20, CCL4, IL-17A i CCL11, odnosno nađena je negativna korelacija u nelezionalnoj koži i pozitivna u lezionalnoj koži. Vrijednosti NMF-a su negativno korelirale sa SCORAD vrijednostima, u lezionalnoj i nelezionalnoj koži.

TEWL je značajno korelirao s manjim brojem citokina u usporedbi s SCORAD vrijednostima. Najjača snaga udruženosti ( $P < 0,01$ ) je nađena za CXCL8, IL-18 i CCL17 u nelezionalnoj koži i CCL13, CCL20, CXCL10 i CCL11 u lezionalnoj

koži. Međutim, TEWL je bio snažno udružen s NMF vrijednostima ( $P < 0,01$  u nelezionalnoj i  $P < 0,0001$  u lezionalnoj koži).

Učinjena je usporedba razine biomarkera u bolesnika s eAD-om i iAD-om, te su pronađene određene razlike u tipu citokinskog odgovora. Bolesnici s eAD-om su imali značajno veće koncentracije CXCL8 i TSLP u lezionalnoj koži i TSLP i IL-33 u nelezionalnoj koži ( $P < 0,05$ ).

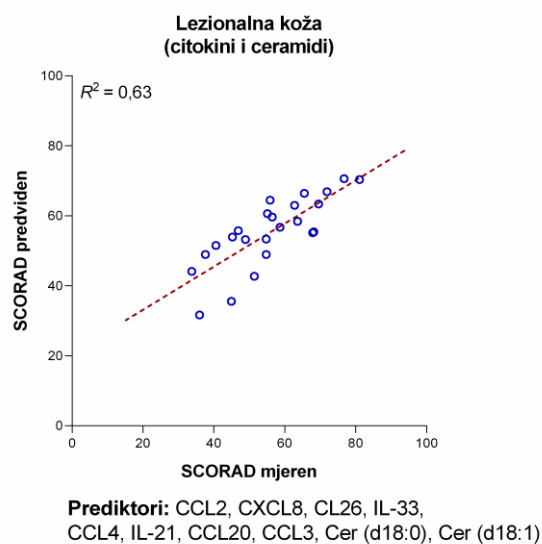
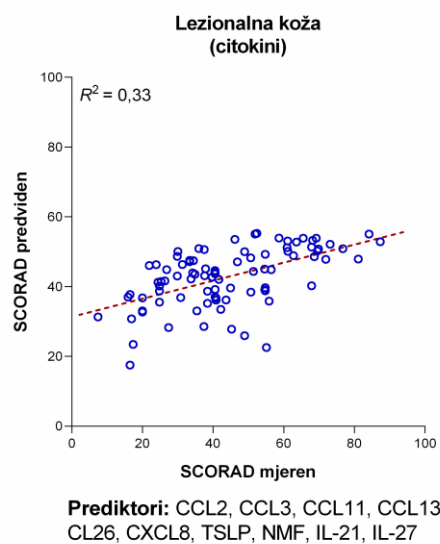
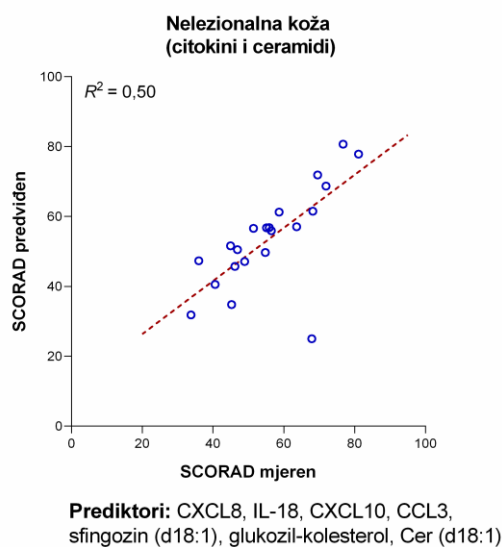
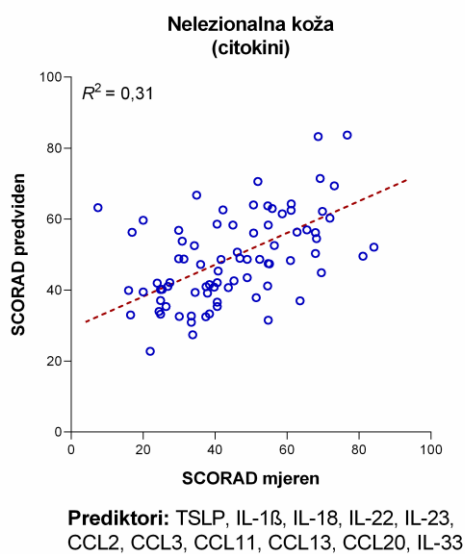
Kako bi se izučile moguće razlike u profilu biomarkera između bolesnika s i bez prisutnosti SA uspoređene su njihove vrijednosti. Kao što je prikazano na slici 15, od 18 istraženih biomarkera imunološkog odgovora, 9 je pokazalo značajnu razliku između bolesnika sa ili bez povišenog broja SA.



**Slika 15.** Vrijednosti biomarkera imunološkog odgovora u lezionalnoj koži kod bolesnika s prisutnosti (*S. aureus* (+),  $n = 28$ ) i bez prisutnosti (*S. aureus* (-),  $n = 70$ ) *S. aureus*. Razlike u vrijednosti biomarkera između dvije grupe bolesnika s AD-om određene su primjenom dvosmjernog Mann-Whitney testa. Prikazane  $P$ -vrijednosti (\*\*\*\* $P < 0,0001$ , \*\*\* $P < 0,001$ , \*\* $P < 0,01$ , \* $P < 0,05$ ) korigirane su primjenom Benjamini-Hochbergove metode korekcije višestrukih testiranja. Vrijednosti su prikazane kao medijan i kvartile.



Kako bi se istražilo može li uključivanje više biomarkera može poboljšati prognozu SCORAD-a, učinjena je multivarijantna linearna regresija. U regresijsku analizu uključeni su kao nezavisne varijable citokini i lipidni biomarkeri koji su pokazali individualne korelacijske koeficijente,  $P > 0,05$ , i SCORAD kao zavisna varijabla. Na slici 16 prikazane su vrijednosti za predviđene i mjerene vrijednosti SCORAD-a u nelezionalnoj i lezionalnoj koži, dobivene multivarijantnom regresijskom analizom. Regresijska analiza i pripadajući koeficijent određivanja ( $R^2$ ) su pokazali da model objašnjava tek 31-33 % varijacije u nelezionalnoj i lezionalnoj koži (Slika 16). Međutim, ukoliko se modelu dodaju ceramidi, uspješnost modela raste ( $R^2 = 0,50$  u nelezionalnoj i  $0,63$  u lezionalnoj koži), usprkos činjenici da je kod ceramida uključeno samo 25 ispitanika.



**Slika 16.** Podudarnost mjerenih (stvarnih) vrijednosti SCORAD-a s vrijednostima predviđenim matematičkim modelom dobivenim primjenom multivarijantne linearne regresije koja uključuje citokine ili citokine i ceramide kao nezavisne varijable. Značajni prediktori SCORAD-a navedeni su za svaki model ispod pojedinog grafičkog prikaza rezultata slaganja između mjerene i predviđene vrijednosti SCORAD-a.

## 6. RASPRAVA

Ovaj doktorski rad po prvi puta istražuje profil biomarkera kožne barijere i imunološkog odgovora u populaciji bolesnika s AD-om u Hrvatskoj. Široki spektar biomarkera određen je u *stratum corneumu* (SC) koristeći neinvazivnu i bezbolnu metodu tzv. „*tape-stripping*“. Nadalje, određena je učestalost nul mutacija filagrinskog gena (*FLG*), najznačajnijeg poznatog genetskog faktora za AD, koji dosad nije bio istraživan u hrvatskoj populaciji bolesnika s AD-om.

U našem su istraživanju uključeni bolesnici s umjerenim do teškim oblikom bolesti (SCORAD srednja vrijednosti 40,2)(raspon 0 – 87,3), većinom s ranim nastupom bolesti i s trajanjem do u odraslu dob (72 %). Većina je bolesnika uz primjenu emolijentne terapije i lokalnih kortikosteroida, zbog težine bolesti u nekom trenutku morala primati jedan od oblika sustavne terapije što je u skladu s težinom bolesti (161, 162).

Većina bolesnika (71 %) je imala udruženu osobnu anamnezu atopijske bolesti, najčešće se radilo o alergijskom rinitisu (51 %), dok je alergijsku astmu imalo 36 % bolesnika. Prema podacima o udruženim alergijama, ukupnom, specifičnom IgE i alergološkom testiranju, ekstrinzički oblik bolesti je imalo 79 % bolesnika, intrinzički 21 % bolesnika, što je u skladu s literaturnim podacima (169).

Budući da je u etiopatogenezi AD-a prepoznata važnost SA, određivana je kolonizacija SA na koži koja je bila prisutna u 28 % bolesnika, većinom u lezionalnoj koži.

Općenito je prihvaćeno da je oštećenje barijere ključno u etiopatogenezi AD-a, međutim postoje razlike u mišljenjima jesu li su promjene u barijeri posljedica imunoloških promjena (*in-out* hipoteza), ili primarne, odnosno posljedica primarnih promjena barijere i potom sekundarne imunološke reakcije (*out-in* hipoteza) (21).

U ovom istraživanju, kao biomarkeri kožne barijere uključene su mutacije gubitka funkcije filagrinskog gena (LOF *FLG*), degradacijski produkti filagrina i određene

klase lipida. Filagrin je jedan od najvažnijih strukturnih proteina u epidermisu (25). Filagrin pridonosi održavanju kožne barijere na više načina, on povezuje keratinske filamente što je od velike važnosti za mehanička svojstva *stratum corneum-a*. Nadalje, degradacijski produkti filagrina su sastojci grupe higroskopskih spojeva tzv. prirodnih ovlaživača (NMF) koji su važni za hidrataciju kože. Razina NMF-a ovisna je o genetskim čimbenicima od kojih su najznačajnije mutacije gubitka funkcije filagrinskog gena (*FLG*) (25, 50).

Rezultati našeg istraživanja pokazuju nisku učestalost *FLG* mutacija u Hrvatskoj što ide u prilog hipoteze postojanja sjeverno-južnog gradijenta mutacija u Europi (170). Svi ispitanici, uključujući bolesnike i zdrave kontrole ispitani su na 3 najčešće mutacije *FLG* u europskoj populaciji (2282del4, R501X, R2447X). Među bolesnicima je nađeno samo 4 nositelja mutacije (4 %), dok u kontrolnoj grupi zdravih ispitanika nijedna mutacija nije nađena. Sva četiri bolesnika su bili homozigoti za mutacije (3 za 2282del4 i 1 za R501X mutacije). U ispitivanoj populaciji nije nađena nijedna R2447X mutacija.

Prije našeg istraživanja skupina istraživača učinila je epidemiološko istraživanje filagrinskih mutacija kod atopijskih bolesti, međutim selekcija studijske populacije se temeljila na upitniku kojim je ispitivana prisutnost udružene atopije, bez pregleda dermatologa i postavljene dijagnoze atopijskog dermatitisa. U istraživanju je sudjelovalo 439 studenata, kod kojih je provedeno alergološko testiranje, spirometrija s bronhodilatatornim testom i genotipizacija *FLG-a*, ispunjavanje upitnika o zdravstvenom stanju i načinu života te prehrambenoga upitnika. Navedena epidemiološka studija je našla nisku učestalost filagrinskih mutacija (2.6%) u opisanoj populaciji (171).

