

Razlike u izražaju bjelančevina-regulatora apoptoze i proliferacije između zdrave kože i kože bolesnika s kroničnim bubrežnim zatajenjem i svrbežom

Mirić Kovačević, Lina

Doctoral thesis / Disertacija

2015

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:190701>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-22**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

LINA MIRIĆ KOVAČEVIĆ

**RAZLIKE U IZRAŽAJU BJELANČEVINA-REGULATORA
APOPTOZE I PROLIFERACIJE IZMEĐU ZDRAVE KOŽE I
KOŽE BOLESNIKA S KRONIČNIM BUBREŽNIM
ZATAJENJEM I SVRBEŽOM**

Doktorska disertacija

Split, 2015. godine

Klinika za kožne i spolne bolesti

Klinički bolnički centar Split

Zavod za anatomiju, histologiju i embriologiju

Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

Komentorice: prof. dr. sc. Mirna Saraga-Babić, dr. med.

prof. dr. sc. Neira Puizina-Ivić, dr.med.

Mojem sinu Ninu,

Dječaku koji je preokrenuo čitav moj svemir i sve moje prioritete i učinio da je pored njegovog osmjeha sve ostalo na dalekom drugom mjestu i koji je sam kao moja pratnja sudjelovao u ovom istraživanju. Zbog kojeg živim i postojim.

Mojem Tonću, roditeljima i bratu zbog kojih sam sve što jesam, koji su moj pokretač i snaga i bez kojih ne bi opstala.

Obitelji i prijateljima koji me vole i razumiju.

Neizmjereno Hvala,

Mojoj mentorici, jedinstvenoj prof. dr. sc. Mirni Saragi-Babić, koja svojom profesionalnošću, upornošću i hrabrošću nadahnjuje te vraća vjeru u znanost, ali nadasve u istinske i temeljne ljudske vrijednosti.

Profesorici Puizini-Ivić, mojoj svakodnevnoj mentorici, koja me naučila tajnama dermatologije i koja je zaslužna da sam pronašla u toj specijalnosti svoj životni poziv.

Prof.dr.sc. Draganu Ljutiću i Mr.sc. Ivi Jeličiću, što su prihvatili prijedlog o zajedničkoj suradnji, podržavali ovo istraživanje od samog početka i bez kojih bi bilo nemoguće ostvariti ga.

Mojem tati, istinskom i vječno inspiriranom borcu, koji nikad ne odustaje i koji je kreativni tvorac mnogih pa i ove znanstvene ideje.

Mojoj mami i bratu, na podršci, razumijevanju, osmjehu, odgovorima, strpljenju i dobroj volji koju uvijek nađu.

Mojem suprugu Tonću, na strpljenju, razumijevanju, podršci, grafičkoj obradi i što je uvijek tu kad ga trebam.

Mojoj dragoj dr.sc. Danijeli Kalibović-Govorko, koja pored mnogih talenata, posjeduje i onaj za statistiku; koja je podijelila sa mnom nezaboravne trudničko-znanstvene dane i neshvatljive nedoumice osmjehom pretvarala u igru.

Dragoj dr.sc. Snježani Mardešić, na čarobnim fotografijama, nesebičnoj pomoći i društvu uvijek kad je trebalo.

Dragoj i vrijednoj gospođi Asji Miletić, dobrom duhu Zavoda i velemajstorici laboratorijskih vještina, kojoj nikad nije bilo teško pomoći, podučiti, ugostiti, nasmijati se.

Mojoj dr. Jasi Rešić-Karara, koja me odvela na prava vrata i pomogla u traženju teme na samim počecima i koja se uvijek pojavi u ključnim trenucima.

Profesorici Ljiljani Lučin, kojoj nikad nije bilo teško svojim čarobnim perom ispraviti i time uljepšati i učiniti vrijednijima stranice ove znanstvene priče.

Sudionicima istraživanja, koji su imali beskrajno povjerenje u nas i profesora Ljutića i koje nikad neću zaboraviti.

Dragoj prof.dr.sc. Snježani Tomić, uvijek prijateljski raspoloženoj, na stručnim savjetima i što je znala obraniti i prepoznati vrijednost našeg istraživanja uvijek kad je trebalo.

Dragoj gospođi Mariti i Nataliji, na strpljenju i odgovorima na moja brojna pitanja.

Nakon ovog istraživanja bogatija sam za prijateljstva svih divnih ljudi koji su u njemu sudjelovali i u tome je njegova najveća vrijednost.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	9
1.1. Kronično zatajenje bubrega.....	9
1.1.1. Dijaliza.....	10
1.1.2. Poremećaji kože u bolesnika s kroničnim zatajenjem bubrega	11
1.1.3. Uremijski svrbež.....	14
1.2. Građa kože.....	15
1.3. Čimbenici važni za održavanje homeostaze u koži: biljezi stanične smrti i proliferacije	16
1.3.1. Stanična proliferacija	16
1.3.1.1. Biljeg proliferacije Ki-67	17
1.3.2. Apoptoza	17
1.3.2.1. Bjelančevine Bcl-2 obitelji kao regulatori apoptoze	19
1.3.2.2. Kaspaza-3 u apoptozi	19
1.3.2.3. Apoptoza i koža	20
1.3.2.4. Apoptoza i dijaliza	21
1.4. Problematika i cilj istraživanja.....	21
1.5. Hipoteza istraživanja	22
2. POSTUPCI I MATERIJAL.....	23
2.1. Ispitanici.....	23
2.2. Sakupljanje uzoraka tkiva kože.....	23
2.3. Vođenje i uklapanje tkiva.....	23
2.4. Imunohistokemijsko bojanje rezova	24
2.5. Mjerenje debljine kože, kvantifikacija, semikvantifikacija i statističke metode.....	27
2.5.1. Mjerenje debljine kože	27
2.5.2. Kvantifikacija pozitivnih stanica (Ki-67).....	27
2.5.3. Semikvantifikacija stanica pozitivnih na jezgrine (kaspaza-3) i citoplazmatske biljege (Bcl-2, Bax).....	27
2.6. Etička načela.....	28
3. REZULTATI.....	29

3.1. Histološki izgled kože zdravih ispitanika.....	29
3.2. Histološki izgled kože dijaliziranih bolesnika	29
3.3. Mjerenje debljine epidermisa kože zdravih ispitanika i dijaliziranih bolesnika	30
3.4. Bojanje Ki-67 proliferacijskim biljegom i određivanje broja (udjela) i raspodjele pozitivnih stanica u koži zdravih ispitanika i koži dijaliziranih bolesnika.....	31
<i>3.4.1. Kvantifikacija Ki-67 pozitivnih stanica.....</i>	<i>32</i>
3.5. Dvostruko imunofluorescentno bojanje biljezima Bcl-2 i Bax i njihova kolokalizacijska analiza	34
<i>3.5.1. Uzorci kože zdravih ispitanika (kontrolna skupina)</i>	<i>34</i>
<i>3.5.2. Uzorci kože bolesnika nakon dvije godine dijalize (peritonejska dijaliza).....</i>	<i>35</i>
<i>3.5.3. Uzorci kože bolesnika nakon pet godina dijalize (hemodijaliza).....</i>	<i>35</i>
3.6. Imunofluorescentno bojanje TUNEL i kaspaza-3 biljezima (i DAPI bojanjem jezgara stanica)	37
<i>3.6.1. Uzorci kože zdravih ispitanika (kontrolna skupina)</i>	<i>37</i>
<i>3.6.2. Uzorci kože bolesnika nakon tri godine dijalize (hemodijaliza).....</i>	<i>37</i>
<i>3.6.3. Uzorci kože bolesnika nakon pet godina dijalize (hemodijaliza).....</i>	<i>37</i>
4. RASPRAVA.....	39
4.1. Uloga stanične proliferacije u održavanju građe i funkcije epidermisa kože zdravih ispitanika i koži dijaliziranih bolesnika	39
<i>4.1.1. Proliferacija stanica epidermisa tijekom razvoja i u zdravoj koži.....</i>	<i>39</i>
<i>4.1.2. Stanična proliferacija u bolestima i tumorima kože</i>	<i>40</i>
<i>4.1.3. Stanična proliferacija u koži dijaliziranih bolesnika.....</i>	<i>40</i>
4.2. Mjerenje debljine kože u zdravih i dijaliziranih bolesnika.....	41
4.3. Inervacija kože i mogući mehanizmi nastanka svrbeža	42
4.4. Proapoptotski i antiapoptotski čimbenici u koži zdravih ispitanika i koži dijaliziranih bolesnika	45
<i>4.4.1. Odnos između proapoptotskih i antiapoptotskih čimbenika u koži zdravih ispitanika i koži dijaliziranih bolesnika sa svrbežom.....</i>	<i>47</i>
<i>4.4.2. Apoptoza i utjecaj regulatora apoptoze na epidermis kože zdravih ispitanika i kože dijaliziranih bolesnika sa svrbežom.....</i>	<i>48</i>

<i>4.4.3. Kaspaza-3 ovisni put stanične smrti u koži zdravih ispitanika i koži dijaliziranih bolesnika sa svrbežom</i>	<i>50</i>
4.5. Mogući mehanizmi nastanka svrbeža u dijaliziranih bolesnika.....	51
5. ZAKLJUČCI.....	53
6. SAŽETAK	55
7. ABSTRACT.....	57
8. LITERATURA.....	59
9. ŽIVOTOPIS	69

POPIS SKRAĆENICA

Bax	antiapoptotska bjelančevina (<i>Bcl-2-associated X protein</i>)
Bcl-2	član obitelji bjelančevina koja sudjeluje u upravljanju apoptoze ,proapoptotska bjelančevina (<i>B-cell lymphoma 2</i>)
CRP	C-reaktivna bjelančevina, biljeg upale (<i>C-reactive protein</i>)
DAB	diaminobenzidin
DAPI	4,6-diamino-2-fenilindol
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
Fas	transmembranska bjelančevina TNF obitelji bjelančevina
FLIP	bjelančevina koja sudjeluje u upravljanju apoptoze (<i>fllice like inhibitory protein</i>)
GF	glomerulska filtracija
GVHD	reakcija transplantata protiv primatelja (<i>graft versus host disease</i>)
IL-6	interleukin 6
Kaspaza-3	enzim koji sudjeluje u izvršnoj fazi apoptoze (<i>cysteine-aspartic acid protease</i>)
Ki-67	bjelančevina KI-67 ili MKI67 identificiran monoklonalnim protutijelom Ki-67,biljeg proliferacije
Kt/V	umnožak klirensa ureje i vremena podijeljen s volumenom razdiobe ureje
KZB	kronično zatajenje bubrega
NSE-IR	imunohistokemijski biljeg neurona (<i>neurone specific enolase</i>)
p-53	tumor supresorska bjelančevina (<i>phosphoprotein 53</i>)
PBS	otopina fosfatnog pufera (<i>phosphate buffer saline</i>)
PD	peritonejska dijaliza
PTH	paratireoidni hormon
RNK	ribonukleinska kiselina
SJS	sindrom Stevens Johnson (<i>Stevens- Johnson syndrome</i>)
TEN	toksična epidermalna nekroliza
TNF	citokin koji sudjeluje u sistemske upali (<i>tumor necrosis factor</i>)
TRAIL	TNF-u srodni apoptoza inducirajući ligand (<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>)

TUNEL	deoksinukleotidil-transferaza (TdT) metoda označavanja hidroksilnih skupina na krajevima fragmenata DNA
URR	postotak smanjenja koncentracije ureje u plazmi (<i>urea reduction ratio</i>)
US	uremijski svrbež
UV-A	dugovalno elektromagnetsko zračenje (valne duljine 400-315 nanometara)
UV-B	ultraljubičasto srednjevalno elektromagnetsko zračenje (valne duljine 315-280 nanometara)

1. UVOD

1.1. Kronično zatajenje bubrega

Kronično zatajenje bubrega (KZB) je klinički sindrom obilježen progresivnim i trajnim oštećenjem ekskrecijske, endokrine i metaboličke funkcije bubrega. Dijabetička i hipertenzivna nefropatija vodeći su uzroci uznapredovalog zatajenja bubrega. Zbog zatajenja ekskrecijske funkcije bubrega, u organizmu se nakupljaju krajnji proizvodi metabolizma (voda, elektroliti i razgradni proizvodi bjelančevina) što uzrokuje poremećaj sastava tjelesnih tekućina. Zatajenje endokrine funkcije bubrega očituje se smanjenim stvaranjem aktivnog metabolita vitamina D3, što je povezano s promjenama koncentracije kalcija i fosfata u krvnoj plazmi. Smanjena sinteza eritropoetina u bubrezima glavni je uzrok anemije u bolesnika sa KZB-om, a smanjena sinteza prostaglandina koji šire krvne žile (vazodilatacija) jedan je od čimbenika za nastanak hipertenzije. Zatajenje metaboličke funkcije bubrega uzrokuje nagomilavanje biološki važnih tvari i lijekova u organizmu. Bitno svojstvo KZB-a je progresivno propadanje nefrona te postupno snižavanje glomerulske filtracije (GF). Sindrom KZB-a temeljen je na smanjenju GF-a tijekom najmanje tri mjeseca. Klinički simptomi bolesti pojavljuju se tek kada je oštećeno više od 80 % funkcije bubrega, zbog čega se veliki broj bolesnika otkriva u odmakloj fazi bolesti bubrega. Najvažniji kriteriji za određivanje stadija kronične bolesti bubrega jest veličina GF-a (tablica 1). Bubrezi su jedini organi koji izlučuju razgradne proizvode bjelančevina pa u slučaju uremije nastaje njihova retencija što izaziva niz kliničkih pojava. U nastanku uremijskih simptoma, osim ureje, sudjeluju i drugi otrovni sastojci kao i velik broj tvari nepoznata sastava nazvanih *srednje molekule*. Temelj za takvu pretpostavku o srednjim molekulama potječe iz kliničkog iskustva prema kojem bolesnici na peritonejskoj dijalizi (PD) imaju manje uremijskih simptoma od bolesnika na hemodijalizi. Klinički se KZB očituje poremećajem ravnoteže tjelesnih tekućina, elektrolita i acidobazne ravnoteže, kardiovaskularnim, respiracijskim, probavnim, hematološkim, neurološkim, endokrinološkim i imunološkim poremećajima te promjenama kože (1).