Naši podaci učinjeni na bolesnicima s atopijskim dermatitisom pokazuju također nisku učestalost mutacije filagrina, no ipak višu s obzirom da se radi većinom o bolesnicima s umjerenim do teškim oblikom bolesti i to najčešće ekstrinzičkoga tipa bolesti. Time smo pokazali da su naši podaci originalni na našoj genetski detereminiranoj populaciji, čime smo potvrdili da *FLG* mutacije nemaju značajnu ulogu u patofiziologiji AD-a, što otvara nova pitanja etiologije ove bolesti te upućuje na potrebu daljnjeg istraživanja.

Otkako je pronađeno da su mutacije gubitka funkcije u *FLG* najsnažniji faktor rizika za razvitak AD-a u irskoj populaciji, učinjene su mnoge studije u brojnim drugim europskim populacijama i nađena je široka varijabilnost u prevalenciji i tipu mutacija u raznim etničkim skupinama (25, 31, 45, 36, 37, 172-177). *FLG* gen je izrazito polimorfan i otkriveno je više od 80 varijanti koje su udružene s etiopatogenezom bolesti. Najviše studija genetskih udruženosti za AD je učinjeno u populaciji sjeverne Europe i prijavljena učestalost mutacije je iznosila 17-50 % (176,177). U sjevernoj Europi su najčešće mutacije R501X i 2282del4 i čine do 80 % svih mutacija (31, 37, 45, 178). Poznato je da 8-10 % zdravih pojedinaca sjevernoeuropskih zemalja su heterozigotni nositelji *FLG* mutacija (25, 170). Velika varijabilnost u učestalosti mutacija se može objasniti razlikama u postavkama studija, osobitostima studijskih populacija, broju istraživanih mutacija, načinu dijagnosticiranja bolesti (korištenje upitnika ili dijagnoza postavljena od strane dermatologa).

Potvrđena je povezanost *FLG* mutacija i težih oblika bolesti, ranog nastupa i trajanja bolesti u odraslu dob, kao i udruženost s dišnim oblicima atopije. U našoj kohorti većina bolesnika je imala umjereno teški do teški oblik bolesti (90 %), rani nastup (72 %) i pozitivnu osobnu anamnezu za jednu ili više atopijskih bolesti. Nadalje, nađena je jaka oštećenost funkcije barijere (TEWL). Odabirom ovakve studijske populacije vjerojatnost pronalaženja *FLG* mutacija je bila visoka, a niska učestalost koja je nađena upućuje na to da ostali faktori, a ne mutacija *FLG* sama po sebi, utječu na etiopatogenezu bolesti u hrvatskoj populaciji.

Za razliku od sjevera Europe, podaci za zemlje južne i istočne Europe većinom nedostaju. Učinjene su dvije studije u poljskoj populaciji (180, 181). Debinska *i sur.* (180) su našli *FLG* mutacije u 2,8 % zdravih ispitanika i 13,8 % kod bolesnika s blagim do umjerenim oblicima bolesti. Woźniak *i sur.* su našli R501x i 2282del kod 30 % bolesnika s AD-om, dok mutacije nisu nađene u kontrolnoj grupi (181).

Niska prevalencija *FLG* mutacija je također nađena u talijanskoj populaciji (182, 183). Giardina *i sur.* su našli nisku prevalenciju R501X i R2447X mutacija kod talijanskih bolesnika s AD-om od 1,4 %, dok je učestalost kod zdravih ispitanika iznosila 0,5 % (182). Cascella *i sur.* (183) su učinili kompletno sekvencioniranje

*FLG* gena i pronašli 3 nove rijetke mutacije, učestalost od < 1 % što sugerira da slično podacima iz naše studije, mutacije *FLG* u talijanskoj populaciji ne predstavljaju bitan faktor rizika za razvitak AD-a. Nedavno objavljena španjolska studija je pokazala kombiniranu učestalost mutacije od 1,9 % u kontrolnoj grupi, a u grupi bolesnika od 12,6 % (184).

Razlog ove velike razlike u učestalosti mutacije unutar Europe nije potpuno jasan. Thyssen *i sur.* (170) smatraju da bi ovaj sjeverno-južni gradijent mogao biti evolucijski uvjetovan, te da bi *FLG* mutacija mogla predstavljati evolucijsku prednost pojedincima na sjevernim dijelovima Europe. Kako je *FLG* od presudne važnosti za funkciju barijere, smanjenje vrijednosti *FLG* bi moglo olakšati apsorpciju UVB i sintezu D vitamina (170). Niska učestalost mutacija *FLG* gena u našoj izučavanoj populaciji podupire tvrdnju da je AD multifaktorijalna bolest i etiologija same bolesti je rezultat mnogobrojnih genetskih i okolišnih utjecaja (31, 36, 185).

Kako je učinjena genotipizacija na samo 3 najčešće europske mutacije, nismo mogli isključiti mogućnost da naša populacija ne sadrži druge populacijsko-specifične mutacije *FLG*. Ekspresija *FLG* je i pod utjecajem broja kopija gena, ali, ipak, utjecaj kopija gena je daleko manji od same mutacije gubitka funkcije (48). Iz tog razloga smo određivali vrijednosti degradacijskih produkata *FLG*, odnosno sadržaj NMF-a u SC, za koji je dokazano da predstavlja primjeren biomarker *FLG* genotipa (176). Vrijednosti NMF-a lezionalne kože bolesnika s AD-om su značajno smanjene u usporedbi s NMF-om zdravih ispitanika, dok za nelezionalnu kožu bolesnika vrijednosti jesu bile snižene, ali razlika u odnosu na kontrolnu grupu nije bila statistički značajna. Ove spoznaje dovode do zaključka da mutacije *FLG* gena ne igraju značajnu ulogu kod bolesnika s AD-om u hrvatskoj populaciji i da su snižene vrijednosti NMF-a u lezionalnoj koži stečene i nastale kao posljedica Th2 posredovanog odgovora i utjecaja upale na ekspresiju *FLG*, što je u skladu s podacima iz već postojeće literature (25, 50, 114).

Smanjene vrijednosti NMF-a su negativno povezane s funkcijom barijere što ima za posljedicu suhu i ljuskavu kožu, a to je važno obilježje kože bolesnika s AD-om i naglašava potrebu kontinuiranog korištenja emolijensa. Uz važnost za hidrataciju kože, NMF pridonosi kiselom pH kože, što je bitno za antimikrobnu obrambenu funkciju kože (25). U novijem radu, Feullie *i sur.* su pokazali da snižene količine NMF-a pogoduju prianjanju SA na korneocite (186). To je u skladu s rezultatima iz našeg istraživanja gdje je pokazano je da bolesnici s povećanom količinom SA imaju povišene vrijednosti pH, uz snižene vrijednosti NMF-a u lezionalnoj koži što govori u prilog važnosti NMF-a za barijernu i antimikrobnu obrambenu funkciju (186).

Funkcija kožne barijere u znatnoj je mjeri ovisna o sastavu i strukturi lipidnih slojeva u SC-u (187). Najčešće istraživana skupina lipida su ceramidi koji pokazuju znatne promjene u bolesnika s AD-om (187). Ove promjene lipidnog sadržaja su povezane sa smanjenjem barijerne funkcije (187). Do danas je u SC-u otkriveno više stotina ceramida koji su podijeljeni u 12 glavnih grupa prema sfingoidnoj bazi i lancu masnih kiselina (187). Uobičajna praksa dosad je bila određivanje pojedinačnih ceramida prema sfingoidnim bazama ili prema duljini lanaca slobodnih masnih kiselina unutar određene klase ceramida (80, 188). Međutim, ovo predstavlja veliki izazov budući da ne postoji standard za kvantifikaciju za sve ceramidne vrste i postoje razlike u ekstrakciji pojedinih ceramida (188). Budući da se koncentracije pojedinih ceramida ne mogu odrediti, rezultati se često izražavaju kao relativna količina izučavane ceramidne vrste. U ovom istraživanju pristupili smo na jedan novi način koji se temelji na uklanjanju lanca masne kiseline poslije čega se ceramid odredi kao sfingoidna baza. U istraživanje su uključeni ceramidi koji kao bazu imaju sfingozin ili sfinganin. Ova grupa ceramida (takozvani NS, AS, EoS, NdS, AdS i EOdS ceramidi) čini 32 % od ukupnih ceramida u SC-u (190).

Prednost ovog pristupa je kvantitativno određivanje ukupne količine svih ceramida koji sadrže sfingozin ili sfinganin kao bazu, što analitičko određivanje čini mnogo jednostavnijim, točnijim i daje uvid u apsolutnu količinu ceramida. Uz

ceramide određene su slobodne sfingoidne baze, preteča ceramida glukozil-ceramid i glukozil-kolesterol.

Analizom lipida u ovom istraživanju pokazali smo da lezionalna i nelezionalna koža bolesnika pokazuje poremećene vrijednosti sfingoidnih baza, sfingozin- i sfinganin-pripadajućih ceramida, glukozil-ceramida i glukozil-kolesterola. Nadalje, više izučavanih lipidnih biomarkera je pokazalo udruženost s težinom bolesti i funkcijom barijere. Sfingozin i sfinganin kao slobodne baze su nađene u višim vrijednostima kod bolesnika s AD-om u usporedbi sa zdravom kožom. Ovo zapažanje je primjećeno isključivo u lezionalnoj koži. Međutim, odnos sfinganina i sfingozina je bio značajno promijenjen kod bolesnika, kako u lezionalnoj, tako i nelezionalnoj koži. Štoviše, odnos između baza se pokazao udruženim s težinom bolesti i funkcijom barijere i u lezionalnoj i u nelezionalnoj koži. Ovi rezultati potvrđuju podatke koji su objavili Loiseau *i sur.* u eksperimentalnom modelu za AD (191). Potvrda da je omjer sfingozina i sfinganina poremećen u AD-u je od velike važnosti. Poznato je da je slobodni sfingozin uključen u antimikrobnu obranu (192-193), održavanje integriteta lamelarnih slojeva (191) i regulaciju stanične proliferacije i diferencijacije (190).

Osim slobodnih sfingoidnih baza, njihovi pripadajući ceramidi su pokazali povišene vrijednosti u koži bolesnika, što je u skladu s rezultatima prijašnjih studija (71, 81). Danso *i sur.* su našli povišene vrijednosti sfingozin-ceramida (NS i AS) u lezionalnoj, ali ne i nelezionalnoj koži (194). U našem istraživanju je nađena značajna razlika između zdrave i kože bolesnika, čak i za nelezionalnu kožu, i to ne samo za sfingozin-ceramide, nego i za sfinganin-ceramide, vjerojatno zbog veće osjetljivosti naše metode.

Ovo istraživanje predstavlja prvo određivanje glukozil-ceramida u bolesnika s AD-om. Glukozil-ceramid je preteča ceramida i ovaj korak u biosintezi je reguliran enzimom glukozil-ceramidnom- $\beta$ -glukozidazom (GBA). Rezultati ovog istraživanja su pokazali da su glukozil-ceramidi povišeni u koži bolesnika, i u skladu s istraživanim ceramidima, ovaj efekt je bio izraženiji u lezionalnoj koži, što sugerira da su ove promjene velikim dijelom stečene i nastaju kao posljedica imunološkog odgovora i upale. Mogući razlog povećane razine glukozil-ceramida



je promijenjena aktivnost GBA enzima koji je ovisan o pH vrijednosti (195,196). U ovom istraživanju nađene su značajno povećane vrijednosti pH u lezionalnoj koži. Kako bi nadalje istražena moguću povezanost s GBA, određena je vrijednosti glukozil-kolesterola čija je sinteza također posredovana enzimom GBA. Podaci o glukozil-kolesterolu su u slaganju s onima o glukozil-ceramidima čije su vrijednosti također bile povišene u koži bolesnika. Nadalje, nađena je snažna udruženost njihovih vrijednosti ( $R^2 = 0,77$ ;  $P < 0,0001$ ), što potvrđuje ulogu GBA u povišenju vrijednosti glukozil-kolesterola i glukozil-ceramida u koži bolesnika. Iako je izravan dokaz naše hipoteze moguć tek mjerenjem aktivnosti ili ekspresije GBA u normalnoj i koži bolesnika s AD-om, dobra suglasnost rezultata između glukozil-ceramida i glukozil-kolesterola je značajna.

Jedan od glavnih ciljeva ovog istraživanja je bio procijeniti primjenjivost lipidnih biomarkera u procjeni težine bolesti i stupnja oštećenja funkcije barijere. Upravo je odnos sfingozina i sfinganina pokazao najveću udruženost sa SCORAD vrijednostima i to za u lezionalnu i nelezionalnu kožu. U nelezionalnoj koži sfingozin je značajno udružen sa SCORAD vrijednostima, dok je u lezionalnoj koži najsnažnija udruženost nađena sa sfingozin-udruženim ceramidima. Kada je analiziran odnos s TEWL-om, gotovo sve izučavane lipidne komponente su pokazale snažnu korelaciju. Najsnažnija korelacija je nađena za glukozil-ceramid ( $R^2 = 0,60$ ;  $P < 0,0001$ ).

Iz naših rezultata nije moguće dati odgovor jesu li su promjene u lipidnom sastavu stečene ili predstavljaju etiološki faktor. Činjenica da su promjene značajno jače izražene u lezionalnoj koži i snažna povezanost s težinom bolesti govore u prilog pretpostavke da su te promjene posljedica imunoloških promjena u AD-u. Zbog vremenskih i financijskih ograničenja u istraživanju lipida uključeno je samo 25 osoba. Međutim, rezultati su jednoznačni, razina značajnosti u usporedbi skupina i korelaciji s težinom bolesti i kožnom barijerom postignuta je za veliki broj lipidnih komponenti te smatramo da su reprezentativni za cijelu populaciju. Bitno je istaknuti da u ovom ispitivanju nisu uključene sve grupe ceramida i metoda ne omogućava uvid u promjene uzrokovane dužinom lanca masnih kiselina koje su važne u etiopatogenezi AD-a (81). Međutim, glavni cilj ovog istraživanja bila je

identifikacija biomarkera koji su povezani s promjenama u kožnoj barijeri i jačini bolesti, a ne sveobuhvatna analiza lipida. Smatramo da su lipidni biomarkeri pronađeni u našem istraživanju relevantni i da će jednostavnost njihovog određivanja pridonijeti širem korištenju lipidnih biomarkera u istraživanju i kliničkoj praksi.

Imunološki odgovor u AD-u je složen i uključuje mnoge mehanizme prirodene i stečene imunosti. Naše istraživanje predstavlja prvo istraživanje koje je izučavalo profil velikog spektra citokina u odraslih bolesnika s AD-om u Hrvatskoj, čiji je cilj bilo istražiti njihov utjecaj na kožnu barijeru te identificirati primjenjive biomarkere za AD.

Većina određivanih citokina (14 od 18 istraživanih) je pokazala značajnu razliku u vrijednostima između zdrave i kože bolesnika. Općenito govoreći, opažene razlike su u većini slučajeva bile izraženije u lezionalnoj koži. Ukoliko se analizira citokinski „potpis“, odnosno pripadnost grupi markera, rezultati našeg istraživanja su potvrdili prijašnje studije učinjene u drugim etničkim populacijama. Najizraženija je razlika nađena za markere prirodene imunosti, CXCL8 i IL-18, čime smo potvrdili bitnu ulogu prirodene imunosti u patogenezi AD-a (197-199). Ovo zapažanje je u slaganju s rezultatima studija učinjenih u populacijama irske (199) i nizozemske djece s AD-om (200). IL-18 nastaje kao odgovor na izlaganje alergenu/patogenu i on je ključni citokin u stvaranju spontanijih lezija nalik AD-u stoga nije iznenađujuće da je upravo IL-18 pokazao ovakav odgovor u lezionalnoj koži.

Sljedeći biomarker prirodene imunosti koji je pokazao veliku razliku između zdrave i kože bolesnika s AD-om je CXCL8, što je u slaganju s prethodno učinjenim studijama djece (199, 200) i odraslih s AD-om (201). Ovaj citokin je predložen, zajedno s CCL17, kao obećavajući kandidatni biomarker praćenja učinka lokalne terapije (201).

Th2 citokini CCL2 i CCL17 su pokazali značajne razlike između kože bolesnika i zdravih ispitanika i snažnu korelaciju ( $P < 0,0001$ ) sa SCORAD vrijednostima. U nedavno učinjenoj metaanalizi biomarkera AD-a izdvojen je CCL17 (TARC) i

istaknuta je njegova vrijednost kao najvjerojatnijeg pojedinačnog markera za težinu bolesti (202).

CXCL10 (IP-10) je Th1 citokin koji je pokazao značajnu razliku između kože bolesnika i zdrave kože, te je ova razlika bila izraženija u lezionalnoj koži. CXCL10 snažno korelira s težinom bolesti. U prethodno učinjenoj studiji kod odraslih bolesnika s AD-om nađene su 10 puta povišene vrijednosti CXCL10 u transdermalnoj tekućini iz lezionalne kože, u usporedbi s nelezionalnom i zdravom kožom, uz dokazanu korelaciju CXCL10 sa SCORAD-om (203). Bitna uloga CXCL10 je migracija aktiviranih Th1 stanica na periferna mjesta upalnog odgovora gdje dalje reguliraju interakcije efektorskih stanica. Međutim, rezultati studija učinjenih u pedijatrijskoj populaciji (199, 200) nisu pokazali razlike u CXCL10 između lezionalne i zdrave kože, što sugerira razlike u ekspresiji Th1 citokina između djece i odraslih. To dalje potvrđuje i zapažanje Brunner *i sur.* koji su pronašli odsutnost Th1 reakcije kod djece (204-205).

Među pet određivanih citokina iz grupe Th17 citokina, samo su se IL-17A i IL-21 mogli kvantitativno odrediti. IL-21 je pokazao značajno niže vrijednosti u koži bolesnika (lezionalnoj i nelezionalnoj), u usporedbi sa zdravom kožom, no međutim negativna, značajna korelacija sa SCORAD vrijednostima je nađena samo u lezionalnoj koži. Interesantno je za napomenuti da neki citokini, kao što su CCL11, CCL13, CCL4, u lezionalnoj i nelezionalnoj koži pokazuju drugačije smjerove udruženosti sa SCORAD vrijednostima. Ovi citokini su pokazali značajno niže vrijednosti u koži bolesnika u usporedbi sa zdravom kožom.

Usporedili smo imunološke odgovore kod bolesnika s eAD-om i iAD-om. Nismo našli razlike u vrijednostima TEWL-a, SCORAD-a i NMF-a, što potvrđuje i klinička zapažanja da se ovi bolesnici klinički ne razlikuju. Ovi podaci su u slaganju s prethodno objavljenom literaturom (206, 207). Međutim, nađene su razlike u nekim citokinima kao što su CXCL8 (lezionalna koža), TSLP (lezionalna i nelezionalna koža) i IL-33 (nelezionalna koža). Interesantno je da biomarkeri koji su povećani kod eAD-a pripadaju prirođenom imunološkom odgovoru koji imaju važnu signalnu funkciju (tzv. *alarmini*).

Naši rezultati koji se odnose na razliku između iAD-a i eAD-a se razlikuju od nekih literaturnih podataka (169, 208). U našoj kohorti ne postoji razlika u Th2 citokinskom izričaju između iAD-a i eAD-a, već jedino u citokinima prirodne imunosti. Razlog tome može biti višestruki. Poznato je da su vrijednosti ukupnog IgE (koje određuju klasifikaciju u iAD ili eAD) ovisne o dobi bolesnika. Također, poznato je da iAD može prijeći u eAD, te da bolesnici s eAD-om kroz godine mogu izgubiti svoj pozitivitet u testovima, ući u remisije sa svojim atopijskim bolestima i imati negativizaciju i pad titra u vrijednostima ukupnog i specifičnog IgE. Stoga smo danas stava, da je razlikovanje eAD-a i iAD-a više akademske prirode i da je riječ o prirodnom tijeku bolesti koji kod raznih pojedinaca može biti različit (156-157). Što se tiče Th2 odgovora, našli rezultati su u slaganju s radom Suárez-Fariñas *i sur.*, međutim, mi nismo našli razlike u Th17 odgovoru između iAD-a i eAD-a (156). Općenito, usporedba rezultata biomarkera između literaturnih podataka je teška zbog razlika u populaciji bolesnika (djeca vs. odrasli bolesnici, težina bolesti), uzorkovanje lezionalne ili nelezionalne kože, određivanje iz bioptata ili uzorka uzetog adhezivnim vrpčama te vrsta izučavanih biomarkera (ekspresija proteina ili RNK ekspresija). U par recentnih studija o biomarkerima AD-a u *stratum corneum* određivana je ekspresija gena, umjesto vrijednosti samih proteina (citokina) i otkriven je veliki broj gena koji se razlikovao u zdravoj i koži djece s umjerenim do teškim oblikom AD-a (209). Sukladno rezultatima našeg istraživanja, CXCL8 i CCL17 ekspresija gena je povišena u lezionalnoj i nelezionalnoj koži u usporedbi sa zdravom kožom. Štoviše, u slaganju s rezultatima našeg istraživanja, podaci su pokazali da je nelezionalna koža karakterizirana s promjenama u citokinskom miljeu, što i korelira s težinom bolesti. Prednost studija koje analiziraju gensku ekspresiju je u njihovom velikom potencijalu otkrivanja gena koji su pojačano/smanjeno izraženi (tzv. "down/up"-regulacija). Nadalje, u kontrastu s ekspresijom mRNK, neki citokini kao što su IL-13 i IL-4 pokazuju niske vrijednosti u SC i stoga ih je teško odrediti na nivou proteinskih vrijednosti (199-201). Međutim, nedostatak studija temeljenih na mRNK ekspresiji je niska rata uspješnosti sekvencioniranja transkriptoma, te je moguće da je mRNK manje stabilna od proteina koji kodira (209). Stoga, jasan odnos između ekspresije gena i proteina koji je odgovoran za biološku funkciju

tek treba odrediti. Osim toga, kako bi se dobila dostatna količina mRNA potrebno je uzorkovati dublje razine SC-a što metodu čini invazivnijom i vremenski zahtjevnijom. Na kraju, ekstrakcija mRNK je laboratorijski zahtjevnija metoda s ograničenim brojem laboratorija koji metodu mogu učiniti, čime se ograničava njena šira primjena u praksi (209).

Jedan od ciljeva ovog istraživanja je bila identifikacija biomarkera kože i imunološkog odgovora u bolesnika s AD-om i njihova povezanost s težinom bolesti (SCORAD). Iako je veliki broj citokina pokazao značajnu razliku u usporedbi sa zdravom kožom, povezanost pojedinačnih citokina sa SCORAD vrijednostima je bila umjerena, čak i kad je uključeno više citokina. Međutim, kad su u statističku analizu uz citokine dodani ceramidi i sfingoidne baze (multivarijantna linearna regresija), točnost modela je znatno poboljšana, što ukazuje na važnost uključivanja više biomarkera funkcije kožne barijere uz biomarkere imunološkog odgovora. Ovakvi rezultati također duboko potvrđuju potrebu za razvijanjem terapijskih opcija koje bi pokrivale set većeg broja kritično važnih čimbenika u etiopatogenezi bolesti.