Tablica 1. Stadiji kronične bolesti bubrega

Preuzeto iz: Galešić K, Sabljar-Matovinović M. Kronična insuficijencija bubrega. U: Vrhovac B, Jakšić B, Reiner Ž, Vucelić B, ur. Interna medicina. 4. izd. Zagreb: Naklada Ljevak; 2008. str. 1088

Stadij	Opis	GF ml/min/1,73m ²
1	oštećenje bubrega s urednim ili povećanim GF-om	90
2	oštećenje bubrega s blagim smanjenjem GF-a	60-89
3	umjereno smanjen GF	30-59
4	teško smanjen GF	15-29
5	zatajenje bubrega	< 15

1.1.1. Dijaliza

U bolesnika sa KZB-om u kojih je klirens endogenog kreatinina manji od 10 ml/min, potrebno je provesti liječenje nadomještanjem egzokrine funkcije bubrega što je moguće učiniti s pomoću hemodijalize, PD-a ili transplantacije bubrega (2).

Indikacije za hemodijalizu su: hiperkalijemija koja nedovoljno reagira na konzervativnu terapiju, hipervolemija sa zatajenjem srčane funkcije te metabolička acidoza. Hemodijalizom se održava postojanost biokemijskog sustava, osobito koncentracije elektrolita, vodikovih iona, osmotskog tlaka i ravnoteže tekućina. Uklanjanje otrovnih i nepotrebnih tvari, nastalih tijekom metabolizma te višak vode koji se ne može izlučiti ostatnom funkcijom bubrega, temelj su spomenutog načina liječenja. Postupak se odvija pomoću umjetnog bubrega (dijalizatora) procesom difuzije i ultrafiltracije (3). Primjerenost dijalize određuje se pomoću URR-a (postotak smanjenja koncentracije ureje u plazmi) čija je mjera oko 70 % te količinom plazme koja je u zadanom vremenu očišćena od ureje ($K/\text{klirens ureje} \times t/\text{vrijeme}$) podijeljenim s volumenom razdiobe ureje (V), koji je približan ukupnoj vodi u tijelu, a čija je mjera za $Kt/V > 1,3$ (2).

Peritonejska dijaliza rabi peritoneum kao polupropusnu membranu za izmjenu tvari. Metoda se temelji na utakanju otopine (koja sadržava elektrolite i glukozu ili ikodekstrin kao osmotske tvari) putem peritonejskog katetera, u trbušnu šupljinu uz djelovanje sile teže. Uremični otrovi prelaze iz krvi u dijalizat difuzijom niz koncentracijski gradijent, dok prijelaz vode određuje osmolalnost dijalizata. Bolesnik mora biti motiviran, tjelesno i psihički spreman za samostalno provođenje ove metode liječenja te ne smije imati priraslice u trbušnoj šupljini (posljedice prethodnih operacija). U relativne kontraindikacije spadaju trbušne hernije, progresivne neurološke bolesti, bolesti kretanja i teški artritis, kronična opstruktivna bolest pluća, divertikuloza debelog crijeva, teže psihičke tegobe i socijalni problemi. S obzirom na tehničku izvedbu postoji *kontinuirana ambulatna peritonejska dijaliza (CAPD)* te *automatizirana peritonejska dijaliza (APD)*. Indikacije za primjenu PD-a su: akutno i kronično zatajenje bubrega te otrovanje. Peritonitis je najčešća, ali i najozbiljnija komplikacija PD-a. Poboljšavanje kroničnih bolesnika liječenih hemodijalizom ili PD-om najčešće je vezano za uremični sindrom, njegove komplikacije i pridružene bolesti kao što su: arterijska hipertenzija, anemija, srčano-žilne bolesti, bolesti probavnog, dišnog, endokrinog, imunskog, lokomotornog i živčanog sustava, kože i osjetila te psihičke tegobe (2).

1.1.2. Poremećaji kože u bolesnika s kroničnim zatajenjem bubrega

U bolesnika sa KZB-om pojavljuju se različiti poremećaji kože, koji su ponekad povezani s bolešću bubrega, ali većinom kao neposredna posljedica uremije (tablica 2.). Poremećaji kože pojavljuju se u populaciji dijaliziranih bolesnika, s prevalencijom od gotovo 100 % . Zbog svojeg negativnog učinka na kvalitetu života dijaliziranih bolesnika, poremećaji kože mogu ozbiljno narušavati mentalno i fizičko zdravlje ovih bolesnika uzrokujući anksioznost, depresiju i poremećaje spavanja (4). Iako je većina poremećaja kože u bolesnika sa KZB-om relativno dobroćudnog tijeka, pojedini rijetki poremećaji uzrokuju porast smrtnosti ovih bolesnika (5). Svrbež je česta pojava u dijaliziranih bolesnika (6). Iako uzrok svrbeža još uvijek nije do kraja razjašnjen, uočeno je njegovo pojačavanje s gubitkom funkcije bubrega. Svrbež može biti praćen suhoćom kože, iako nije dokazana njihova povezanost kao ni povezanost količine vode u rožnatom sloju i jačine svrbeža (7,8). Suhoća kože u dijaliziranih bolesnika povećava njihovu podložnost infekcijama i produžuje vrijeme zacjeljivanja rana na koži (9).

Promjena u pigmentaciji kože u vidu makularne hiperpigmentacije dlanova i tabana, kao i difuzne hiperpigmentacije sluznica, vidljiva je tijekom ranih faza napredovanja zatajenja bubrežne funkcije (10). Poremećaj u boji noktiju (*half-and-half nails*) tipična je pojava u dijaliziranih bolesnika, a očituje se pojavom proksimalnog bijelog, a distalnog crvenkasto-smeđeg dijela noktiju. Prijevremeno starenje kože u ovih bolesnika očituje se kao aktinička elastoza, a često su prisutni i Raynaudov sindrom, pojačana dlakavost obraza, pojačana dlakavost (hipertrichoza) i zadebljanje obrva (11).

Tablica 2. Poremećaji kože u bolesnika sa KZB-om

Preuzeto iz: Kuypers RJD. Skin problems in chronic kidney disease. *Nat Clin Pract Nephrol* 2009;5: 157-71.

Hiperpigmentacija
Bljedilo
Kseroza Suhoća
Ihtioza Ljuštenje
Pruritus Svrbež
<i>Prurigo nodularis</i>
Stečena perforativna dermatoza (Kyrleova bolest)
Bakterijske, virusne i gljivične infekcije (<i>Streptococcus spp</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Tinea</i> , <i>herpes zoster</i>)
Purpura
<i>Porphyria cutanea tarda</i>
<i>Pseudoporphyria</i>
Kalcifikacija
Dobročudna nodularna kalcifikacija
<i>Half-and-half nails</i>
Koilonihija
Poprečna leukonihija
Onihomikoza
Oniholiza
Splinter hemoragije
Subungvalna hiperkeratoza
Lomljiva kosa
Prorijeđena dlakavost tijela i vlasišta
Alopecija
Crvene oči (<i>pingueculitis</i>)
Angularni heilitis
Uremijski frost
Nefrogena sustavna fibroza

1.1.3. Uremijski svrbež

Patofiziologija nastanka uremijskog svrbeža (US) vrlo je složena i još uvijek nije do kraja razjašnjena. Razumijevanje mehanizama koji sudjeluju u nastanku svrbeža, neophodno je za razvoj učinkovite terapijske strategije bolesnika sa KZB-om i svrbežom (5). Poboljšanjem tehnika dijaliziranja i razvojem biokompatibilnih membrana za dijalizatore prevalencija US-a smanjila se u posljednjih desetak godina no svrbež je i dalje prisutan u 42 - 52 % odraslih bolesnika sa KZB-om (12-14). US se pojavljuje u dijaliziranih bolesnika povremeno ili dugotrajno tijekom dana i noći. Pojavnost, trajanje i jačina svrbeža promjenjivi su, a svrbež se najčešće pogoršava noću. Područja najčešće zahvaćena svrbežom su: leđa, udovi, prsa i glava, a 20 – 50 % dijaliziranih bolesnika ima generalizirani svrbež. Vrućina, znojenje i stres pogoršavaju, a tuširanje hladnom ili toplom vodom ublažavaju simptome svrbeža. US ima negativan utjecaj na kvalitetu života i uzrokuje nelagodu, anksioznost, depresiju i poremećaj spavanja. Pojedina istraživanja ukazuju na povezanost US-a i povećanog mortaliteta dijaliziranih bolesnika (13,15). US uzrokuje mehaničko oštećenje kože, ekzorijaciju, infekciju i kronične promjene kože u vidu nodularnog pruriga i lihenifikacije (14). Navedene su dvije hipoteze koje su pokušale objasniti nastanak US-a: imunološka i opioidna hipoteza.

Imunološka hipoteza smatra US posljedicom sustavne upalne bolesti čemu ide u prilog i činjenica o dobrom terapijskom učinku fototerapije *UVB narrow band* u ovih bolesnika. Upalnu prirodu nastanka svrbeža potvrđuje i činjenica o povišenim vrijednostima upalnih biljega u serumu bolesnika s US-om kao što su CRP i IL-6 (16).

Opioidna hipoteza pretpostavlja kako je US posljedica promjena u endogenom opioidergičnom sustavu, s pretjeranim izražajem opioidnih μ - receptora u stanicama kože i limfocitima (17). Opioidnu teoriju potvrđuju povišene razine β -endorfina u serumu bolesnika, a i pozitivan terapijski učinak naloksona, antagonist μ - receptora (18, 19).

Nedostatak povezanosti razine PTH-a, Ca i P s intenzitetom US-a ukazuje na druge, važnije čimbenike u nastanku US-a (20, 21). Razmatrao se i mogući utjecaj histamina (koji se otpušta iz mastocita kao odgovor na tvar P), u nastanku US-a. Nađene su povišene vrijednosti triptaze i histamina u bolesnika sa KZB-om koji su imali intenzivan svrbež, no rezultati spomenutih istraživanja su oprečni (22, 23).

Suhoća kože može doprinijeti nastanku svrbeža u bolesnika sa KZB-om. Uzrokovana je atrofijom znojnih i lojnih žlijezda, smanjenim izlučivanjem znoja, poremećenom hidracijom kože i abnormalnom arborizacijom slobodnih živčanih završetaka (C tip vlakana) (24).

U liječenju US-a pokušavalo se brojnim terapijskim opcijama, topičkim i sustavnim. Kombinacije pojedinih opcija pokazale su se učinkovitima (tablica 3).

Tablica 3. Terapijski pristup za bolesnike sa KZB-om i US-om

Preuzeto iz: Kuypers RJD. Skin problems in chronic kidney disease. Nat Clin Pract Nephrol 2009;5:157-71.

Poboljšanje učinkovitosti dijalize i upotreba biokompatibilnih membrana
Poboljšanje nutritivnog statusa bolesnika
Kontrola koncentracija Ca, P
Liječenje sekundarnog hiperparatireoidizma
Upotreba emolijensa s velikom količinom vode
Upotreba emolijensa s velikom količinom vode + krema s 0,025 % kapsaicinom
Upotreba emolijensa s velikom količinom vode + fototerapija UVB svjetlom širokog spektra ili <i>narrow band</i> (8-10 izlaganja)
Upotreba emolijensa s velikom količinom vode + gabapentin nakon dijalize (100-300 mg)
Upotreba emolijensa s velikom količinom vode + primjena aktivnog ugljena <i>per os</i>
Upotreba emolijensa s velikom količinom vode + nalfurafine

1.2. Građa kože

Osnovnu građu zdrave kože čine epitelni sloj ili *epidermis* koji leži na bazalnoj membrani, sloj vezivnog tkiva ili *dermis* te potkožno masno tkivo ili *subcutis*. Epidermis je oroženi mnogoslojni pločasti epitel koji uz keratinocite sadržava melanocite, Langerhansove stanice i Merkelove stanice. Langerhansove stanice nastaju iz koštane srži te sudjeluju u predočavanju antigena. Melanociti su stanice podrijetlom iz neuralnog grebena, a zaslužne su za stvaranje i prijenos melanina u keratinocite. Merkelove stanice su neuroendokrine stanice koje imaju ulogu mehanoreceptora. Bazalni sloj (*stratum basale*) i nazubljeni sloj (*stratum spinosum*) zajedno se nazivaju Malpighijev sloj (*stratum germinativum*, zametni sloj) u kojem se stanice mitotski dijele te osiguravaju neprekidno obnavljanje epidermalnih stanica.

Zrnati sloj (*stratum granulosum*) i svijetli sloj (*stratum lucidum*) izraženiji su u koži dlanova i tabana. Rožnati ili površinski sloj (*stratum corneum*) sastoji se od odumrlih stanica bez jezgara.

Stanice bazalnog sloja dijele se da bi stvarale nove keratinocite koji podliježu terminalnoj diferencijaciji dok migriraju prema površini kože. Obnova epidermisa traje oko mjesec dana. Keratinociti dosežu zrnati i rožnati sloj nakon dva tjedna kao korneociti, a sljedeća dva tjedna potrebna su kako bi dosegli površinu rožnatog sloja i odljuštili se u okolinu. Epidermalni privjesci razvijaju se kao posljedica međudjelovanja epidermalnih pupoljaka i dermalnih elemenata. Dlačni folikuli, žlijezde lojnice i znojnice nastaju međudjelovanjem dlračnih zametaka i specijaliziranih mezenhimalnih stanica (dlračnih papila). Dermis se sastoji od papilarnog i retikularnog sloja (25). Slobodni živčani završetci specijaliziranih C vlakana prolaze kroz dermis i bazalnu membranu te završavaju u području zrnatog sloja epidermisa, sudjelujući u prijenosu osjeta (24).