Naši rezultati su pokazali nisku učestalost mutacije *FLG*, potvrđujući hipotezu sjeverno-južnog gradijenta *FLG* mutacije. Niske vrijednosti degradacijskih produkata *FLG*, u nelezionalnoj koži podržavaju mišljenje da je uloga *FLG* u etiologiji AD-a kod hrvatskih bolesnika niska. Međutim, vrijedno je napomenuti jako snižene razine filagrinskih degradacijskih produkata (NMF) u lezionalnoj koži kao posljedice Th2 posredovanog upalnog odgovora. Ovo zapažanje, osim akademske vrijednosti, ima i svoju kliničku primjenu, te je kod bolesnika kod kojih je snižena vrijednost NMF-a moguće ponuditi primjenu emolijensa koji imaju ulogu ovlaživača (pripravci s urejom).

Osim same identifikacije mogućih biomarkera za AD, naše istraživanje je omogućilo dublji uvid u patofiziologiju bolesti kod hrvatskih bolesnika umjerenog do teškog oblika AD-a. Istraživanje je pokazalo promjene u NMF-u, specifičnim lipidnim klasama i citokinima iz grupe prirodene i stečene imunosti uključujući Th1, Th2, i Th17 citokine. Budući da su ovi citokini terapijske ciljne molekule u biološkim terapijama, određeni biomarkeri mogu biti od koristi u razvoju i praćenju

uspjeha ovih terapije. Kompleksnost imunološkog odgovora upućuje na to da je nužna detekcija citokinskih profila i razvitak ili terapije koja djeluje na veći broj citokina („*multi-cytokine therapy*“) ili primjena kombinacije lijekova.

Metoda uzorkovanja *stratum corneum*-a adhezivnom vrpcom (tzv. „*tape stripping*“) se pokazala izrazito pogodnom metodom za određivanje parametara funkcije barijere i imunološkog odgovora. Radi se o neinvazivnoj metodi, bezbolnoj, koja je primjenjiva i kod odraslih i djece. Tehnički je nezahtjevna, nije skupa, dostupna je i primjenjiva u svakodnevnoj kliničkoj praksi. Uzorci *stratum corneum*-a daju informacije iz ciljnog organa koji je zahvaćen upalom a te navedene informacije nije moguće dobiti određivanjem biomarkera iz krvi budući da se time određuje samo tip sustavnog imunološkog odgovora. Razlike između lezionalne i nelezionalne kože su jasno pokazane, što klinički može biti primjenjivo u praksi u smislu praćenja primjene određene terapije. Nelezionalna koža se pokazala boljim indikatorom za težinu bolesti (SCORAD) te je pogodnija za praćenje sustavne terapije, dok lezionalna koža ima veliku važnost za procjenu učinkovitosti lokalne terapije. Ovo istraživanje predstavlja tek prvi korak u razvoju biomarkera u AD-u. Njihova vrijednost za određivanje težine bolesti i praćenje učinka terapije treba biti potvrđena u slijedećim studijama s bolesnicima šireg raspona jačine bolesti.

## 7. ZAKLJUČCI

- Koža bolesnika s AD-om pokazuje smanjenu funkciju barijere čak i u nelezionalnoj koži.
- Lezionalna koža pokazuje povišene pH vrijednosti i povećanu količinu SA.
- Bolesnici s povećanim brojem *Staphylococcus aureus* pokazuju oslabljenu kožnu barijeru, teži oblik bolesti i niže razine NMF-a.
- Rezultati ovog istraživanja pokazuju po prvi put nisku učestalost *FLG* mutacija s gubitkom funkcije i razinu filagrinskih degradacijskih produkata u hrvatskoj populaciji bolesnika s AD-om. Ovi rezultati potvrđuje hipotezu sjeverno-južnog gradijenta *FLG* mutacija i sporednu ulogu filagrina u etiologiji AD-a u hrvatskoj populaciji.
- Vrijednosti NMF-a u lezionalnoj koži bolesnika su značajno smanjene u usporedbi s NMF-om zdravih ispitanika vjerojatno kao posljedica Th2 posredovanog odgovora. Smanjene vrijednosti NMF-a su negativno povezane s funkcijom barijere (TEWL) što pridonosi suhoj i ljuskavoj koži, što je važno obilježje kože kod bolesnika s AD-om.
- Koža bolesnika s AD-om pokazuje poremećene vrijednosti slobodnih sfingoidnih baza, sfingozin- i sfinganin- pripadajućih ceramida, glukozil-ceramida i glukozil-kolesterola, što je za neke biomarkere pronađeno po prvi puta kod bolesnika s AD-om. Budući da su promjene izraženije u lezionalnoj koži te da je razina istraživanih lipida udružena s jačinom bolesti može se zaključiti da su nađene promjene stečene i uzrokovane imunološkim promjenama u koži. Povećane vrijednosti glukozil-kolesterola i glukozil-ceramida u koži bolesnika i njihova udruženost, upućuje na isti uzrok budući da je njihov metabolizam kontroliran istim enzimom ( $\beta$ -glukocerebrozidaza).
- Istraživani lipidi su značajno udruženi s vrijednostima TEWL-a što dokazuje njihovu važnost za kožnu barijeru.
- Razina biomarkera prirodene i stečene imunosti pokazuje značajnu razliku između zdrave i kože bolesnika. Opažene razlike su u većini slučajeva bile izraženije u lezionalnoj koži, međutim, nelezionalna koža korelira bolje s težinom bolesti. Najizražajnija razlika između zdrave i kože bolesnika je

nađena za markere prirodene imunosti, CXCL8 i IL-18, međutim značajne razlike nađene su i za Th1, Th2, TH22 i Th17 citokine.

- Nelezionalna koža bolesnika pokazuje smanjenu funkciju kožne barijere mjerene kao TEWL, promjene u razinama citokina i lipida, što upućuje na promjene i u klinički normalnoj koži. Nelezionalna koža pokazuje bolju korelaciju s težinom bolesti kada se analiziraju biomarkeri imunološkog odgovora, međutim za biomarkere kožne barijere, ceramide i NMF, korelacija s jačinom bolesti je bolja u lezionalnoj koži.
- Korelacija s težinom bolesti (SCORAD) znatno je bolja kad se kombiniraju biomarkeri kožne barijere i imunološkog odgovora što ukazuje na važnost njihove interakcije u AD-u.
- Metoda uzorkovanja *stratum corneuma* adhezivnom trakom je pogodna metoda za određivanje parametara funkcije barijere i imunološkog odgovora. Neinvazivna je, bezbolna, primjenjiva kod odraslih i djece u svakodnevnoj kliničkoj praksi.



## 8. KRATKI SADRŽAJ NA HRVATSKOM JEZIKU

U ovoj studiji određivani su genotipski i fenotipski biomarkeri kožne barijere kod bolesnika s atopijskim dermatitisom (AD). U studiju je uključeno 100 odraslih bolesnika i 50 zdravih ispitanika u razdoblju od siječnja 2016. do srpnja 2017. godine u Klinici za dermatovenerologiju KBC Zagreb. Za određivanje mutacije filagrinskog gena korišten je bukalni bris. Uzorkovanjem SC-a uzet je materijal za određivanje NMF-a, citokina i lipida. Funkcija barijere je mjerena određivanjem NMF-a, TEWL-a, pH i SA. Nađena je niska učestalost filagrinskih mutacija (4%) i normalne razine filagrinskih degradacijskih produkata čime zaključujemo da nedostatak filagrina ne igra značajnu ulogu u etiologiji AD-a u hrvatskoj populaciji. Lipidi pokazuju značajne razlike između bolesnika i zdravih ispitanika i povezanost s težinom bolesti i funkcijom kožne barijere. Promjene su izraženije u lezionalnoj koži.

Određivanje imunoloških markera potvrdilo je prisutnost velikog broja citokina prirodene i stečene imunosti. Najznačajnija razlika između zdrave i kože bolesnika nađena je za citokine prirodene imunosti IL-18 i CXCL8, ali značajne razlike nađene su i za Th1, Th2, Th17 i Th22 citokine. Razina citokina povezana je s težinom bolesti i funkcijom kožne barijere, a za razliku od lipida povezanost je izraženija u nelezionalnoj koži. Provedena studija pokazuje pogodnost SC u određivanje širokog spektra biomarkera koji mogu doprinijeti razvoju ciljane terapije prilagođene bolesniku.

## 9. KRATKI SADRŽAJ NA ENGLESKOM JEZIKU

### **Determination of genotypic and fenotypic biomarkers of skin barrier in skin of patients with atopic dermatitis**

Ružica Jurakić Tončić, 2020

We studied genotype and phenotype biomarkers of epidermal barrier in atopic dermatitis (AD) patients. Study population included 150 individuals, 100 patients and 50 healthy controls from 2016 to 2017 at University Department of Dermatovenereology Clinical Hospital Centre Zagreb. Buccal swab was used for genotypization and the other biomarkers were determined in stratum corneum (SC). We found low prevalence of filaggrin mutations (4%) and normal levels of filaggrin degradation products suggesting that filaggrin does not play major role in pathogenesis of AD in our cohort. Lipid levels are significantly changed when compared AD skin and healthy skin, and significant correlation with disease severity and barrier function was found. More prominent changes were found in lesional skin suggesting that majority of observed changes are secondary due to inflammation. We determined great number of cytokines of innate and adaptive immune response. The most significant difference between healthy and AD skin was found for innate immunity cytokines IL-18 and CXCL8, but significant response was found for also for Th1, Th2, Th17 and Th22. Cytokine levels were associated with disease severity and barrier function, and opposite to lipids, correlation was more prominent in non-lesional skin. This study confirmed that SC is suitable for determination of wide range of biomarkers which can contribute for development of precise, patient-based therapy.

## 10. POPIS LITERATURE

1. Bieber T, D'Erme AM, Akdis CA, Traidl-Hoffmann C, Lauener R, Schäppi G, *i sur*. Clinical phenotypes and endophenotypes of atopic dermatitis: Where are we, and where should we go? *J Allergy Clin Immunol*. 2017;139:S58-S64.
2. Chu H, Shin JU, Park CO, Lee H, Lee J, Lee KH. Clinical diversity of atopic dermatitis: A review of 5,000 patients at a single institute. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2017;9:158-168.
3. Pyun BY. Natural history and risk factors of atopic dermatitis in children. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2015;7:101-105.
4. Dharmage SC, Lowe AJ, Matheson MC, Burgess JA, Allen KJ, Abramson MJ. Atopic dermatitis and the atopic march revisited. *Allergy*. 2014 ;69:17-27.
5. Silverberg JI. Health care utilization, patient costs, and access to care in US adults with eczema: A population-based study. *JAMA Dermatol*. 2015;151:743–752.
6. Hanifin JM. Adult-onset atopic dermatitis: Fact or fancy? *Dermatol Clin*. 2017;35:299-302.
7. Weidinger S, Novak N. Atopic dermatitis. *Lancet*. 2016;387:1109-1122.
8. Burgess JA, Dharmage SC, Byrnes GB, Matheson MC, Gurrin LC, Wharton CL, *i sur*. Childhood eczema and asthma incidence and persistence: a cohort study from childhood to middle age. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;122:280-285.
9. Margolis JS, Abuabara K, Bilker W, Hoffstad O, Margolis DJ. Persistence of mild to moderate atopic dermatitis. *JAMA Dermatol*. 2014;150:593-600.
10. Mortz CG, Andersen KE, Dellgren C, Barington T, Bindslev-Jensen C. Atopic dermatitis from adolescence to adulthood in the TOACS cohort: prevalence, persistence and comorbidities. *Allergy*. 2015;70:836-845.
11. Stipic-Markovic A, Pevac B, Radulovic-Pevac M, Custovic A. Prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinitis, conjunctivitis and atopic eczema: ISAAC (International Study of Asthma and Allergies in Childhood) in a population of schoolchildren in Zagreb [in Croatian]. *Acta Med Croatica*. 2003;57:281-285.