1.3. Čimbenici važni za održavanje homeostaze u koži: biljezi stanične smrti i proliferacije

Tkivna homeostaza ovisi o skladnom odnosu između stanične proliferacije, diferencijacije i stanične smrti. Tijekom diobe somatskih stanica, napredovanje staničnog ciklusa precizno je regulirano mrežom pozitivnih i negativnih signala (26). Stanični ciklus kontroliran je mnogim regulatornim mehanizmima, koji ili potiču ili sprječavaju njegovo napredovanje (27). Vremenski slijed zbivanja nadzire se kontrolnim točkama staničnog ciklusa na prijelazu G1/S faze staničnog ciklusa, u S fazi i na prijelazu G2/M faze. Kontrolne točke osiguravaju da se važna zbivanja u određenoj fazi staničnog ciklusa završe prije nego započne nova faza proliferacije, što sprječava nastanak i daljnje umnažanje genetski abnormalnih stanica (stanica s oštećenom/pogrešno sintetiziranom DNK) (26).

1.3.1. Stanična proliferacija

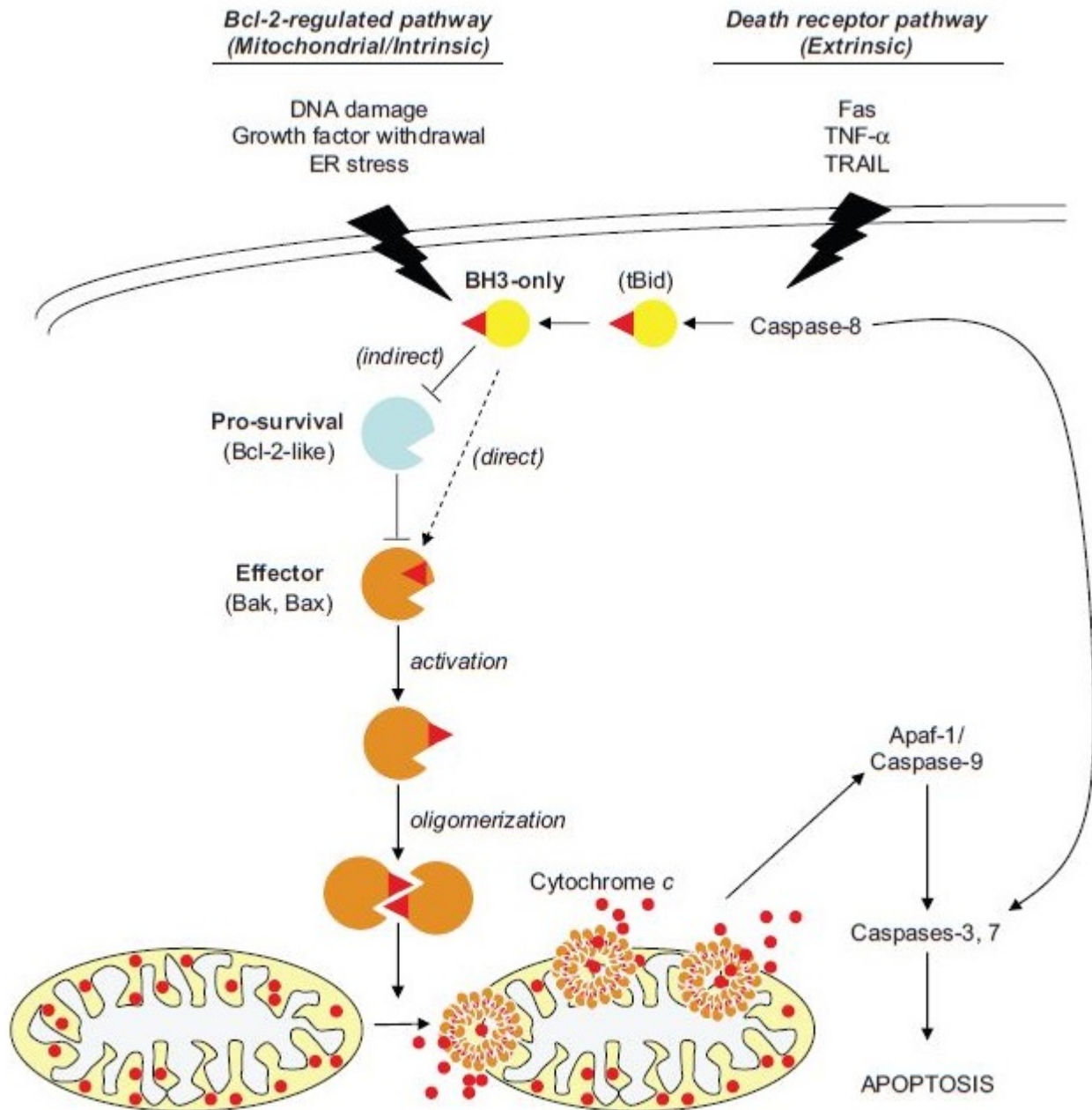
Stanična proliferacija jedan je od temeljnih bioloških procesa, a pod kontrolom je pozitivnih i negativnih regulatora, koji se sastaju na razini kaskade kinaza staničnog ciklusa (28).

1.3.1.1. Biljeg proliferacije Ki-67

Ki-67 bjelančevina (MKI67 antigen) izvorno je definiran prototipom monoklalnog protutijela Ki-67, nastalog imunizacijom miševa jezgrama Hodgkin limfoma (stanične linije L428). Ime je izvedeno od grada u kojem je nastalo (Kiel), a broj od rednog broja originalnog klona (29). Ki-67 je jezgrina bjelančevina koja je prisutna u svim fazama staničnog ciklusa osim u fazi mirovanja (G0) pa se zato rabi kao siguran proliferacijski biljeg (30). Dokazana je nužnost bjelančevine Ki-67 za staničnu proliferaciju kao i njezina uloga u RNK polimeraza I-ovisnoj sintezi nukleolarne rRNK (31). Osim u karcinomima kože, promijenjena proliferacija dokazana je u koži bolesnika sa psorijazom dok slična istraživanja, koja uključuju dijalizirane bolesnike sa svrbežom, nisu provedena (32, 33). Proliferacijske Ki-67 stanice očekuju se u bazalnom sloju epidermisa zdrave kože.

1.3.2. Apoptoza

Kerr i suradnici su još 1972. godine, na morfološkim temeljima, definirali apoptozu kao jedinstveni oblik stanične smrti i instrument za uklanjanje neželjenih stanica tijekom embrionalnog razvoja, tijekom normalne izmjene stanica u tkivima koja se dijele kao i u patološkim stanjima (34). Danas se zna da je apoptoza genski uvjetovana, a morfološke su promjene rezultat aktivacije unutarstaničnih signalnih puteva, čija je jedina uloga smrt stanice i organizacija uklanjanja njezinih ostataka (35, 36). Postoje dva apoptotska puta: vanjski ili put Fas/TNF-R1 receptora i unutarnji ili mitohondrijski put te dodatni put koji uključuje T-limfocitima posredovanu citotoksičnost i perforin-granzim-ovisnu smrt stanice. Svi nabrojani putevi objedinjuju se na istom izvršnom putu, koji započinje cijepanjem kaspaze-3, a završava smrću stanice (slika 1). Granzim A put stanične smrti, aktivira paralelni, o kaspazi neovisni put, djelujući preko oštećenja jednolančane DNK (37). Tijekom apoptoze, kromatin se zgušnjava, a jezgra fragmentira (piknoza). Citoplazma se zgušnjava, postaje eozinofilna i organizira se u apoptotska tjelešca, koja sadržavaju razne dijelove citosola, organele i dijelove zgusnute jezgre. Apoptotska tjelešca fagocitiraju makrofagi, parenhimske stanice ili tumorske stanice i razgrađuju unutar fagolizosoma. Sama apoptoza ili uklanjanje apoptotskih stanica isključuje upalni odgovor, jer apoptotske stanice ne otpuštaju svoj sadržaj u okoliš, okolne stanice ih brzo fagocitiraju, a pri tome ne stvaraju protuupalne citokine (38).



Slika 1. Putevi apoptoze. Vanjski ili put Fas/TNF-R1 receptora i unutarnji ili mitohondrijski put objedinjuju se na istom izvršnom putu, koji započinje cijepanjem kaspaze-3, a završava smrću stanice.

1.3.2.1. Bjelančevine Bcl-2 obitelji kao regulatori apoptoze

Članovi Bcl-2 obitelji su unutarstanične, s membranom povezane, bjelančevine koje reguliraju apoptozu ili programiranu staničnu smrt (39). Obitelj čini više od 20 članova, a dijele se na proapoptotske (Bax, Bak, Bok, Bcl-G, Bcl-rambo, Bfk, Bid, Bad, Bik, Bim, Bmf, Noxa, Puma, Hrk, Beclin1 i MULE) i antiapoptotske (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, Bcl2l10, Bfl-1 and Bcl2l12) (40). Jedinstveno svojstvo obitelji Bcl-2 bjelančevina je da one međusobno tvore razne homodimere i heterodimere koji ili potiču, ili sprječavaju apoptozu. Na taj način oni uzajamno "titriraju" funkciju, a njihov relativni izražaj "odlučuje" o sudbini stanice, regulirajući integritet membrane mitohondrija (41). Različite kombinacije bjelančevina iz Bcl-2 obitelji pojavljuju se ovisno o vrsti, stupnju diferenciranosti i aktivacijskom stanju stanice. Lokalizacija članova Bcl-2 obitelji regulira njihovu funkciju: Bcl-2 se nalazi na vanjskoj membrani mitohondrija dok se Bax prije indukcije apoptoze pretežno nalazi u citosolu. Nakon indukcije apoptoze, Bax se premješta u mitohondrij i veže se za njegovu membranu gdje sudjeluje u stvaranju mitohondrijskih pora i otpuštanju citokroma-c, što ubrzava programiranu smrt stanica (42). Bcl-2 bjelančevina štiti stanicu od apoptoze, vezujući se na Bax i Bak bjelančevinu (43). Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w i Mcl-1 zaustavljaju apoptozu dok Bax, Bik, Bak, Bad i Bcl-xs bjelančevine pokreću apoptozu (44).

1.3.2.2. Kaspaza-3 u apoptozi

Kaspaza-3 je proteaza koja je dio velike obitelji kaspaza (cistein-proteaza) koje su uključene u programiranu staničnu smrt (45). Do danas ih je u ljudskim stanicama opisano oko 14 vrsta, gdje postoje kao neaktivni zimogeni-prokaspaze, a dijele se na upalne (kaspaza-1, -4, -5 i -13), inicijacijske (kaspaza-2, -8, -9 i -10) i izvršne (kaspaza-3, -6 i -7) kaspaze (46). Kaspaze slijede kaskadni put aktivacije, tako da svaka aktivirana kaspaza cijepa sljedeću prokaspazu u njezin aktivni oblik. Aktivna kaspaza-3 do sada je pronađena u interdigitalnim područjima udova, u timusu, tankom crijevu, bubregu, neuronima i spinalnim ganglijima (47). Kaspaza-3 ima važnu ulogu u regulaciji broja stanica, posebice kod oštećenja bubrega (48).

1.3.2.3. Apoptoza i koža

Održavanje homeostaze u koži zahtijeva ravnotežu između proliferacije, diferencijacije i apoptoze, odnosno stanične smrti. Apoptoza, osim što je uključena u homeostatske mehanizme zdrave kože i kontrolu rasta epidermisa, sudjeluje u patogenezi različitih poremećaja kože. Terminalna diferencijacija keratinocita smatra se posebnim oblikom apoptoze, zbog morfološke sličnosti krajnjeg stadija keratinocita i apoptotske stanice (aktivacija endonukleaza i fragmentacija DNK) (49). Kao posljedica oštećenja DNK dokazan je pojačan izražaj p53 bjelančevine (tumor supresor) u koži izloženoj UV zrakama (50,51).

Apoptotski keratinociti dokazani su u dermatozama kojima je zajednička lichenoidna tkivna reakcija (*lichen planus*, *lupus erythematosus*, *erythema multiforme* i *graft versus host disease*) (52,53).

U koži bolesnika sa psorijazom (hiperproliferacijski poremećaj keratinocita posredovan T limfocitima) ne nalazi se mikroskopskog dokaza prisustva apoptotskih stanica no prisutan je pojačan izražaj Fas-a na oštećenim keratinocitima. Smatra se da je zadebljanje epidermisa u ovih bolesnika upravo posljedica aktivacije antiapoptotskih bjelančevina kao što je Bcl-xL, a čiji je pojačan izražaj dokazan u psorijatičnom plaku (54).

S obzirom na to da je Bcl-2 bjelančevina najizraženija u živčanom tkivu, prisutna je i u melanocitima (stanicama nastalim iz neuralnog grebena) te u benignim i malignim melanocitnim promjenama kože (55, 56). Apoptoza je dokazana u dobroćudnim i zloćudnim tumorima kože kao što su: bazocelularni karcinom, planocelularni karcinom, pilomatrikom, keratoakantom i tumor Merkelovih stanica. Apoptotske stanice nadmašuju broj mitotskih stanica u bazocelularnom karcinomu što ukazuje na stanično preživljenje kao uzrok neoplastične pretvorbe umjesto povećane stanične proliferacije (44, 57).

Izražaj Bcl-2 bjelančevine najvećeg je intenziteta u bazalnim keratinocitima zdrave kože te u vanjskoj dlačnoj ovojnici, a slabijeg u suprabazalnim slojevima. Bcl-2 bjelančevina na taj način čuva proliferacijski aparat kože od apoptotskih podražaja. Proapoptotska bjelančevina Bax slabog je izražaja u bazalnim, a pojačanog u suprabazalnim slojevima zdrave kože. Bcl-2 i Bak bjelančevine prisutne su u bazalnim i suprabazalnim slojevima zdrave kože, dok im se izražaj u zrnatom sloju smanjuje (58). Bcl-2 bjelančevina prisutna je u bazocelularnom karcinomu, a nije dokazana u planocelularnom karcinomu u kojem je Bak bjelančevina pojačanog izražaja (57).

1.3.2.4. Apoptoza i dijaliza

Na pokusnom modelu štakora dokazan je poremećaj ravnoteže proliferacije i apoptoze stanica peritoneuma te utjecaj na apoptozu mononuklearnih stanica u krvi, kao posljedica PD-a (59). U bolesnika s terminalnim bubrežnim zatajenjem dokazana je apoptoza memorijskih T stanica (CD45RO+), aktivacija proupalnih citokina, oksidativnog stresa i mitohondrijska disfunkcija u perifernoj krvi (60). U koži dijaliziranih bolesnika do sada su dokazane kožne promjene praćene većom debljinom epidermisa te pojačanim izražajem p-53 (proapoptotske bjelančevine) i Bcl-2 bjelančevine (antiapoptotske) u odnosu na zdravu kožu kao i prisutnost Bcl-2 bjelančevine u suprabazalnim slojevima (61). Promjene razine PTH i kalcija u serumu ovih bolesnika mogle bi utjecati na inicijalnu fazu apoptoze (62).

1.4. Problematika i cilj istraživanja

Problematika istraživanja proizlazi iz činjenice da su podatci o mogućim promjenama kože u dijaliziranih bolesnika sa KZB-om i svrbežom vrlo su oskudni u svjetskoj literaturi, posebno u pogledu histološke analize te usporedbe kože dijaliziranih tj. kroničnih bubrežnih bolesnika i kože zdravih ispitanika primjenom imunohistokemijskih metoda za apoptotske, antiapoptotske i proliferacijske čimbenike. Dosadašnja istraživanja poremećaja kože u dijaliziranih bolesnika bila su malobrojna, a temeljila su se ponajprije na makroskopskom opisu promjena kože te usporedbi s trajanjem dijalize (4, 5, 9-11).

U oskudnim histološkim istraživanjima kože dijaliziranih bolesnika sa svrbežom do sada je dokazana atrofija kože s posljedično smanjenom sekrecijom žlijezda lojnica i znojnica, kao i značajne promjene arhitekture krvnih žila dermisa koje se očituju zadebljanjem bazalne membrane, aktivacijom endotelih stanica te prisutnim kroničnim upalnim infiltratom (7). U koži dijaliziranih bolesnika do sada su dokazane promjene kože praćene većom debljinom epidermisa te pojačanim izražajem p-53 (proapoptotske bjelančevine) i Bcl-2 bjelančevine (antiapoptotske) u odnosu na zdravu kožu (62). Međutim, odnos proapoptotskih i antiapoptotskih čimbenika korištenih u ovoj disertaciji, do sada nije istraživan u epidermisu kože dijaliziranih bolesnika sa svrbežom.

Cilj istraživanja je primjenom imunohistokemijskih metoda utvrditi moguće promjene u koži dijaliziranih bolesnika sa KZB-om praćenih svrbežom i usporediti ih s kožom zdravih ispitanika:

- 1) Analizirati i usporediti raspodjelu antiapoptotske Bcl-2 i apoptotske Bax bjelančevine u različitim slojevima epidermisa kože (bazalnom, nazubljenom i površinskom sloju) u kroničnih bubrežnih bolesnika sa svrbežom i u koži zdravih ispitanika;
- 2) Analizirati raspodjelu apoptotskih kaspaza-3 i TUNEL pozitivnih stanica u slojevima epidermisa kože kroničnih bubrežnih bolesnika sa svrbežom i u koži zdravih ispitanika;
- 3) Usporediti raspodjelu i broj (postotak) proliferacijskih Ki-67 pozitivnih stanica u različitim slojevima epidermisa kože spomenutih bolesnika i koži zdravih ispitanika;
- 4) Izmjeriti debljinu epidermisa kroničnih bubrežnih bolesnika i usporediti s debljinom kože zdravih ispitanika te
- 5) Dobivene razlike u izražaju navedenih antiapoptotskih, proliferacijskih i apoptotskih čimbenika u epidermisu bolesnika sa svrbežom i koži zdravih ispitanika usporediti s duljinom trajanja KZB-a, odnosno dijalize.

1.5. Hipoteza istraživanja

U epidermisu kroničnih bubrežnih bolesnika sa svrbežom promijenjen je odnos između apoptotskih Bax i antiapoptotskih Bcl-2 bjelančevina u odnosu na kožu zdravih ispitanika kao posljedica dugotrajne dijalize. Očekivane su promjene debljine epidermisa i prisutnost apoptotskih stanica (kaspaza-3 i TUNEL pozitivne) u dubljim slojevima epidermisa u odnosu na kožu zdravih ispitanika.

Mjerenjem i uspoređivanjem proliferacijskog indeksa različitih slojeva kože dijaliziranih bolesnika i kože zdravih ispitanika mogu se dobiti podatci o regeneracijskoj sposobnosti kože i mogućim uzrocima promjene debljine epidermisa. Spomenute promjene u epidermisu mogle bi utjecati na živčane završetke koji ulaze između stanica epidermisa, a koji su odgovorni za prijenos osjeta svrbeža. Dobiveni rezultati originalni su doprinos proširenju saznanja o promjenama u koži dijaliziranih bolesnika sa KZB-om koje bi se mogle povezati s pojavom svrbeža, što je od interesa za nekoliko kliničkih specijalnosti poput dermatovenerologije, interne medicine-nefrologije kao i histopatologije.

2. POSTUPCI I MATERIJAL

2.1. Ispitanici

Istraživanje je provedeno na bolesnicima s generaliziranim svrbežom koji se dijaliziraju u Centru za dijalizu Klinike za unutarnje bolesti Kliničkog bolničkog centra Split (KBC). Bolesnici su pregledani u Dermatovenerološkoj ambulanti Klinike za kožne i spolne bolesti te im se, nakon procjene dermatološkog statusa kao i ispunjavanja upitnika i informiranog pristanka, učini biopsija kože s bedra, odnosno područja koje nije izloženo UV zrakama. Upitnikom su se saznali podatci o osobnoj anamnezi, vrsti i trajanju dijalize. U istraživanje je uključeno 12 dijaliziranih bolesnika te 5 zdravih ispitanika koji su činili kontrolnu skupinu. Veličina uzorka određena je statističkim metodama temeljem pretpostavke razlike ekspresije od $d=1.8$. U istraživanju su se koristili uzorci kože devet bolesnika na hemodijalizi te troje bolesnika na PD-u. Srednja životna dob bolesnika na hemodijalizi bila je 64.7 (46-68), a na peritonejskoj 63.6 (57-70). Srednja vrijednost trajanja hemodijalize bila je 3.1 godine (raspon 1-5) sa srednjom vrijednosti trajanja svrbeža hemodijaliziranih bolesnika od 3.0 godine, a dijaliziranih PD-om 3.3 godine (raspon 2-5) sa srednjom vrijednosti trajanja svrbeža 3.3 godine.

Kontrolni materijal bili su uzorci zdravog tkiva kože zdravih ispitanika koji su rutinskim radom u Dermatovenerološkoj ambulanti bili podvrgnuti kirurškom zahvatu ili probatornoj eksciziji, a po osobnim podacima (spol, dob) i mjestu uzimanja biopsije odgovaraju ispitivanoj skupini bolesnika i ne liječe se od drugih dermatoloških bolesti te im je patohistološkom analizom isključena ikakva patološka promjena kože (zdrava koža uz madež).

2.2. Sakupljanje uzoraka tkiva kože

Probatorna ekscizija kože uradila se pomoću *punch* nožića promjera 1.5 mm (Solingen, Germany), nakon primjene lokalnog anestetika (lidokain s adrenalinom), u Dermatovenerološkoj ambulanti Klinike za kožne i spolne bolesti.

2.3. Vodenje i uklapanje tkiva

Uzorci dobiveni probatornom ekscizijom fiksirali su se u 10 %-tnom formaldehidu u fosfatnom puferu tijekom 24 sata te nakon ispiranja u fosfatnom puferu, dehidrirali u uzlaznim koncentracijama alkohola.

Nakon ispiranja u ksilolu, uklopili su se u parafin na 56°C. Serijski su izrezani na uzdužne rezove debljine 7 µm te nalijepljeni na predmetna stakla prethodno obrađena otopinom 3-aminopropil-trietokisilana (Sigma Chemical Co., St.Louis, USA). Napravljeno je orijentacijsko bojanje svakog 10-og stakla hemalaunom i eozinom, kako bi se provjerila razina reza i očuvanost tkiva.

2.4. Imunohistokemijsko bojanje rezova

Nakon odabira odgovarajućih protutijela, napravljeno je imunohistokemijsko bojanje tkivnih rezova prema za to predviđenom protokolu. Analiza obojanih rezova provela se mikroskopom Olympus BX40 (Olympus, Tokyo, Japan), a snimanje mikrofotografija DP71 digitalnom kamerom. Korišteni su i računalni programi Excel 2003 (Microsoft, USA) za dokumentaciju rezultata te GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, Inc., USA) za statističku obradu.

U ovom istraživanju koristile su se dvije metode vizualizacije biljega (protutijela):

- 1) imunohistokemijska s primjenom diaminobenzidina (DAB) za dokazivanje prisutnosti pojedinih biljega i statističku analizu te
- 2) imunofluorescencija u svrhu kolokalizacije različitih protutijela. Imunohistokemijski postupak obrade tkivnih rezova započeo je deparafiniranjem rezova u ksilolu, a zatim su se rezovi rehidrirali u silaznom koncentracijskom nizu alkohola. Inkubacija u 3 % H₂O₂ (15 minuta pri sobnoj temperaturi) osigurala je inaktivaciju endogene peroksidaze. Nakon toga, rezovi su se kuhali u citratnom puferu u mikrovalnoj pećnici na 95°C tijekom 17 min. i ispirali fosfatnim puferom (engl. *Phosphate Buffer Saline* - PBS). Daljnji postupci ovisili su o uputama proizvođača za uporabu protutijela i o referentnim metodama laboratorija Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju.

Koristila su se sljedeća primarna protutijela:

1. mišja monoklonalna na ljudske antigene:
- *anti-human bcl-2 onkoprotein* (M0887, DAKO, Glostrup, Denmark);
2. zečja monoklonalna na ljudske antigene:
- *anti-human, anti-mouse caspase-3 antigen* (AF835, R&D System Inc., Minneapolis Mi, USA);
3. zečja poliklonalna na mišji antigen:

- *anti-mouse bax antigen* (AB 2915, Chemicon, Temecula, CA, USA);

4. mišja monoklonalna na ljudske antigene:

- *anti-human Ki-67 antigen* (M7240, DAKO, Glostrup, Denmark).

Nakon jednosatne inkubacije s primarnim protutijelom i ispiranja PBS-om, koristila su se dva načina za sekundarnu detekciju primarnih protutijela:

1) Bojanje DAB-om

Za detekciju primarnih protutijela neovisnu o njihovom podrijetlu koristio se Streptavidin-Biotin Peroxidase System (K0690, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA), a nakon ispiranja PBS-om preparati su obojani DAB-om tijekom 10 minuta, na sobnoj temperaturi. Nakon toga su isprani destiliranom vodom i obojani hemalaunom. Rezovi su zatim uklopljeni u medij za uklapanje i pokriveni pokrovnim stakalcem. Stanice koje su reagirale s odgovarajućim primarnim protutijelima imale su smeđe obojanu citoplazmu ili jezgru. Stanice koje nisu reagirale s primarnim protutijelima, imale su jezgru hemalaunom obojanu u plavo i svijetlu citoplazmu. Pripravci su pregledani mikroskopom Olympus BX40 (Olympus, Tokyo, Japan) i slikani DP71 digitalnom kamerom.

Negativna kontrola

Kao negativna kontrola koristilo se bojanje kože bez primjene primarnog protutijela. Rezovi namijenjeni negativnoj kontroli kod imunohistokemijskog bojanja svakog antigena prošli su zajedno s ostalim rezovima identični postupak, osim što se nisu inkubirali s primarnim protutijelom, nego su za to vrijeme bili u PBS-u. Negativna kontrola imala je samo hemalaunom, odnosno DAPI-jem (4',6-diamidino-2-phenylindiole dihydrochloride – DAPI, D1306, Invitrogen Molecular Probes Inc, Eugene, OR, USA) plavo obojane jezgre stanica, bez smeđe boje, odnosno bez fluorescentnog signala citoplazmi ili jezgara stanica.

Pozitivna kontrola

Pozitivna kontrola na istraživanim rezovima imala je smeđe obojenje (bojanje DAB-om), odnosno fluorescentni signal (bojanje fluorescentnim sekundarnim protutijelima) pojedinih citoplazmi ili jezgara stanica u okolnim strukturama za koje se iz literature zna da reagiraju s primarnim protutijelima.

2) Imunofluorescentna metoda

Kod ove metode za prikazivanje vezanja primarnih protutijela, koristila su se sekundarna protutijela i to prema životinjskom podrijetlu primarnih protutijela:

- goat anti-mouse Texas Red, T-862, Jackson Immuno Research Lab., PA, USA u razrjeđenju 1:200;
- goat anti-rabbit Texas Red, sc-2780, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA u razrjeđenju 1:200;
- anti-rabbit Fluorescein izotiocijanat – FITC, AP132F Chemicon, Temecula, CA, USA u razrjeđenju 1:200;
- goat anti-mouse Rhodamine, AP124R, Jackson Immuno Research Lab., PA, USA u razrjeđenju 1:50);
- biotinizirana sekundarna protutijela sc-2040 i sc-2039 Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA u razrjeđenju 1:200 (kao dio protokola detekcije biljega);
- Streptavidin Alexa Fluor 488 konjugat, Invitrogen Molecular Probes Inc, Eugene, OR, USA.

Rezovi su inkubirani jedan sat sekundarnim fluorescentnim protutijelom u tamnoj komori.

Za dvostruko imunofluorescencijsko bojanje koristila se kombinacija dvaju primarnih protutijela koja su inkubirana jedan sat, a nakon ispiranja PBS-om dodala se kombinacija odgovarajućih sekundarnih protutijela i inkubirala također jedan sat. Nakon posljednjeg ispiranja PBS-om, rezovi su se uklopili u medij za uklapanje (Immuno-Mount, Shandon, Pittsburg, PA, USA) i pokrili pokrovnim stakalcem.

Stanice koje su reagirale s odgovarajućim kompleksom primarnog i sekundarnog protutijela imale su zeleno ili crveno obojanu citoplazmu ili jezgru. Stanice koje nisu reagirale s odgovarajućim kompleksom primarnog i sekundarnog protutijela imale su DAPI-jem plavo obojanu jezgru.