12. Banac S, Tomulić KL, Ahel V, Rozmanić V, Simundić N, Zubović S, *i sur.* Prevalence of asthma and allergic diseases in Croatian children is increasing: survey study. *Croat Med J.* 2004;45:721-726.
13. Banac S, Rožmanić V, Manestar K, Korotaj-Rožmanić Z, Lah-Tomulić K, Vidović I, *i sur.* Rising trends in the prevalence of asthma and allergic diseases among school children in the north-west coastal part of Croatia. *J Asthma.* 2013;50:810-814.
14. Elias PM, Choi EH. Interactions among stratum corneum defensive functions. *Exp Dermatol.* 2005;14:719-726.
15. Kirschner N, Houdek P, Fromm M, Moll I, Brandner JM. Tight junctions form a barrier in human epidermis. *Eur J Cell Biol.* 2010;89:839-842.
16. Matsui T, Amagai M. Dissecting the formation, structure and barrier function of the stratum corneum. *Int Immunol.* 2015;27:269-280.
17. Niessen CM. Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol.* 2007;127:2525-2532.
18. De Benedetto A, Rafaels NM, McGirt LY, Ivanov AI, Georas SN, Cheadle C, *i sur.* Tight junction defects in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127:773-786.
19. Serre G, Mils V, Haftek M, Vincent C, Croute F, Réano A, *i sur.* Identification of late differentiation antigens of human cornified epithelia, expressed in re-organized desmosomes and bound to cross-linked envelope. *J Invest Dermatol.* 1991;97:1061-1072.
20. Segre JA. Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders. *J Clin Invest.* 2006;116:1150-1158.
21. Elias PM. Primary role of barrier dysfunction in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Exp Dermatol.* 2018;27:847-851.
22. Menon GK, Lee SE, Lee SH. An overview of epidermal lamellar bodies: Novel roles in biological adaptations and secondary barriers. *J Dermatol Sci.* 2018;92:10-17.
23. Rerknimitr P, Otsuka A, Nakashima C, Kabashima K. The etiopathogenesis of atopic dermatitis: barrier disruption, immunological derangement, and pruritus. *Inflamm Regen.* 2017;37:14.

24. Egawa G, Kabashima K. Multifactorial skin barrier deficiency and atopic dermatitis: essential topics to prevent the atopic march. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;138:350-358.
25. Thyssen JP, Kezic S. Causes of epidermal filaggrin reduction and their role in the pathogenesis of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;134:792-799.
26. Angelova-Fischer I, Mannheimer AC, Hinder A, Ruether A, Franke A, Neubert RH, *i sur.* Distinct barrier integrity phenotypes in filaggrin-related atopic eczema following sequential tape stripping and lipid profiling. *Exp Dermatol.* 2011;20:351-356.
27. Katagiri C, Sato J, Nomura J, Denda M. Changes in environmental humidity affect the water-holding property of the stratum corneum and its free amino acid content, and the expression of filaggrin in the epidermis of hairless mice. *J Dermatol Sci.* 2003;31:29-35.
28. Kezic S, Kemperman PM, Koster ES, de Jongh CM, Thio HB, Campbell LE, *i sur.* Loss-of-function mutations in the filaggrin gene lead to reduced level of natural moisturizing factor in the stratum corneum. *J Invest Dermatol.* 2008;128:2117-2119.
29. Steinert PM, Cantieri JS, Teller DC, Lonsdale-Eccles JD, Dale BA. Characterization of a class of cationic proteins that specifically interact with intermediate filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981;78:4097-4101.
30. Engebretsen KA, Bandier J, Kezic S, Riethmüller C, Heegaard NHH, Carlsen BC, *i sur.* Concentration of filaggrin monomers, its metabolites and corneocyte surface texture in individuals with a history of atopic dermatitis and controls. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2018;32:796-804.
31. Brown SJ, McLean WH. One remarkable molecule: filaggrin. *J Invest Dermatol.* 2012;132:751-762.
32. Landeck L, Jakasa I, Dapic I, Lutter R, Thyssen JP, Skov L, *i sur.* The effect of epidermal levels of urocanic acid on 25-hydroxyvitamin D synthesis and inflammatory mediators upon narrowband UVB irradiation. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2016;32:214-223.

33. Pendaries V, Malaisse J, Pellerin L, Le Lamer M, Nachat R, Kezic S, *i sur.* Knockdown of filaggrin in a three-dimensional reconstructed human epidermis impairs keratinocyte differentiation. *J Invest Dermatol.* 2014;134:2938-2946.
34. McLoone P, Simics E, Barton A, Norval M, Gibbs NK. An action spectrum for the production of cis-urocanic acid in human skin in vivo. *J Invest Dermatol.* 2005;124:1071-1074.
35. Mildner M, Jin J, Eckhart L, Kezic S, Gruber F, Barresi C, *i sur.* Knockdown of filaggrin impairs diffusion barrier function and increases UV sensitivity in a human skin model. *J Invest Dermatol.* 2010;130:2286–2294.
36. Sandilands A, Sutherland C, Irvine A, McLean WH. Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. *J Cell Sci.* 2009;122:1285–1294.
37. Sandilands A, Terron-Kwiatkowski A, Hull PR, O'Regan GM, Clayton TH, Watson RM, *i sur.* Comprehensive analysis of the gene encoding filaggrin uncovers prevalent and rare mutations in ichthyosis vulgaris and atopic eczema. *Nat Genet.* 2007;39:650–654.
38. Elias MS, Long HA, Newman CF, Wilson PA, West A, McGill PJ, *i sur.* Proteomic analysis of filaggrin deficiency identifies molecular signatures characteristic of atopic eczema. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;140:1299-1309.
39. Leyvraz C, Charles RP, Rubera I, Guitard M, Rotman S, Breiden B, *i sur.* The epidermal barrier function is dependent on the serine protease CAP1/Prss8. *J Cell Biol.* 2005;170:487–496.
40. Matsui T, Miyamoto K, Kubo A, Kawasaki H, Ebihara T, Hata K, *i sur.* SASPase regulates stratum corneum hydration through profilaggrin-to-filaggrin processing. *EMBO Mol Med.* 2011;3:320–333.
41. Manabe M, Sanchez M, Sun TT, Dale BA. Interaction of filaggrin with keratin filaments during advanced stages of normal human epidermal differentiation and in ichthyosis vulgaris. *Differentiation.* 1991;48:43–50.
42. Gruber R, Elias PM, Crumrine D, Lin TK, Brandner JM, Hachem JP, *i sur.* Filaggrin genotype in ichthyosis vulgaris predicts abnormalities in epidermal structure and function. *Am J Pathol.* 2011;178:2252–2263.
43. Candi E, Schmidt R, Melino G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6:328–340.

44. Harding CR, Aho S, Bosko CA. Filaggrin—revisited. *Int J Cosmet Sci.* 2013;35:412–423.
45. Palmer CN, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, Lee SP, *i sur.* Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet.* 2006;38:441–446.
46. Løset M, Brown SJ, Saunes M, Hveem K. Genetics of atopic dermatitis: from DNA sequence to clinical relevance. *Dermatology.* 2019;235:355-364.
47. Gan SQ, McBride OW, Idler WW, Markova N, Steinert PM. Organization, structure, and polymorphisms of the human profilaggrin gene. *Biochemistry.* 1990;29:9432–9440.
48. Brown SJ, Kroboth K, Sandilands A, Campbell LE, Pohler E, Kezic S, *i sur.* Intragenic copy number variation within filaggrin contributes to the risk of atopic dermatitis with a dose-dependent effect. *J Invest Dermatol.* 2012;132:98-104.
49. Pellerin L, Paul C, Schmitt AM, Serre G, Simon M. Bleomycin hydrolase downregulation in lesional skin of adult atopic dermatitis patients is independent of FLG gene mutations. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;134:1459-1461.
50. Kezic S, O'Regan GM, Yau N, Sandilands A, Chen H, Campbell LE *i sur.* Levels of filaggrin degradation products are influenced by both filaggrin genotype and atopic dermatitis severity. *Allergy.* 2011;66:934-940.
51. Lynley AM, Dale BA. The characterization of human epidermal filaggrin. A histidine-rich, keratin filament-aggregating protein. *Biochim Biophys Acta.* 1983;744:28–35.
52. Hoste E, Kemperman P, Devos M, Denecker G, Kezic S, Yau N, *i sur.* Caspase-14 is required for filaggrin degradation to natural moisturizing factors in the skin. *J Invest Dermatol.* 2011;131:2233–2241.
53. Kamata Y, Taniguchi A, Yamamoto M, Nomura J, Ishihara K, Takahara H, *i sur.* Neutral cysteine protease bleomycin hydrolase is essential for the breakdown of deiminated filaggrin into amino acids. *J Biol Chem.* 2009;284:12829–12836.

54. Nylander-Lundqvist E, Back O, Egelrud T. IL-1 beta activation in human epidermis. *J Immunol.* 1996;157:1699–1704.
55. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Ann Rev Immunol.* 2009;27:519–550.
56. Jungersted JM, Scheer H, Mempel M, Baurecht H, Cifuentes L, Høgh JK, *i sur.* Stratum corneum lipids, skin barrier function and filaggrin mutations in patients with atopic eczema. *Allergy.* 2010;65:911–918.
57. Miajlovic H, Fallon PP, Irvine AD, Foster TJ. Effect of filaggrin breakdown products on growth of and protein expression by *Staphylococcus aureus*. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;126:1184-1190.
58. Brauweiler AM, Bin L, Kim BE, Oyoshi MK, Geha RS, Goleva E, *i sur.* Filaggrin-dependent secretion of sphingomyelinase protects against staphylococcal alpha-toxin-induced keratinocyte death. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;131:421–427.
59. Cork MJ, Danby SG, Vasilopoulos Y, Hadgraft J, Lane ME, Moustafa M, *i sur.* Epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol.* 2009;129:1892-1908.
60. Ovaere P, Lippens S, Vandenabeele P, Declercq W. The emerging roles of serine protease cascades in the epidermis. *Trends Biochem Sci.* 2009;34:453–463.
61. Brattsand M, Stefansson K, Lundh C, Haasum Y, Egelrud T. A proteolytic cascade of kallikreins in the stratum corneum. *J Invest Dermatol.* 2005;124:198-203.
62. Sarri CA, Roussaki-Schulze A, Vasilopoulos Y, Zafiriou E, Patsatsi A, Stamatis C, *i sur.* Netherton Syndrome: A genotype-phenotype review. *Mol Diagn Ther.* 2017;21:137-152.
63. Dežman K, Korošec P, Rupnik H, Rijavec M. SPINK5 is associated with early-onset and CHI3L1 with late-onset atopic dermatitis. *Int J Immunogenet.* 2017;44:212-218.
64. van Smeden J, Bouwstra JA. Stratum corneum lipids: their role for the skin barrier function in healthy subjects and atopic dermatitis patients. *Curr Probl Dermatol.* 2016;49:8-26.



65. van Smeden J, Boiten WA, Hankemeier T, Rissmann R, Bouwstra JA, Vreeken RJ. Combined LC/MS-platform for analysis of all major stratum corneum lipids, and the profiling of skin substitutes. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1841:70–79.
66. Motta S, Monti M, Sesana S, Caputo R, Carelli S, Ghidoni R. Ceramide composition of the psoriatic scale. *Biochim Biophys Acta*. 1993;1182:147–151.
67. Madison KC, Swartzendruber DC, Wertz PW, Downing DT. Presence of intact intercellular lipid lamellae in the upper layers of the stratum corneum. *J Invest Dermatol*. 1987;88:714–718.
68. Bouwstra JA, Gooris GS, van der Spek JA, Bras W. Structural investigations of human stratum corneum by small-angle X-ray scattering. *J Invest Dermatol*. 1991;97:1005–1012.
69. Garson JC, Doucet J, Leveque JL, Tsoucaris G. Oriented structure in human stratum corneum revealed by X-ray diffraction. *J Invest Dermatol*. 1991;96:43–49.
70. Mojumdar EH, Helder RW, Gooris GS, Bouwstra JA. Monounsaturated fatty acids reduce the barrier of stratum corneum lipid membranes by enhancing the formation of a hexagonal lateral packing. *Langmuir*. 2014;30:6534–6543.
71. Ishikawa J, Narita H, Kondo N, Hotta M, Takagi Y, Masukawa Y, *i sur*. Changes in the ceramide profile of atopic dermatitis patients. *J Invest Dermatol*. 2010;130:2511–2514.
72. Imokawa G, Abe A, Jin K, Higaki Y, Kawashima M, Hidano A. Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: an etiologic factor in atopic dry skin? *J Invest Dermatol*. 1991;96:523–526.
73. Yamamoto A, Serizawa S, Ito M, Sato Y. Stratum corneum lipid abnormalities in atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res*. 1991;283:219–223.
74. Farwanah H, Raith K, Neubert RH, Wohlrab J. Ceramide profiles of the uninvolved skin in atopic dermatitis and psoriasis are comparable to those of healthy skin. *Arch Dermatol Res*. 2005;296:514–521.

75. Uche LE, Gooris GS, Bouwstra JA, Beddoes CM. Barrier capability of skin lipid models: effect of ceramides and free fatty acid composition. *Langmuir*. 2019;35:15376-15388.
76. Jungersted JM, Agner T. Eczema and ceramides: an update. *Contact Dermatitis*. 2013;69:65-71.
77. Tawada C, Kanoh H, Nakamura M, Mizutani Y, Fujisawa T, Banno Y, *i sur*. Interferon-gamma decreases ceramides with long-chain fatty acids: possible involvement in atopic dermatitis and psoriasis. *J Invest Dermatol*. 2014;134:712–718.
78. Macheleidt O, Kaiser HW, Sandhoff K. Deficiency of epidermal protein-bound omega-hydroxyceramides in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*. 2002;119:166–173.
79. Pilgram GS, Vissers DC, van der Meulen H, Pavel S, Lavrijsen SP, Bouwstra JA, *et al*. Aberrant lipid organization in stratum corneum of patients with atopic dermatitis and lamellar ichthyosis. *J Invest Dermatol*. 2001;117:710–717.
80. Janssens M, van Smeden J, Gooris GS, Bras W, Portale G, Caspers PJ, *i sur*. Increase in short-chain ceramides correlates with an altered lipid organization and decreased barrier function in atopic eczema patients. *J Lipid Res*. 2012;53:2755–2766.
81. van Smeden J, Janssens M, Kaye EC, Caspers PJ, Lavrijsen AP, Vreeken RJ, *i sur*. The importance of free fatty acid chain length for the skin barrier function in atopic eczema patients. *Exp Dermatol*. 2014;23:45–52.
82. Fartasch M, Bassukas ID, Diepgen TL. Disturbed extruding mechanism of lamellar bodies in dry non-eczematous skin of atopics. *Br J Dermatol*. 1992;127:221–227.
83. Elias PM, Schmuth M. Abnormal skin barrier in the etiopathogenesis of atopic dermatitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2009;9:437–446.
84. Janssens M, van Smeden J, Puppels GJ, Lavrijsen AP, Caspers PJ, Bouwstra JA. Lipid to protein ratio plays an important role in the skin barrier function in patients with atopic eczema. *Br J Dermatol*. 2014;170:1248–1255.

85. Elias PM, Sun R, Eder AR, Wakefield JS, Man MQ. Treating atopic dermatitis at the source: corrective barrier repair therapy based upon new pathogenic insights. *Exp Rev Dermatol*. 2013;8:27–36.
86. Park YH, Jang WH, Seo JA, Park M, Lee TR, Kim DK, *i sur*. Decrease of ceramides with very long-chain fatty acids and downregulation of elongases in a murine atopic dermatitis model. *J Invest Dermatol*. 2012;132:476–479.
87. Jennemann R, Rabionet M, Gorgas K, Epstein S, Dalpke A, Rothermel U, *i sur*. Loss of ceramide synthase 3 causes lethal skin barrier disruption. *Hum Mol Genet*. 2012;21:586–608.
88. Jensen JM, Folster-Holst R, Baranowsky A, Schunck M, Winoto-Morbach S, Neumann C, *i sur*. Impaired sphingomyelinase activity and epidermal differentiation in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*. 2004;122:1423–1431.
89. Czarnewicki T, Krueger JG, Guttman-Yassky E. Skin barrier and immune dysregulation in atopic dermatitis: an evolving story with important clinical implications. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2014;2:371–9.
90. Malik K, Heitmiller KD, Czarnewicki T. An update on the pathophysiology of atopic dermatitis. *Dermatol Clin*. 2017;35:317-326.
91. Hradetzky S, Werfel, T and Rösner LM. Autoallergy in atopic dermatitis. *Allergo J Int*. 2015;24:16–22.
92. D’Auria E, Banderali G, Barberi S, Gualandri L, Pietra B, Riva E, *i sur*. Atopic dermatitis: recent insight on pathogenesis and novel therapeutic target. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2016;34:98–108.
93. Williams MR, Gallo RL. The role of the skin microbiome in atopic dermatitis. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2015;15:65.
94. Kuo IH, Carpenter-Mendini A, Yoshida T, McGirt LY, Ivanov AI, Barnes KC, *i sur*. Activation of epidermal toll-like receptor 2 enhances tight junction function: implications for atopic dermatitis and skin barrier repair. *J Invest Dermatol*. 2013; 133:988–98.
95. Simon D, Wollenberg A, Renz H, Simon HU. Atopic dermatitis: Collegium Internationale Allergologicum (CIA) update 2019. *Int Arch Allergy Immunol*. 2019;178:207-218.

96. Suárez-Fariñas M, Tintle SJ, Shemer A, Chiricozzi A, Nograles K, Cardinale I, *i sur*. Nonlesional atopic dermatitis skin is characterized by broad terminal differentiation defects and variable immune abnormalities. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127:954–964.
97. Gittler JK, Shemer A, Suárez-Fariñas M, Fuentes-Duculan J, Gulewicz KJ, Wang CQ, *i sur*. Progressive activation of T(H)2/T(H)22 cytokines and selective epidermal proteins characterizes acute and chronic atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130:1344–1354.
98. He JQ, Chan-Yeung M, Becker AB, Dimich-Ward H, Ferguson AC, Manfreda J, *i sur*. Genetic variants of the IL13 and IL4 genes and atopic diseases in at-risk children. *Genes Immun*. 2003;4:385–389.
99. Akdis M, Akdis CA, Weigl L, Disch R, Blaser K. Skin-homing, CLA<sup>+</sup> memory T cells are activated in atopic dermatitis and regulate IgE by an IL-13-dominated cytokine pattern: IgG4 counter-regulation by CLA<sup>-</sup> memory T cells. *J Immunol*. 1997;159:4611–4619.
100. Kubo A, Nagao K, Yokouchi M, Sasaki H, Amagai M. External antigen uptake by Langerhans cells with reorganization of epidermal tight junction barriers. *J Exp Med*. 2009;206:2937-2946.
101. Mjosberg J, Eidsmo L. Update on innate lymphoid cells in atopic and nonatopic inflammation in the air- ways and skin. *Clin Exp Allergy*. 2014;44:1033–1043.
102. Zheng T, Oh MH, Oh SY, Schroeder JT, Glick AB, Zhu Z. Transgenic expression of interleukin-13 in the skin induces a pruritic dermatitis and skin remodeling. *J Invest Dermatol*. 2009;129:742-51.
103. Schmid-Grendelmeier P, Altnauer F, Fischer B, Bizer C, Straumann A, Menz G, *i sur*. Eosinophils express functional IL-13 in eosinophilic inflammatory diseases. *J Immunol* 2002;169:1021-1027.
104. Punnonen J, Yssel H, de Vries JE. The relative contribution of IL-4 and IL-13 to human IgE synthesis induced by activated CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T cells. *J Allergy Clin Immunol*. 1997;100:792-801.
105. Kraft M, Worm M. Dupilumab in the treatment of moderate-to-severe atopic dermatitis. *Expert Rev Clin Immunol*. 2017;13:301-310.

106. Ma L, Xue HB, Guan XH, Shu CM, Zhang JH, Yu J. Possible pathogenic role of T helper type 9 cells and interleukin (IL)-9 in atopic dermatitis. *Clin Exp Immunol.* 2014;175:25–31.
107. Wang D, Beck LA. Immunologic targets in atopic dermatitis and emerging therapies: an update. *Am J Clin Dermatol.* 2016;17:425–43.
108. Eyerich K, Pennino D, Scarponi C, Foerster S, Nasorri F, Behrendt H, *i sur.* IL-17 in atopic eczema: linking allergen-specific adaptive and microbial-triggered innate immune response. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;123:59-66.
109. Nograles KE, Zaba LC, Shemer A, Fuentes-Duculan J, Cardinale I, Kikuchi T, *i sur.* IL-22-producing "T22" T cells account for upregulated IL-22 in atopic dermatitis despite reduced IL-17-producing TH17 T cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;123:1244-1252.
110. Brunner PM, Israel A, Zhang N, Leonard A, Wen HC, Huynh T, *i sur.* Early-onset pediatric atopic dermatitis is characterized by TH2/TH17/TH22-centered inflammation and lipid alterations. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;141:2094-2106.
111. Dhingra N, Guttman-Yassky E. A possible role for IL-17A in establishing Th2 inflammation in murine models of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol.* 2014;134:2071–2074.
112. Rabenhorst A, Hartmann K. Interleukin-31: a novel diagnostic marker of allergic diseases. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2014;14:423.
113. Gutowska-Owsiak D, Schaupp AL, Salimi M, Selvakumar TA, McPherson T, Taylor S, *i sur.* IL-17 downregulates filaggrin and affects keratinocyte expression of genes associated with cellular adhesion. *Exp Dermatol.* 2012;21:104–110.
114. Howell MD, Kim BE, Gao P, Grant AV, Boguniewicz M, DeBenedetto A, *i sur.* Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;120:150–155.
115. Czarnowicki T, Gonzalez J, Shemer A, Malajian D, Xu H, Zheng X, *i sur.* Severe atopic dermatitis is characterized by selective expansion of circulating TH2/TC2 and TH22/TC22, but not TH17/TC17, cells within the skin-homing T-cell population. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;136:104–115.