Pripravci su pregledani fluorescencijskim mikroskopom Olympus BX61 (Olympus, Tokyo, Japan) i fotografirani DP71 digitalnom kamerom te je napravljena analiza kolokalizacije u programu MBF_ImageJ for Microscopy (NIH, USA).

2.5. Mjerenje debljine kože, kvantifikacija, semikvantifikacija i statističke metode

2.5.1. Mjerenje debljine kože

Na pripravcima obojanim hemalaunom i eozinom, izmjerit će se udaljenost između dermo-epidermalne granice i površinskih stanica (osim oroženih) na nekoliko mjesta kože zdravih ispitanika i kože bolesnika sa KZB-om sa svrbežom, pomoću računalnog programa Cell[^] Software, Version 2.6

2.5.2. Kvantifikacija pozitivnih stanica (Ki-67)

Kvantifikacija pozitivnih stanica radit će se samo za pripravke obojane biljgom Ki-67 vizualiziran DAB-om. Pozitivne i negativne stanice brojat će se u tri nepriležeća reza i to u tri različita sloja kože: bazalnom, nazubljenom i površinskom. Bilo koji intenzitet bojanja stanica smatrat će se pozitivnim. Za ovu analizu koristit će se Olympus BX51 mikroskop s DP11 digitalnom kamerom kao i DP-SOFT Version 3.1 računalni program. U svakom području (50x50 μ m), izračunat će se udio pozitivnih stanica za svaki sloj kože. Podatci će se obraditi programom Excel 2003 i GraphPad Prism 4 (Microsoft, USA). Debljina kože kao i udio Ki-67 pozitivnih stanica u ukupnom broju stanica, izrazit će se kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Podatci će biti analizirani Kruskal-Wallis i Dunnovim *posthoc* testom. Razina značajnosti iznosit će 0.001.

2.5.3. Semikvantifikacija stanica pozitivnih na jezgrine (kaspaza-3) i citoplazmatske biljege (Bcl-2, Bax)

Semikvantifikacija uključuje određivanje intenziteta obojenja i raspodjele stanica pozitivnih na jezgrin biljeg kaspazu-3 te na citoplazmatske biljege Bcl-2 i Bax. Kod primjene citoplazmatskih biljega, ponekad nije moguće jasno razlučiti granice između susjednih stanica. Semikvantifikacija rezova obojanih DAB-om drugačije je stupnjevana od imunofluorescentno obojanih rezova zbog razlika u samoj metodi bojanja. Intenzitet obojenja u tkivu kod pripravaka obojanih DAB-om prikazao se u četiri kategorije: odsutnost reaktivnosti, \pm blaga reaktivnost, + umjerena reaktivnost i ++ jaka reaktivnost. Kod pripravaka obojanih imunofluorescentnom metodom intenzitet obojenja prikazan je u dvije kategorije: \pm slaba do umjerena reaktivnost i + umjerena do jaka reaktivnost.

2.6. Etička načela

Istraživanje je provedeno na uzorcima ljudske kože dobivenih *punch* biopsijom, a nakon potpisanog informiranog pristanka bolesnika te materijala dobivenog u svakodnevnom radu na Dermatovenerološkoj poliklinici, odnosno Dermatopatohistološkom laboratoriju Klinike za kožne i spolne bolesti KBC-a Split.

Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo KBC-a Split i Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta u Splitu. Suglasnost se sastoji od pismenog pristanka dijaliziranih bolesnika i zdravih ispitanika upoznatih s istraživanjem te odobrenja Etičkog povjerenstva nadležne ustanove.

Ograničavajući čimbenik veličine uzorka je pristanak bolesnika na relativno agresivnu, odnosno invazivnu metodu probatorne ekscizije uz primjenu lokalnog anestetika.

Poštivala su se etička načela o istraživanju u skladu s etičkim normama i međunarodnim ugovorima (*World Medical Association Declaration of Helsinki-52nd WMA General Assembly, Edinburgh, Scotland, October, 2000.*).

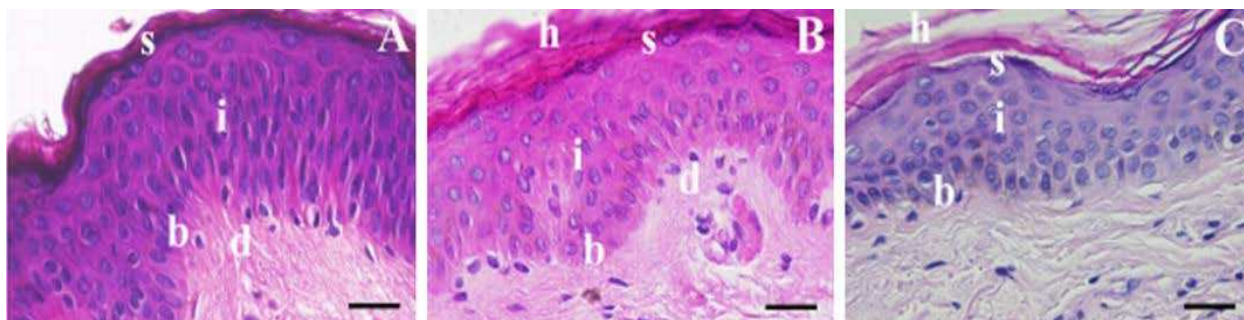
3. REZULTATI

3.1. Histološki izgled kože zdravih ispitanika

Epidermis zdravih ispitanika (mnogoslojni pločasti epitel) sastoji se od 6-7 slojeva epitelnih stanica (keratinocita), kojeg čine bazalne stanice na granici s dermisom, intermedijarni sloj s nekoliko redova poligonalnih stanica (nazubljeni sloj) te 1-2 reda površinskih plosnatih stanica bez jezgara (rožnati sloj). Ispod epidermisa nalazi se rahlo vezivno tkivo dermisa (slika 2A).

3.2. Histološki izgled kože dijaliziranih bolesnika

Epidermis kože dijaliziranih bolesnika sastoji se od 6 slojeva epitelnih stanica; površinski slojevi sadržavaju plosnate keratinocite i jedan sloj oroženih stanica. Ukupni broj epitelnih stanica nešto je manji na mjestima gdje dermalne papile prodiru duboko u epidermis (slike 2B i 2C).

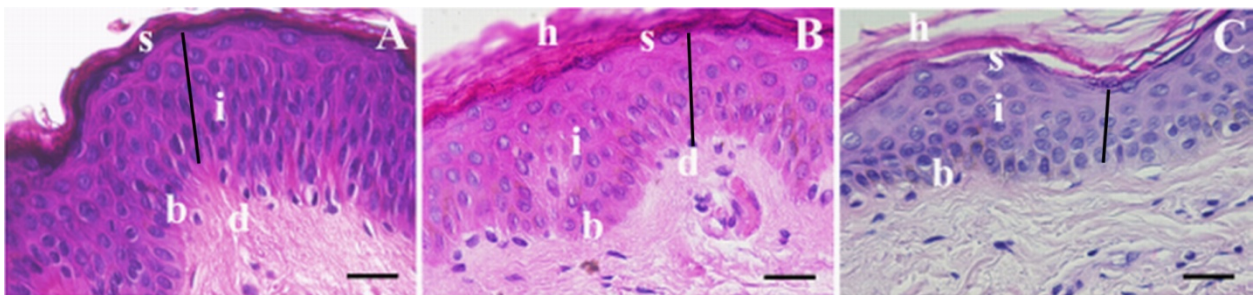


Slika 2. Usporedba epidermisa zdrave kože (2A) i kože dijaliziranih bolesnika; nakon 3 godine (2B) i 5 godina (2C) dijaliziranja. Epidermis se sastoji od bazalnog sloja (b), nazubljenog (i) i površinskog (s) te rožnatog sloja (h). Dermalne papile (d) ulaze u epidermis. Hematoksilin & eosin, x30, ljestvica=25 μ m.

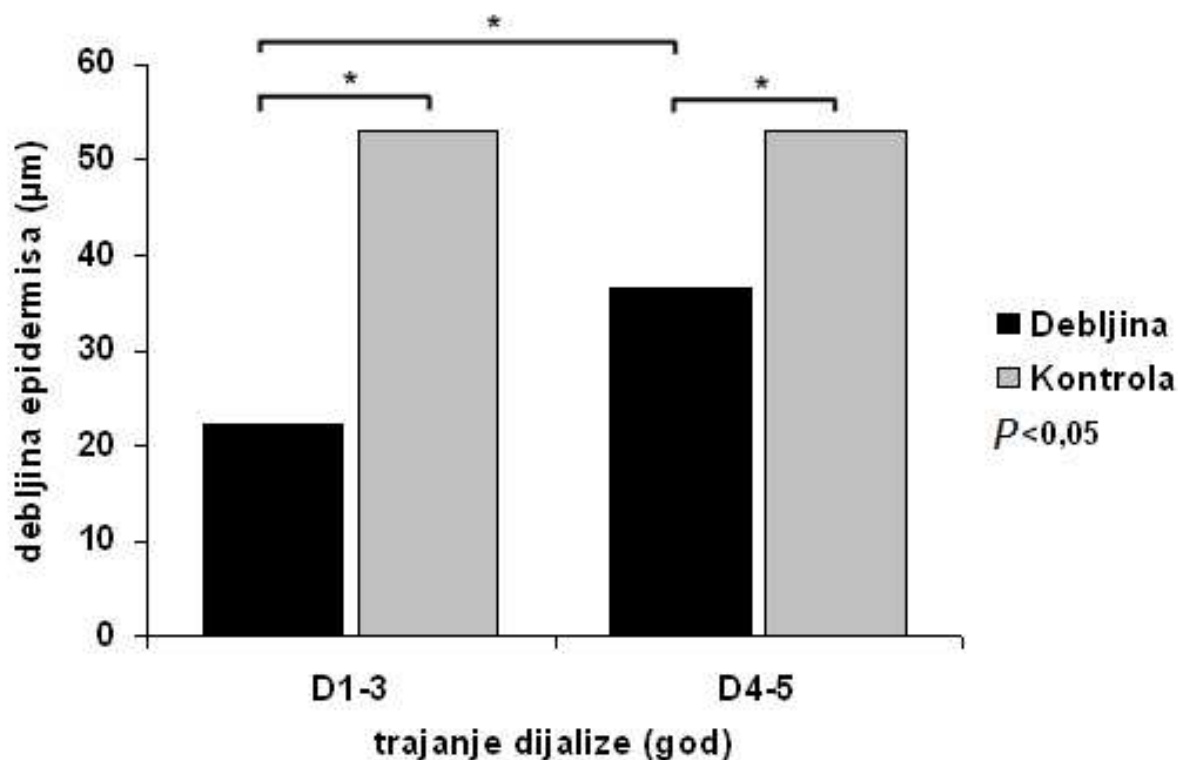
3.3. Mjerenje debljine epidermisa kože zdravih ispitanika i dijaliziranih bolesnika

Prosječna debljina epidermisa kože zdravih ispitanika, uzete s područja kože bedra, iznosila je 53 μ m. Prosječna debljina epidermisa bolesnika sa KZB-om bila je tanja od zdrave pa je nakon tri godine dijalize iznosila je 23 μ m, a nakon 4-5 godina 34 μ m. Dokazana je statistički značajna razlika debljine epidermisa između zdravih ispitanika i dijaliziranih bolesnika, kao i između bolesnika nakon 1-3 godine dijalize u odnosu na bolesnike koji su dijalizirani 4-5 godina (slike 3 i 4). Uočena je smanjena debljina epidermisa dijaliziranih bolesnika u odnosu na epidermis zdrave kože unatoč zadebljanju epidermisa nakon dugotrajnije dijalize.

Statistički značajna razlika u debljini epidermisa određena je kao $P < 0.001$.



Slika 3. Mjerenje debljine epidermisa kože zdravih (A) i dijaliziranih bolesnika (B i C)



Slika 4. Usporedba debljine epidermisa zdrave kože (kontrolna skupina) i kože dijaliziranih bolesnika, nakon 1-3, odnosno 4-5 godina dijalize. Postoji statistički značajna razlika (*) u debljini kože zdravih ispitanika u odnosu na kožu dijaliziranih bolesnika (Kruskal-Wallis i Dunnov posthoc test, $P < 0.001$).

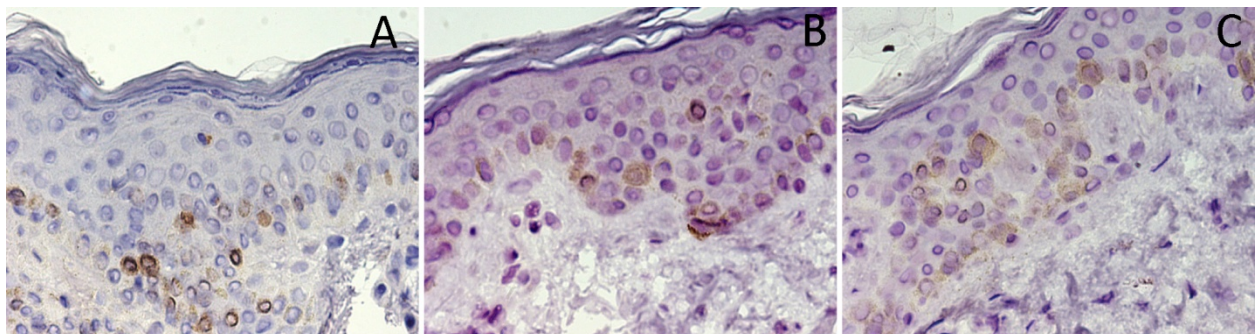
3.4. Bojanje Ki-67 proliferacijskim biljekom i određivanje broja (udjela) i raspodjele pozitivnih stanica u koži zdravih ispitanika i koži dijaliziranih bolesnika

U epidermisu kože zdravih ispitanika (slika 5A) te kože dijaliziranih bolesnika (slike 5B i 5C), smeđe obojane jezgre Ki-67 pozitivnih stanica nalazile su se pretežito u bazalnom sloju, ali su bile prisutne i u suprabazalnim slojevima.