116. Di YH, Ma L, Qi RQ, SUN XD, Huo W, Zhang L, *i sur.* T helper 1 and T helper 2 cytokines differentially modulate expression of filaggrin and its processing proteases in human keratinocytes. *Chin Med J (Engl)*. 2016;129:295–303.
117. Gutowska-Owsiak D, Ogg GS. Cytokine regulation of the epidermal barrier. *Clin Exp Allergy*. 2013;43:586-598.
118. Sehra S, Yao Y, Howell MD, Nguyen ET, Kansas GS, Leung DY, *i sur.* IL-4 regulates skin homeostasis and the predisposition toward allergic skin inflammation. *J Immunol*. 2010;184:3186–3190.
119. Kim BE, Leung DY, Boguniewicz M, Howell MD. Loricrin and involucrin expression is down-regulated by Th2 cytokines through STAT-6. *Clin Immunol*. 2008;126:332–337.
120. Gutowska-Owsiak D, Schaupp AL, Salimi M, Taylor S, Ogg GS. Interleukin-22 downregulates filaggrin expression and affects expression of profilaggrin processing enzymes. *Br J Dermatol*. 2011;165:492-498.
121. Hatano Y, Terashi H, Arakawa S, Katagiri K. Interleukin-4 suppresses the enhancement of ceramide synthesis and cutaneous permeability barrier functions induced by tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma in human epidermis. *J Invest Dermatol* 2005;124:786-792.
122. Danso MO, van Drongelen V, Mulder A, van Esch J, Scott H, van Smeden J, *i sur.* TNF- $\alpha$  and Th2 cytokines induce atopic dermatitis-like features on epidermal differentiation proteins and stratum corneum lipids in human skin equivalents. *J Invest Dermatol*. 2014;134:1941-1950.
123. Kisich KO, Carspecken CW, Fieve S, Boguniewicz M, Leung DY. Defective killing of *Staphylococcus aureus* in atopic dermatitis is associated with reduced mobilization of human beta-defensin-3. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;122:62–68.
124. Howell MD, Gallo RL, Boguniewicz M, Jones JF, Wong C, Streib JE, *i sur.* Cytokine milieu of atopic dermatitis skin subverts the innate immune response to vaccinia virus. *Immunity*. 2006;24:341–348.

125. Ong PY, Ohtake T, Brandt C, Strickland I, Boguniewicz M, Ganz T, *i sur.* Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N Engl J Med.* 2002;347:1151–1160.
126. Williams MR, Gallo RL. Evidence that human skin microbiome dysbiosis promotes atopic dermatitis. *J Invest Dermatol.* 2017;137:2460-2461.
127. Ong PY. Recurrent MRSA skin infections in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2014;2:396-399.
128. Goo J, Ji JH, Jeon H, Kim MJ, Jeon SY, Cho MY, *i sur.* Expression of antimicrobial peptides such as LL-37 and hBD-2 in nonlesional skin of atopic individuals. *Pediatr Dermatol.* 2010;27:341-348.
129. Nowicka D, Grywalska E. The role of immune defects and colonization of *Staphylococcus aureus* in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Anal Cell Pathol (Amst).* 2018;2018:1956403.
130. Callewaert C, Nakatsuji T, Knight R, Kosciolk T, Vrbanac A, Kotol P, *i sur.* IL-4R $\alpha$  blockade by dupilumab decreases *Staphylococcus aureus* colonization and increases microbial diversity in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol.* 2019 Jun 25. pii: S0022-202X(19)31789-0. doi: 10.1016/j.jid.2019.05.024. [Epub ahead of print]
131. Josse J, Laurent F, Diot A. Staphylococcal adhesion and host cell invasion: Fibronectin-binding and other mechanisms. *Front Microbiol.* 2017;8:2433.
132. Cho SH, Strickland I, Tomkinson A, Fehring AP, Gelfand EW, Leung DY. Preferential binding of *Staphylococcus aureus* to skin sites of Th2-mediated inflammation in a murine model. *J Invest Dermatol.* 2001;116:658–663.
133. Ohnishi Y, Okino N, Ito M, Imayama S. Ceramidase activity in bacterial skin flora as a possible cause of ceramide deficiency in atopic dermatitis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999;6:101–104.
134. Saline M, Rödström KE, Fischer G, Orekhov VY, Karlsson BG, Lindkvist-Petersson K. The structure of superantigen complexed with TCR and MHC reveals novel insights into superantigenic T cell activation. *Nat Commun.* 2010;1:119.

135. Akiyama H, Toi Y, Kanzaki H, Tada J, Arata J. Prevalence of producers of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin-1 among *Staphylococcus aureus* strains isolated from atopic dermatitis lesions. *Arch Dermatol Res.* 1996;288:418-420.
136. Mcfadden JP, Noble WC, Camp RDR. Superantigenic exotoxin-secreting potential of staphylococci isolated from atopic eczematous skin. *Br J Dermatol.* 1993;128:631–632.
137. Bunikowski R, Mielke ME, Skarabis H, Worm M, Anagnostopoulos I, Kolde G, *i sur.* Evidence for a disease-promoting effect of *Staphylococcus aureus*-derived exotoxins in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;105:814-819.
138. Nutten S. Atopic dermatitis: Global epidemiology and risk factors. *Ann Nutr Metab.* 2015;66:8-16.
139. Sonkoly E, Janson P, Majuri ML, Savinko T, Fyhrquist N, Eidsmo L, *i sur.* MiR-155 is overexpressed in patients with atopic dermatitis and modulates T-cell proliferative responses by targeting cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;126:581–589.
140. Sonkoly E, Wei T, Janson PC, Sääf A, Lundeberg L, Tengvall-Linder M, *i sur.* MicroRNAs: novel regulators involved in the pathogenesis of psoriasis? *PLoS One.* 2007;2:e610.
141. Luo Y, Zhou B, Zhao M, Lu Q. Promoter demethylation contributes to TSLP overexpression in skin lesions of patients with atopic dermatitis. *Clin Exp Dermatol.* 2014;39:48–53.
142. Rodriguez E, Baurecht H, Wahn AF, Kretschmer A, Hotze M, Zeilinger S, *i sur.* An integrated epigenetic and transcriptomic analysis reveals distinct tissue-specific patterns of DNA methylation associated with atopic dermatitis. *J Invest Dermatol.* 2014;134:1873–1883.
143. Yarbrough KB, Neuhaus KJ, Simpson EL. The effects of treatment on itch in atopic dermatitis. *Dermatol Ther.* 2013;26:110-119.
144. Rukwied R, Lischetzki G, McGlone F, Heyer G, Schmelz M. Mast cell mediators other than histamine induce pruritus in atopic dermatitis patients: a dermal microdialysis study. *Br J Dermatol.* 2000;142:1114–1120.



145. Legendre L, Barnetche T, Mazereeuw-Hautier J, Meyer N, Murrell D, Paul C. Risk of lymphoma in patients with atopic dermatitis and the role of topical treatment: a systematic review and meta-analysis. *J Am Acad Dermatol.* 2015;72:992–1002
146. Arellano FM, Arana A, Wentworth CE, Fernández-Vidaurre C, Schlienger RG, Conde E. Lymphoma among patients with atopic dermatitis and/or treated with topical immunosuppressants in the United Kingdom. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;123:1111–1116.
147. Josephs DH, Spicer JF, Corrigan CJ, Gould HJ, Karagiannis SN. Epidemiological associations of allergy, IgE and cancer. *Clin Exp Allergy.* 2013;43:1110–1123.
148. Chockalingam R, Downing C, Tying SK. Cutaneous squamous cell carcinomas in organ transplant recipients. *J Clin Med.* 2015;4:1229–1239.
149. Simon D, Bieber T. Systemic therapy for atopic dermatitis. *Allergy.* 2014;69:46–55.
150. Paller A, Jaworski JC, Simpson EL, Boguniewicz M, Russell JJ, Block JK, *i sur.* Major comorbidities of atopic dermatitis: beyond allergic disorders. *Am J Clin Dermatol.* 2018;19:821-838.
151. Ascott A, Mulick A, Yu AM, Prieto-Merino D, Schmidt M, Abuabara K, *i sur.* Atopic eczema and major cardiovascular outcomes: A systematic review and meta-analysis of population-based studies. *J Allergy Clin Immunol.* 2019;143:1821-1829.
152. Thyssen JP, Johansen JD, Linneberg A, Menne T. The epidemiology of hand eczema in the general population—prevalence and main findings. *Contact Dermatitis.* 2010;62:75–87.
153. Thyssen JP, McFadden JP, Kimber I. The multiple factors affecting the association between atopic dermatitis and contact sensitization. *Allergy.* 2014;69:28–36.
154. Hanifin JM, Raika G. Diagnostic features of atopic eczema. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh).* 1980; 92:44–47.
155. Williams H, Burney PGJ, Hay RJ, Archer CB, Shipley MJ, Hunter JJ, *i sur.* The U.K. Working Party's diagnostic criteria for atopic dermatitis I. derivation

- of a minimum set of discriminators for atopic dermatitis. *Br J Dermatol*. 1994;131:383–396.
156. Suárez-Fariñas M, Dhingra N, Gittler J, Shemer A, Cardinale I, de Guzman Strong C, *i sur*. Intrinsic atopic dermatitis shows similar TH2 and higher TH17 immune activation compared with extrinsic atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132:361-70.
157. Baum S, Porat S, Lyakhovitsky A, Astman N, Barzilai A. Adult atopic dermatitis in hospitalized patients: Comparison between those with childhood-onset and late-onset disease. *Dermatology*. 2019;235:365-371.
158. Rupnik H, Rijavec M, Korošec P. Filaggrin loss-of-function mutations are not associated with atopic dermatitis that develops in late childhood or adulthood. *Br J Dermatol*. 2015;172:455-461.
159. Severity scoring of atopic dermatitis: the SCORAD index. Consensus Report of the European Task Force on Atopic Dermatitis. *Dermatology*. 1993;186:23-31.
160. Chopra R, Vakharia PP, Sacotte R, Patel N, Immaneni S, White T, *i sur*. Severity strata for Eczema Area and Severity Index (EASI), modified EASI, Scoring Atopic Dermatitis (SCORAD), objective SCORAD, Atopic Dermatitis Severity Index and body surface area in adolescents and adults with atopic dermatitis. *Br J Dermatol*. 2017;177:1316-1321.
161. Wollenberg A, Barbarot S, Bieber T, Christen-Zaech S, Deleuran M, Fink-Wagner A, *i sur*. Consensus-based European guidelines for treatment of atopic eczema (atopic dermatitis) in adults and children: part I. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2018;32:657-682.
162. Wollenberg A, Barbarot S, Bieber T, Christen-Zaech S, Deleuran M, Fink-Wagner A, *i sur*. Consensus-based European guidelines for treatment of atopic eczema (atopic dermatitis) in adults and children: part II. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2018;32:850-878.
163. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*. 2013;310:2191-2194.