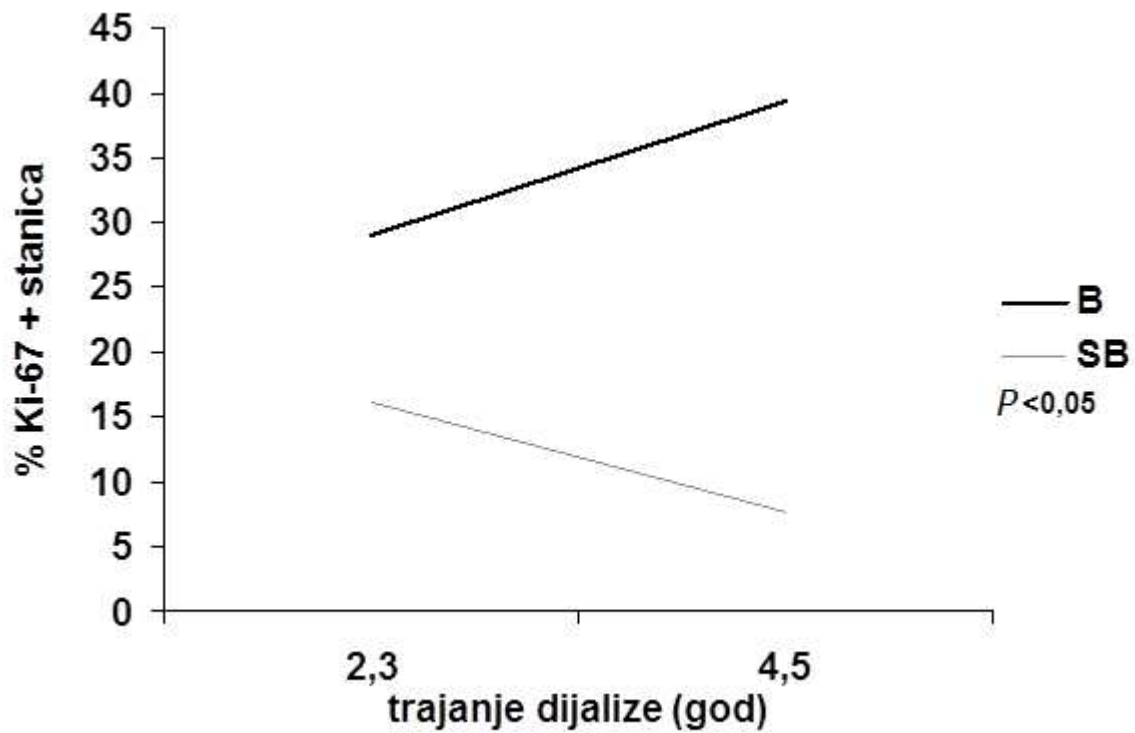
3.4.1. Kvantifikacija Ki-67 pozitivnih stanica

Bazalni sloj epidermisa zdrave kože sadržavao je 38.6 % stanica pozitivnih na biljeg Ki-67, a suprabazalni slojevi 22.7 % stanične populacije (slika 5A). U epidermisu kože dijaliziranih bolesnika nakon 2 i 3 godine dijalize udio Ki-67 pozitivnih stanica bazalnog sloja bio je 29 %, a suprabazalnih slojeva 16 %. Nakon 4 i 5 godina dijalize, bazalni sloj epidermisa sadržavao je 39.3 %, a suprabazalni slojevi svega 7.6 % Ki-67 pozitivnih stanica (slika 6).

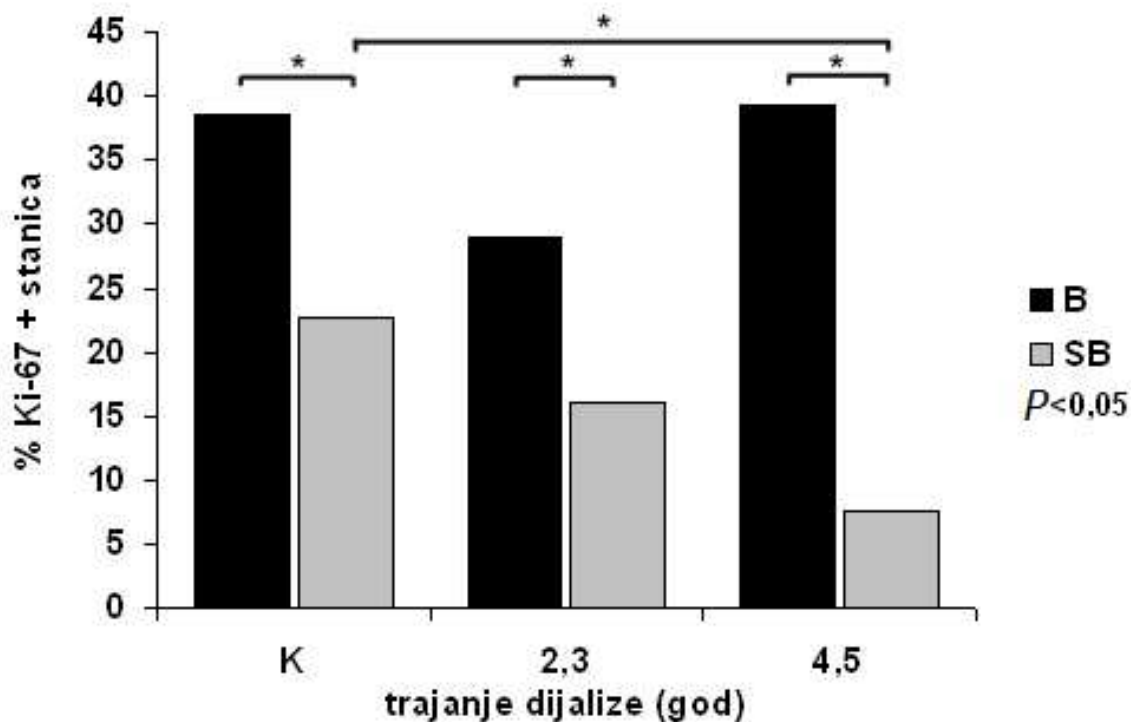
Bazalni sloj epidermisa kože zdravih ispitanika, kao i kože dijaliziranih bolesnika (2 i 3 god. 4 i 5 god.), sadržavao je statistički značajno veći udio (Kruskal-Wallis i Dunnov *posthoc* test, $P < 0.001$) Ki-67 pozitivnih stanica u odnosu na suprabazalne slojeve (slika 7). Postotak Ki-67 pozitivnih stanica u suprabazalnim slojevima epidermisa zdrave kože značajno je veći (Kruskal-Wallis i Dunnov *posthoc* test, $P < 0.001$) u odnosu na postotak Ki-67 pozitivnih stanica u suprabazalnim slojevima epidermisa kože bolesnika dijaliziranih tijekom 4, odnosno 5 godina dijalize (slika 7).



Slika 5. Imunohistokemijsko bojanje Ki-67 epidermisa kože: broj stanica pozitivnih na biljeg Ki-67 (smeđe obojane jezgre stanica) prisutnih u bazalnom sloju epidermisa zdrave kože (A) i kože dijaliziranih bolesnika nakon dvije (B), odnosno pet godina dijalize (C) veći je u odnosu na broj Ki-67 pozitivnih stanica u suprabazalnim slojevima kože.



Slika 6. Postotak stanica pozitivnih na biljeg Ki-67 u bazalnom i suprabazalnim slojevima kože nakon 2 i 3, odnosno 4 i 5 godina dijalize. Postotak Ki-67 pozitivnih stanica povećavao se s godinama dijalize u bazalnom sloju, dok se u suprabazalnim slojevima smanjivao (Kruskal-Wallis i Dunnov *posthoc* test, $P < 0.001$).



Slika 7. Usporedba postotka stanica pozitivnih na Ki-67 biljeg u bazalnom i suprabazalnim slojevima kože zdravih ispitanika i kože dijaliziranih bolesnika. U bazalnom sloju epidermisa kože zdravih ispitanika i kože dijaliziranih bolesnika broj pozitivnih stanica bio je statistički značajno(*) veći u odnosu na postotak istih u suprabazalnim slojevima kože ($P < 0.001$). Postotak pozitivnih stanica u suprabazalnom sloju epidermisa kože zdravih ispitanika bio je statistički značajno (*) veći u odnosu na broj pozitivnih stanica suprabazalnih slojeva epidermisa bolesnika dijaliziranih tijekom dužeg razdoblja ($P < 0.001$).

3.5. Dvostruko imunofluorescentno bojanje biljezima Bcl-2 i Bax i njihova kolokalizacijska analiza

3.5.1. Uzorci kože zdravih ispitanika (kontrolna skupina)

Bcl-2 bjelančevina najizraženija je u bazalnom sloju epidermisa zdrave kože, a intenzitet joj se smanjuje prema površinskim slojevima. U rožnatom sloju prisutan je jak izražaj navedenog biljega zbog nespecifičnog bojanja oroženih stanica.

Bax bjelančevina prisutna je u svim slojevima epidermisa, pri čemu je slabijeg intenziteta u bazalnom sloju, koji se pojačava prema površinskim slojevima epidermisa. U rožnatom sloju nema izražaja Bax bjelančevine.

Bcl-2/Bax (preklapanje): Bcl-2 bjelančevina je naglašeno izražena u bazalnom te prva dva sloja intermedijarnog (nazubljenog) sloja epidermisa, dok u površnijim slojevima prevladava izražaj Bax bjelančevine (slike 8A, 8B i 8C).

3.5.2. Uzorci kože bolesnika nakon dvije godine dijalize (peritonejska dijaliza)

Bcl-2 bjelančevina je vrlo izražena u stanicama bazalnog sloja te prvom redu stanica intermedijarnog sloja (mjestimično u trećem redu stanica) dok je izražaj u gornjim slojevima epidermisa manje izražen. U rožnatom sloju prisutno je nespecifično bojanje na Bcl-2 biljeg.

Bax bjelančevina je slabo izražena u bazalnom i prvom redu stanica intermedijarnog sloja epidermisa dok se prema površini epidermisa njezin izražaj pojačava.

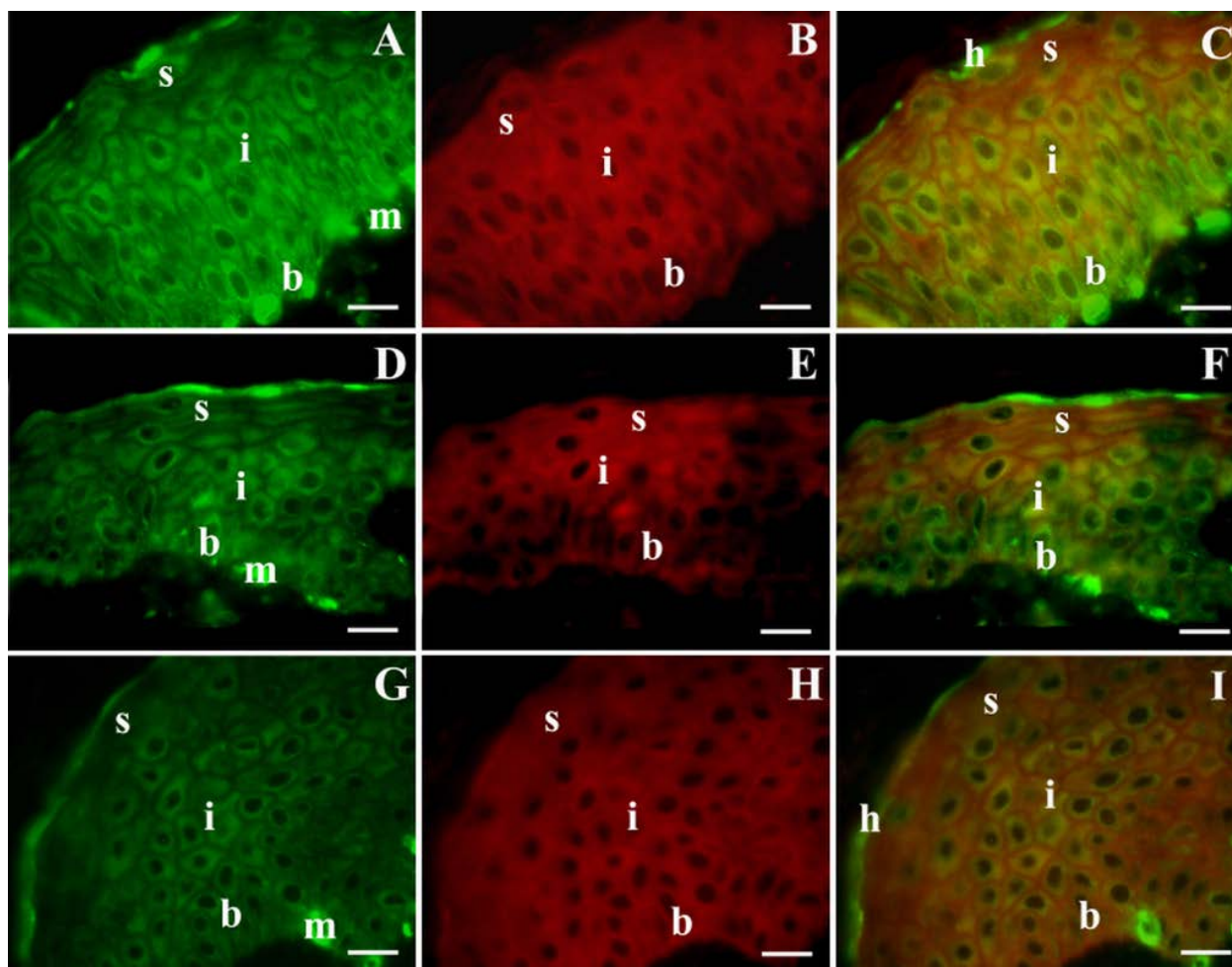
Bcl-2/Bax (preklapanje): Izražaj Bcl-2 bjelančevine prevladava u bazalnom sloju te prvom redu i u pojedinim stanicama drugog reda intermedijarnog sloja. Izražaj Bax bjelančevine prevladava u površinskim slojevima epidermisa (slike 8D, 8E i 8F).

3.5.3. Uzorci kože bolesnika nakon pet godina dijalize (hemodijaliza)

Bcl-2 bjelančevina pokazuje izražaj slabog intenziteta u bazalnom sloju epidermisa dok se u intermedijarnom sloju pojačava, a zatim slabi u dva sloja oroženih stanica.

Bax bjelančevina je snažno izražena u svim slojevima epidermisa, uključujući bazalni i intermedijarni sloj.

Bcl-2/Bax (preklapanje): Izražaj Bax bjelančevine prevladava u bazalnom i prva dva reda stanica intermedijarnog sloja. Samo pojedinačne stanice bazalnog sloja pokazuju snažni izražaj Bcl-2 bjelančevine (melanociti). Bcl-2 prevladava u površinskim redovima stanica intermedijarnog sloja dok u dva reda oroženih stanica Bax bjelančevina dominira u odnosu na Bcl-2 (slike 8G, 8H i 8I).



Slika 8. Dvostruko imunofluorescentno bojanje Bcl-2/Bax biljezima. Zdrava koža: Izražaj Bcl-2 bjelančevine prevladava u bazalnom (b) i dijelu intermedijarnog sloja (i) (A), dok je izražaj Bax bjelančevine naj snažniji u višim redovima intermedijarnog i površinskim slojevima epidermisa (s) (B). Bcl-2 bjelančevina se nespecifično obojala u oroženim stanicama i melanocitima (m). Preklapanje A+B pokazuje epidermalni zajednički izražaj Bcl-2/Bax, koji je različit ovisno o sloju epidermisa. Bcl-2 prevladava u nižim, a Bax u višim i površinskom sloju epidermisa (C). Dvostruko imunofluorescentno bojanje Bcl-2/Bax biljezima, ljestvica=10 μ m. Epidermis kože bolesnika nakon 3 godine dijalize: Izražaj Bcl-2 bjelančevine naj snažniji je u nižim slojevima epidermisa: bazalnom (b) i dijelu intermedijarnog sloja (i) (D), dok izražaj Bax bjelančevine prevladava u višim slojevima epidermisa: intermedijarnom i površinskom sloju (s). Bcl-2 bjelančevina je nespecifično obojala orožene stanice i melanocite (m). Preklapanje D+E pokazuje istovremeni izražaj u epidermisu: prevladavanje Bcl-2 bjelančevine u nižim, a Bax u višim slojevima epidermisa (F). Dvostruko imunofluorescentno bojanje Bcl-2/Bax biljezima, ljestvica=10 μ m. Epidermis kože bolesnika nakon 5 godina dijalize: Bcl-2 bjelančevina je snažnije izražena u površinskom (s) i intermedijarnim slojevima (i) u odnosu na bazalni sloj (b). Prisutno je nespecifično bojanje Bcl-2 biljegom u oroženim stanicama i melanocitima (m). Izražaj Bax bjelančevine je snažan u čitavom epidermisu (H). Preklapanje G+H pokazuje prevladavanje Bax bjelančevine u svim slojevima epidermisa (I). Dvostruko imunofluorescentno bojanje Bcl-2/Bax biljezima, ljestvica=10 μ m.

3.6. Imunofluorescentno bojanje TUNEL i kaspaza-3 biljezima (i DAPI bojanjem jezgara stanica)

3.6.1. Uzorci kože zdravih ispitanika (kontrolna skupina)

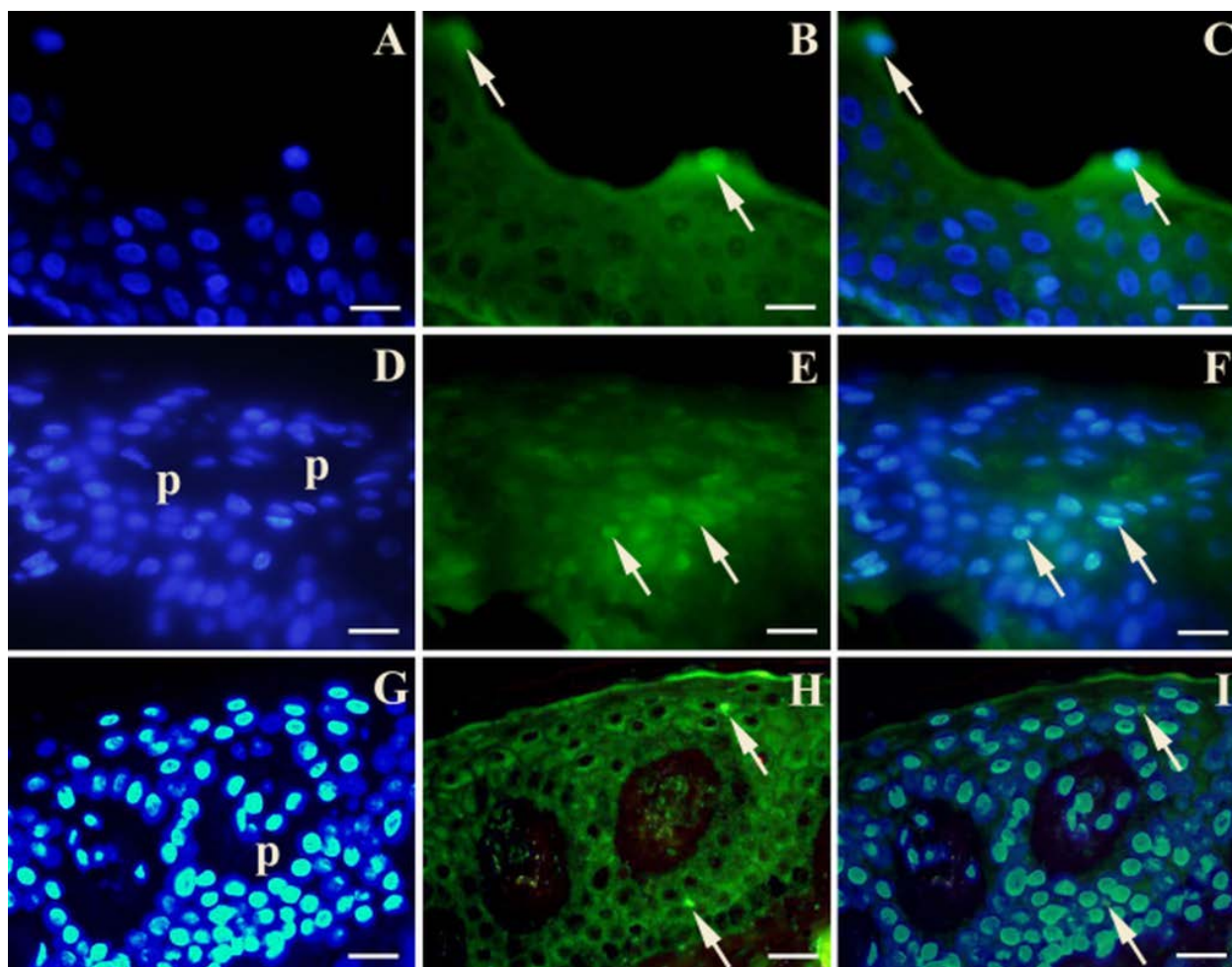
U epidermisu zdrave kože prisutne su plavo obojane jezgre (DAPI) u svim slojevima epidermisa (slika 9A), dok su TUNEL pozitivne stanice prisutne samo u najvišim slojevima epidermisa (slika 9B). Preklapanje A+B ukazuje na odsutnost zajedničkog izražaja TUNEL i DAPI u većini jezgara stanica epidermisa, osim u jezgrama površinskih oroženih stanica (slika 9C).

3.6.2. Uzorci kože bolesnika nakon tri godine dijalize (hemodijaliza)

DAPI bojanje plavo oboji jezgre svih stanica u epidermisu (slika 9D). Uoči se nekoliko TUNEL pozitivnih stanica u intermedijarnom sloju oko dubokih dermalnih papila (slika 9E). Preklapanje D+E pokazuje zajednički izražaj TUNEL i DAPI bojanja u jezgrama stanica intermedijarnog sloja oko dermalnih papila (slika 9F).

3.6.3. Uzorci kože bolesnika nakon pet godina dijalize (hemodijaliza)

DAPI bojanje plavo oboji jezgre stanica u čitavom epidermisu i dermalnim papilama koje duboko ulaze u epidermis (slika 9G). Dvije kaspaza-3 pozitivne stanice prisutne su u intermedijarnom sloju epidermisa (slika 9H). Preklapanje G+H pokazuje prisutnost dijelova kaspaza-pozitivnih stanica (apoptotska tjelešca) u intermedijarnom sloju epidermisa (slika 9I).



Slika 9. Imunofluorescentno bojanje TUNEL i kaspaza-3 biljegom te DAPI bojanje jezgara stanica. Epidermis zdrave kože: jezgre stanica svih slojeva epidermisa obojane s DAPI plavo (A). TUNEL metodom zeleno se oboje stanične jezgre površinskom sloju epidermisa (strelice) (B). Preklapanje A+B pokazuje zajednički izražaj DAPI i TUNEL bojanja u jezgrama stanica površinskog sloja epidermisa (strelice). Imunofluorescentno bojanje TUNEL i DAPI metodom; ljestvica=10 μ m. Epidermis kože bolesnika nakon 3 godine dijalize: DAPI plavo oboji sve jezgre epidermisa. Dermalne papile koje duboko ulaze u epidermis (p) okruženih stanicama bazalnog sloja epidermisa (D). TUNEL bojanje pokazuje pojedine fluorescentno zelene jezgre stanica (strelice) koje okružuju papile (E). Preklapanje D+E(F) pokazuje istovremeni izražaj DAPI i TUNEL bojanja (strelice) u stanicama oko papila. Imunofluorescentno bojanje TUNEL i DAPI metodom; ljestvica=10 μ m. Epidermis kože bolesnika nakon 5 godina dijalize: DAPI bojanjem plavo obojane jezgre epidermisa i dermalnih papilla (p) (G). Kaspaza-3 fluorescentno bojanje uočava se u površinskom sloju, ali i u intermedijarnom sloju epidermisa (strelice) (H). Preklapanje G+H pokazuje kaspazom-3 obojana apoptotska tjelešca umirućih stanica intermedijarnog sloja epidermisa (strelice) (I). Imunofluorescentno kaspaza-3 i DAPI bojanje; ljestvica=10 μ m.

4. RASPRAVA

4.1. Uloga stanične proliferacije u održavanju građe i funkcije epidermisa kože zdravih ispitanika i kože dijaliziranih bolesnika

4.1.1. Proliferacija stanica epidermisa tijekom razvoja i u zdravoj koži

Koža se sastoji od dva podrijetlom, građom i funkcijom različita dijela: epidermisa, koji nastaje od površinskog ektoderma i dermisa, koji nastaje od mezoderma. Epidermis je mnogoslojni pločasti epitel kojeg izgrađuje nekoliko slojeva stanica, a za njegovo obnavljanje i održavanje debljine odgovorna je proliferacija stanica u bazalnom i nazubljenom sloju. Proces nastanka epidermisa tijekom embrionalnog razvoja također je uvjetovan staničnom proliferacijom, koja osigurava postupno povećanje broja redova stanica od jednoslojnog epitela koji je prisutan u ranom embrionalnom razdoblju do mnogoslojnog epitela koji je svojstven kasnom fetalnom razdoblju. Početkom drugog mjeseca jednoslojni epitel se mijenja te dobiva površinski sloj plosnatih stanica tzv. periderm ili *epitrichium*, a daljnjom proliferacijom stanica bazalnog sloja nastane treći, intermedijarni sloj.

Potkraj četvrtog mjeseca, epidermis zadobije svoj konačni izgled i u njemu se mogu razlikovati četiri sloja od kojih je temeljni ili bazalni sloj, koji se naziva i zametni (germinativni) sloj, dio epidermisa u kojem mitotskim diobama nastaju nove stanice. U tom se sloju kasnije oblikuju grebeni i udubine, čiji se karakteristični raspored na površini kože odražava u otiscima prstiju. Suprabazalno se nalaze još tri sloja, od kojih se u nazubljenom sloju stanice također mogu dijeliti, dok je proliferacija odsutna u zrnatom i rožnatom sloju. Tijekom prva tri mjeseca razvoja, u epidermis prodiru stanice koje potječu od neuralnog grebena. One sintetiziraju pigment melanin, koji se dendritičkim izdancima prenosi u epidermalne stanice. Te se stanice nazivaju melanociti i nakon rođenja uzrokuju pigmentaciju kože. Korijum (dermis) nastaje od mezenhima smještenog ispod ektoderma. Tijekom trećeg i četvrtog mjeseca, vezivno tkivo dermisa izbočuje se u slojeve epidermisa u obliku brojnih nepravilnih izdanaka (dermalne papile). U papilama se nalaze krvne kapilare i osjetni živčani završetci. U potkožnom sloju (*subcutisu*) razvije se u drugoj polovici fetalnog razvoja masno tkivo (64). U zdravoj koži proliferacija omogućuje održavanje normalne debljine epidermisa, kao i njegove funkcije. Ki-67 antigen je nehistsonska bjelančevina visoke molekulske mase i najpouzdaniji biljeg proliferirajućih stanica (65).

Ki-67 izražaj vidljiv je u svim (G1, S, G2 i M) fazama staničnog ciklusa, osim u G0 fazi (66). Bojanje na Ki-67 je najjednostavnija i najbolja metoda proučavanja proliferativne aktivnosti stanica unutar epidermisa

U prethodnim istraživanjima, proliferacija unutar epidermisa analizirala se u koži zdravih ispitanika i koži bolesnika sa psorijazom. Dok su u zdravoj koži Ki-67 pozitivne stanice bile prisutne u bazalnom i jednom redu stanica iznad bazalnog sloja, u epidermisu bolesnika sa psorijazom bile su prisutne u bazalnom te više suprabazalnih slojeva. U zdravoj koži postotak Ki-67 pozitivnih stanica bio je 4.5 %, a u psorijatičnom epidermisu 54 % (33).