164. Lynne Shore Garcia; Henry D Isenberg. Clinical microbiology procedures handbook, 3rd ed. Washington, DC: ASM Press; 2010.
165. Sandilands A, Smith FJ, Irvine AD, McLean WH. Filaggrin's fuller figure: a glimpse into the genetic architecture of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol.* 2007;127:1282–1284.
166. Dapic I, Jakasa I, Yau NLH, Kezic S, Kammeyer A. Evaluation of an HPLC method for the determination of natural moisturizing factors in the human stratum corneum. *Anal Lett.* 2013;46:2133–44.
167. Gold H, Mirzaian M, Dekker N, Ferraz MJ, Ferraz MJ, Lugtenburg J, Codée JDC, *i sur.* Quantification of Globotriaosylsphingosine in Plasma and Urine of Fabry Patients by Stable Isotope Ultraperformance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry.* 2013; 59:547–556.
168. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc B.* 1995; 57:289–300.
169. Tokura Y. Extrinsic and intrinsic types of atopic dermatitis. *J Dermatol Sci.* 2010;58:1-7.
170. Thyssen JP, Elias PM. It remains unknown whether filaggrin gene mutations evolved to increase cutaneous synthesis of vitamin D. *Genome Biol Evol.* 2017;9:900-901.
171. Pipinić IS, Macan J. [Filaggrin gene null-mutations and atopic diseases]. *Acta Med Croatica.* 2015;69:467-73.
172. Drislane C, Irvine AD. The role of filaggrin in atopic dermatitis and allergic disease. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2019 Oct 14. pii: S1081-1206(19)31289-X. doi: 10.1016/j.anai.2019.10.008. [Epub ahead of print]
173. Rodriguez E, Baurecht H, Herberich E, Wagenpfeil S, Brown SJ, Cordell HJ, *i sur.* Meta-analysis of filaggrin polymorphisms in eczema and asthma: robust risk factors in atopic disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;123:1361–1370. e1367
174. Weidinger S, O'Sullivan M, Illig T, Baurecht H, Depner M, Rodriguez E, *i sur.* Filaggrin mutations, atopic eczema, hay fever, and asthma in children. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121:1203–1209.

175. Wong XFCC, Denil SLIJ, Foo JN, Chen H, Tay ASL, Haines RL *i sur.* Array-based sequencing of filaggrin gene for comprehensive detection of disease-associated variants. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;141:814-816.
176. O'Regan G, Sandilands A, McLean H, Irvine AD. Filaggrin in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;122:689–693.
177. Brown SJ, Relton CL, Lia H Zhao Y, Sandilands A, Wilson IJ, *et al.* Filaggrin null mutations and childhood atopic eczema: a population based case-control study. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121:940–946.
178. McLean WH. Filaggrin failure – from ichthyosis vulgaris to atopic eczema and beyond. *Br J Dermatol.* 2016;175:4–7.
179. Thyssen JP, Godoy-Gijon E, Elias PM. Ichthyosis vulgaris: the filaggrin mutation disease. *Br J Dermatol.* 2013;168:1155-1166.
180. Dębińska A, Danielewicz H, Drabik-Chamerska A, Kalita D, Boznański A. Filaggrin loss-of-function mutations as a predictor for atopic eczema, allergic sensitization and eczema-associated asthma in Polish children population. *Adv Clin Exp Med.* 2017;26:991-998.
181. Woźniak M, Kaczmarek-Skamira E, Romańska-Gocka K, Czajkowski R, Kałużna L, Zegarska B. The prevalence of mutations in the gene encoding filaggrin in the population of Polish patients with atopic dermatitis. *Postepy Dermatol Alergol.* 2016;33:128-133.
182. Giardina E, Paolillo N, Sinibaldi C, Novelli G. R501X and 2282del4 filaggrin mutations do not confer susceptibility to psoriasis and atopic dermatitis in Italian patients. *Dermatology.* 2008;216:83–84.
183. Cascella R, Foti Cuzzola V, Lepre T Galli E, Moschese V, Chini L, *i sur.* Full sequencing of the FLG gene in Italian patients with atopic eczema: evidence of new mutations, but lack of an association. *J Invest Dermatol.* 2011;131:982–984.
184. González-Tarancón R, Sanmartín R, Lorente F, Salvador-Rupérez E, Hernández-Martín A, Rello L, *i sur.* Prevalence of FLG loss-of-function mutations R501X, 2282del4, and R2447X in Spanish children with atopic dermatitis. *Pediatr Dermatol.* 2019 Oct 21. doi: 10.1111/pde.14025. [Epub ahead of print].

185. Schaarschmidt H, Ellinghaus D, Rodríguez E, Kretschmer A, Baurecht H, Lipinski S *i sur.* A genome-wide association study reveals 2 new susceptibility loci for atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;136:802-806.
186. Feuillie C, Vitry P, McAleer MA, Kezic S, Irvine AD, Geoghegan JA, *i sur.* Adhesion of *Staphylococcus aureus* to corneocytes from atopic dermatitis patients is controlled by natural moisturizing factor levels. *MBio.* 2018 14;9(4).
187. Kezic S, Novak N, Jakasa I, Jungersted JM, Simon M, Brandner JM, *i sur.* Skin barrier in atopic dermatitis. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2014;19:542-556.
188. Joo KM, Hwang JH, Bae S, Nahm DH, Park HS, Ye YM, *i sur.* Relationship of ceramide-, and free fatty acid-cholesterol ratios in the stratum corneum with skin barrier function of normal, atopic dermatitis lesional and non-lesional skins. *J Dermatol Sci.* 2015;77:71-74.
189. Boiten W, Absalah S, Vreeken R, Bouwstra J, van Smeden J. Quantitative analysis of ceramides using a novel lipidomics approach with three dimensional response modelling. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1861:1652-1661.
190. Strum JC, Ghosh S, Bell RM. Lipid second messengers. A role in cell growth and cell cycle progression. *Adv Exp Med Biol.* 1997;407:421–431.
191. Loiseau N, Obata Y, Moradian S, Sano H, Yoshino S, Aburai K, *i sur.* Altered sphingoid base profiles predict compromised membrane structure and permeability in atopic dermatitis. *J Dermatol Sci.* 2013;72:296-303.
192. Martin GE, Boudreau RM, Couch C, Becker KA, Edwards MJ, Caldwell CC, *i sur.* Sphingosine's role in epithelial host defense: A natural antimicrobial and novel therapeutic. *Biochimie.* 2017;141:91-96.
193. Fischer CL, Walters KS, Drake DR, Blanchette DR, Dawson DV, Brogden KA, Wertz PW. Sphingoid bases are taken up by *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* and induce ultrastructural damage. *Skin Pharmacol Physiol.* 2013;26:36-44.

194. Danso M, Boiten W, van Drongelen V, Gmelig Meijling K, Gooris G, El Ghalbzouri A, *i sur.* Altered expression of epidermal lipid bio-synthesis enzymes in atopic dermatitis skin is accompanied by changes in stratum corneum lipid composition. *J Dermatol Sci.* 2017;88:57-66.
195. Takagi Y, Kriehuber E, Imokawa G, Elias PM, Holleran WM.  $\beta$ -Glucocerebrosidase activity in mammalian stratum corneum. *J. Lipid Res.* 1999;40:861–869.
196. Mauro T, Holleran W, Grayson S, Gao W, Man M, Kriehuber E, *i sur.* Barrier recovery is impeded at neutral pH, independent of ionic effects: implications for extracellular lipid processing. *Arch Dermatol Res.* 1998;290:215–222.
197. Tsakok T, Woolf R, Smith CH, Weidinger S, Flohr C. Atopic dermatitis: the skin barrier and beyond. *Br J Dermatol.* 2019;180:464-474.
198. Tanaka T, Tsutsui H, Yoshimoto T, Kotani M, Matsumoto M, Fujita A, *i sur.* Interleukin-18 is elevated in the sera from patients with atopic dermatitis and from atopic dermatitis model mice, NC/Nga. *Int Arch Allergy Immunol.* 2001;125:236-240.
199. McAleer MA, Jakasa I, Hurault G, Sarvari P, McLean WHI, Tanaka RJ, *i sur.* Systemic and stratum corneum biomarkers of severity in infant atopic dermatitis include markers of innate and T helper cell-related immunity and angiogenesis. *Br J Dermatol.* 2019;180:586-596.
200. Hulshof L, Hack DP, Hasnoe QCJ, Dontje B, Jakasa I, Riethmüller C, *i sur.* A minimally invasive tool to study immune response and skin barrier in children with atopic dermatitis. *Br J Dermatol.* 2019;180:621-630.
201. Koppes SA, Brans R, Ljubojevic Hadzavdic S, Frings-Dresen MH, Rustemeyer T, Kezic S. Stratum corneum tape stripping: Monitoring of inflammatory mediators in atopic dermatitis patients using topical therapy. *Int Arch Allergy Immunol.* 2016;170:187-193.
202. Thijs J, Krastev T, Weidinger S, Buckens CF, de Bruin-Weller M, Bruijnzeel-Koomen C, *i sur.* Biomarkers for atopic dermatitis: a systematic review and meta-analysis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol-* 2015;15:453-460.

203. Szegedi K, Lutter R, Res PC, Bos JD, Luiten RM, Kezic S, *i sur.* Cytokine profiles in interstitial fluid from chronic atopic dermatitis skin. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2015;29:2136-2144.
204. Brunner PM, Israel A, Zhang N, Leonard A, Wen HC, Huynh T, *i sur.* Early-onset pediatric atopic dermatitis is characterized by T<sub>H</sub>2/T<sub>H</sub>17/T<sub>H</sub>22-centered inflammation and lipid alterations. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;141:2094-2106.
205. Brunner PM, He H, Pavel AB, Czarnowicki T, Lefferdink R, Erickson T, *i sur.* The blood proteomic signature of early-onset pediatric atopic dermatitis shows systemic inflammation and is distinct from adult long-standing disease. *J Am Acad Dermatol.* 2019;81:510-519.
206. Kägi MK, Joller-Jemelka H, Wüthrich B. Correlation of eosinophils, eosinophil cationic protein and soluble interleukin-2 receptor with the clinical activity of atopic dermatitis. *Dermatology.* 1992;185:88-92.
207. Yoshizawa Y, Nomaguchi H, Izaki S, Kitamura K. Serum cytokine levels in atopic dermatitis. *Clin Exp Dermatol.* 2002; 27:225-229.
208. Martel BC, Litman , Hald A, Norsgaard H, Lovato P, Dyring-Andersen B, Distinct molecular signatures of mild extrinsic and intrinsic atopic dermatitis. *Exp Dermatol.* 2016;25:453-459.
209. Guttman-Yassky E, Diaz A, Pavel AB, Fernandes M, Lefferdink R, Erickson T, *et al.* Use of tape strips to detect immune and barrier abnormalities in the skin of children with early-onset atopic dermatitis. *JAMA Dermatol.* 2019. doi: 10.1001/jamadermatol.2019.2983. [Epub ahead of print]

## 11. ŽIVOTOPIS

Ružica Jurakić Tončić rođena je 21.9.1977.godine u Slavonskom Brodu. 1996. godine upisala je Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Po završenom Medicinskom fakultetu 2002. godine radi kao zamjenica istraživača na kliničkim ispitivanjima lijekova u KB Sveti Duh u Klinici za internu medicinu. Rad na području dermatovenerologije započinje kao znanstveni novak na projektu "Epidemiologija kožnih tumora u Republici Hrvatskoj" krajem 2006. godine. Od 2007. do 2011. godine specijalizira dermatovenerologiju u Klinici za dermatovenerologiju KBC Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Po završetku specijalizacije 2011. godine radi kao odjelni liječnik na Odjelu za upalne bolesti, u alergološkoj, dermoskopskoj i ambulanti za pigmentne lezije Klinike za dermatovenerologiju. Postdiplomski znanstveni studij polazi od 2005. do 2008. godine. Sudjeluje u COST projektima STANDERM i SKINBAD, te od 2018. godine istraživač je u projektu "Klinički biomarkeri atopijskog dermatitisa" Hrvatske zaklade za znanost. Voditelj je studije Svjetskog dermoskopskog društva pod imenom "Pigmented epitheloid melanocytoma" od 2019.godine.