4.1.2. Stanična proliferacija u bolestima i tumorima kože

Do sada je stanična proliferacije uz pomoć biljega Ki-67 najviše istraživana u tumorima kože (seboroična keratoza, keratoakantom, bazocelularni karcinom, planocelularni karcinom, Bowenova bolest) i prekancerozama, u kojima se imunohistokemijskim metodama određivala frakcija rasta (broj Ki-67 pozitivnih stanica podijeljen s ukupnim brojem tumorskih stanica, izražen kao postotak). Na taj način se procjenjivala brzina rasta tumora, odnosno njegov malignitet, koji je bio veći u slabije diferenciranih planocelularnih karcinoma. Također je uočena značajne razlika u frakciji rasta između keratoakantoma i planocelularnog karcinoma, što bi moglo olakšati dijagnostiku i razlikovanje ova dva klinička entiteta (67). Ta su istraživanja pokazala da indeks proliferacije određen imunohistokemijskim bojanjem pomoću Ki-67 protutijela ima prognostičku vrijednost u određenom tipu tumora (66). Izražaj Ki-67 biljega također je bio povećan u koži oštećenoj suncem kao i u tumorima kože fotoekspozirane regije (68). Najveći izražaj Ki-67 biljega pronađen u slabije diferenciranom planocelularnom karcinomu kože, potvrđuje da je agresivnost tumora povezana s povećanom proliferacijom (69). Razina izražaja Ki-67 biljega korelirala je s progresijom tumora, metastatskim potencijalom i smanjenim preživljenjem bolesnika (66). Ki-67 biljeg je također pojačanog izražaja u agresivnijem, recidivirajućem obliku bazocelularnog karcinoma (70).

4.1.3. Stanična proliferacija u koži dijaliziranih bolesnika

Dosadašnja istraživanja uočila su povećanje debljine epidermisa te prisutnost apoptotskih mehanizama unutar epidermisa dijaliziranih bolesnika sa svrbežom, no do sada nije analizirana proliferacija (odnosno prisutnost Ki-67 biljega) kao proces koji bi se suprotstavljao ubrzanoj apoptozi u koži ovih bolesnika (62).

U svrhu provjere utjecaja stanične proliferacije na promjenu debljine epidermisa, u našem je istraživanju provedeno mjerenje ukupne debljine epidermisa kože zdravih ispitanika i epidermisa dijaliziranih bolesnika sa svrbežom kao i analiza prostornog rasporeda i broja stanica pozitivnih na proliferacijski biljeg Ki-67. Naše je istraživanje pokazalo da je u koži dijaliziranih bolesnika proliferacijski indeks bio 11.8 % nakon 3 godine, a 12.5 % nakon 5 godina dijalize. U kontrolnoj zdravoj koži, proliferacijski indeks je bio 10.8 %. Navedeni rezultati ukazuju na povećani proliferacijski indeks u koži dijaliziranih bolesnika.

Statistička analiza mjesta stanične proliferacije u bazalnom i suprabazalnom sloju ukazala je da je u zdravih ispitanika proliferacija bila smještena u bazalnom sloju, dok je u dijaliziranih bolesnika uočen pad stanične proliferacije u bazalnom i suprabazalnom sloju nakon tri godine u odnosu na zdravu kožu, a zatim i blagi porast stanične proliferacije u bazalnom sloju. Značajan pad proliferacije u suprabazalnim slojevima uočen je nakon pet godina dijalize, u odnosu na kožu zdravih ispitanika kao i kožu dijaliziranih bolesnika nakon tri godine (71). Iz spomenutog je razvidno da su promjene u proliferacijskom indeksu i lokalizaciji proliferirajućih stanica unutar epidermisa uočene u dijaliziranih bolesnika sa svrbežom, ali i u drugih patoloških zbivanja u koži poput psorijaze i karcinoma. Do sada je opisana proliferacija endotela s posljedičnim suženjem kapilarnog lumena kao jednog od znakova promjena u koži dijaliziranih bolesnika (72).

4.2. Mjerenje debljine kože u zdravih i dijaliziranih bolesnika

Usporedbom debljine epidermisa kože zdravih ispitanika i kože dijaliziranih bolesnika, uočena je značajno manja debljina epidermisa u dijaliziranih bolesnika tijekom cijelog razdoblja istraživanja. Prethodna istraživanja histoloških promjena kože u bolesnika sa KZB-om razmatrala su uglavnom promjene arhitekture krvnih žila u smislu mikroangiopatije, zadebljanja bazalne membrane i proliferacije endotela te perikolagenog depozita amiloida označenog kao beta-2 mikroglobulin amiloidoza (73). Uz suženje kapilarnog lumena kao posljedice proliferacije endotela uočilo se nakon pet godina, a uočena je i atrofija epidermisa nakon deset godina dijaliziranja (72). Atrofične promjene epidermisa sukladne su našim nalazima u bolesnika nakon 5-godišnjeg trajanja dijalize.

Histološka analiza, kao metoda istraživanja kože, rabila se i prilikom istraživanja pojedinih specifičnih poremećaja kože u dijaliziranih bolesnika kao što su nefrogena fibrozna dermatopatija ili nekroza kože kao posljedica taloženja kalcifikata (74, 75).

Pojedine studije uključivale su histološku analizu kože dijaliziranih bolesnika te su zaključile da je poremećena ravnoteža proliferacije i apoptoze keratinocita u epidermisu kože. Debljina epidermisa i izražaj bjelančevina p-53 i Bcl-2 bili su značajno veći u uzorcima kože dijaliziranih bolesnika u odnosu na uzorke zdrave kože. Povećana epidermalna debljina objašnjena je pojačanim izražajem Bcl-2 bjelančevine i njenim antiapoptotskim učinkom, kao i odsutnošću apoptotskih stanica u epidermisu dijaliziranih bolesnika. Ovim istraživanjem nije se uzelo u obzir trajanje dijalize te je korišteno imunohistokemijsko bojanje (p53 i Bcl-2) i TUNEL metoda bojanja apoptotskih stanica koje je teško dokazati jer brzo propadaju u tkivu (62). Naša su istraživanja pokazala nešto drugačije rezultate. Naime, ukupna debljina epidermisa smanjivala se u dijaliziranih bolesnika proporcionalno s dužinom trajanja dijalize. Iako je proliferacijski indeks bio veći u koži dijaliziranih bolesnika, ukupno nije nastalo značajno povećanje debljine epidermisa kože u odnosu na zdravi epidermis. Razlog dobivenim rezultatima mogla bi biti činjenica da stanična proliferacija nije jedini čimbenik koji utječe na debljinu kože, već da na debljinu epidermisa utječu i drugi čimbenici poput stanične apoptoze, odnosno ravnoteže proapoptotskih i antiapoptotskih čimbenika.

4.3. Inervacija kože i mogući mehanizmi nastanka svrbeža

Živčani završetci osjetnih vlakna rasprostranjeni su po čitavoj površini kože, omogućavaju prijenos osjeta iz okoliša te na taj način sprječavaju ozljede kože. U neurofiziološkom smislu, živčani završetci pripadaju skupini A δ i C vlakana promjera manjeg od 1 μ m. Osjetna vlakna potječu iz dorzalnog korijena spinalnog ganglija, prolaze kroz dermis, paralelno s epidermo-dermalnom granicom, a zatim prodiru kroz bazalnu membranu, okomito se penjući u epidermis gdje završavaju u zrnatom sloju u obliku slobodnih živčanih završetaka (76). Mnogi pruritogeni medijatori i modulatori otpušteni na periferiju, mogu direktno aktivirati navedena C-vlakna, vežući se na specifične receptore na živčanim završetcima, ili mogu indirektno inducirati druge stanice na otpuštanje pruritogenih medijatora i modulatora. Živčani završetci mogu biti aktivirani egzogenim mehaničkim, kemijskim i biološkim podražajima, što rezultira svrbežom (77). Osjetna vlakna su prenositelji osjeta boli i svrbeža u koži. Dosadašnja histološka istraživanja dokazala su veću gustoću epidermalnih živčanih završetaka u koži bolesnika s atopijskim dermatitisom, kontaktnim dermatitisom i suhoćom u odnosu na zdrave ispitanike. Živčani čimbenik rasta (engl. *Nerve Growth Factor* - NGF) kojeg izlučuju keratinociti, najveći je medijator gustoće inervacije kože.

Veća koncentracija NGF-a nađena je u oštećenjima kože u bolesnika sa svrbežom te u određenih upalnih bolesti kože (78). Oštećenje kožne barijere koje je prisutno u nekim upalnim bolestima kože uzrokuje promjene epidermalne inervacije, čineći kožu osjetljivijom na podražaje, a time i na svrbež (79). Histamin-neovisni svrbež pojavljuje se i u ljudi i u životinja, a u njegovom nastanku sudjeluju amini, proteaze, neuropeptidi, citokini, kanabinoidi i opiodi s odgovarajućim receptorima te se ponašaju kao medijatori i/ili modulatori svrbeža. Tako odgovor na svrbež u epidermisu najvjerojatnije nastaje interakcijom između imunoloških stanica, keratinocita i osjetnih vlakana. Oštećenje kože pokreće poremećaj izražaja molekula u aksonskim završetcima, povećavajući gustoću epidermalnih osjetnih vlakana.

Proširenje međustaničnih prostora u epidermisu zaslužno je za prodiranje i izduživanje živčanih vlakana u unutarjost epidermisa kao i infiltraciju upalnim stanicama (80). Epidermalna hiperinervacija sudjeluje u indukciji ili pojačavanju svrbeža u kožnih bolesti povezanih s oštećenom kožnom barijerom (81).

Iako se prevalencija uremijskog svrbeža u dijaliziranih bolesnika smanjila u posljednjih 10 godina, vjerojatno zbog usavršavanja metoda dijalize te razvoja biokompatibilnih membrana dijalizatora, svrbež je još uvijek prisutan u 42 – 52 % bolesnika sa KZB-om te je dokazana povezanost svrbeža s povećanim mortalitetom od 17 % u ovih bolesnika (13).

Samo su pojedina istraživanja vrednovala kliničke karakteristike uremijskog svrbeža. Bolesnici sa KZB-om najčešće razviju svrbež već prije samog početka dijalize, tako da do sada nije nađena povezanost prevalencije i intenziteta svrbeža s dobi, spolom ili vrstom podležeće bolesti bubrega (81). Svrbež se može klasificirati kao pruritoceptivni, neuropatski, neurogeni ili psihogeni (82). Neurofiziologija svrbeža i boli vrlo je slična: za prijenos oba osjeta zaslužna su C-vlakna u dorzalnim rogovima spinalnih ganglija koji se prenose do talamusa i somatosenzornog korteksa lateralnim spinothalmičkim putem. Pretpostavlja se da se dva različita osjeta moduliraju na različitim razinama (centralno i periferno) (83). Svrbež i bol prisutni su zajedno u bolestima kao što su postherpetična neuralgija, *notalgia paresthetica*, HIV infekcija i multipla skleroza. Različiti upalni medijatori (bradikinin, serotonin, prostanoidi, interleukini i nizak pH) mogući su periferni medijatori boli i svrbeža, koji čine nociceptore osjetljivim na vanjski podražaj (84).

Bolesnici na hemodijalizi navode kroničnu bol i svrbež, što ukazuje da dvije različite skupine osjetnih vlakana moduliraju osjet svrbeža na centralnoj, umjesto na perifernoj razini (85).

Patofiziologija uremijskog svrbeža složena je i mnogi uremijski i neuremijski čimbenici doprinose njegovu nastanku. Navode se dvije teorije nastanka svrbeža temeljem dosadašnjih istraživanja: imunohipoteza i opioidna hipoteza.

Imunohipoteza smatra US upalnom sustavnom bolešću umjesto lokalnim poremećajem kože. Ova teorija se temelji na istraživanjima koja su pokazala pozitivan učinak UVB fototerapije na svrbež kao i terapija talidomidom i inhibitorima kalcineurina (tacrolimus) (86). UVB fototerapija utječe na diferencijaciju Th1- limfocita u korist Th2- limfocita i smanjuje razinu interleukina 2 (IL).

Serumske razine upalnih biljega, kao što je C-reaktivni protein (CRP) i IL-6, povišene su u bolesnika s US-om, što potvrđuje upalnu teoriju njegova nastanka (16). Opioidna hipoteza objašnjava US kao posljedicu promjena u endogenom opioidergičnom sustavu, s pretjeranim izražajem opioidnih μ -receptora u dermalnim stanicama i limfocitima (17).

Stimulacija antagonista μ -opioidnih receptora u kombinaciji s κ -opioidnim receptorima smanjuje svrbež te je primjena miješanih agonista-antagonista opioidnih receptora u fazi istraživanja na životinjskim modelima s pozitivnim rezultatima glede inhibicije svrbeža (87). Iako su serumske razine histamina mnogo više u uremijskih bolesnika sa svrbežom nego u neuremičara ili uremičara bez svrbeža, nije se dokazala povezanost jakosti svrbeža s razinom histamina. Histaminski H1 receptori ne sudjeluju sami u prijenosu osjeta svrbeža, čemu govori u prilog i neučinkovitost antihistaminisne terapije (blokatora H1 receptora) u liječenju US-a. Sve se više spominje uloga H4 receptora u osjetnim neuronima kože kao i upalnih medijatora (kalikreina, interleukina IL-2, acetilkolina itd.) koji se posredstvom histamina otpuštaju iz mastocita (88). Pojedina imunohistokemijska istraživanja koja su analizirala inervaciju kože bolesnika sa KZB-om dokazala su redukciju ukupnog broja živčanih neuron-specifičnih enolaza-imunoreaktivnih (NSE-IR) vlakana u epidermisu i dermisu što se objašnjava distalnom aksonalnom degeneracijom i demijelinizacijom, odnosno uremijskom polineuropatijom (24). Naše istraživanje nije analiziralo moguće promjene u inervaciji epidermisa dijaliziranih bolesnika sa svrbežom, ali uočeno stanjenje epidermisa kao i promjene u signaliziranju susjednih keratinocita na živčane završetke, moglo bi objasniti njihovu povećanu osjetljivost i nastanak osjeta svrbeža.

4.4. Proapoptotski i antiapoptotski čimbenici u koži zdravih ispitanika i koži dijaliziranih bolesnika

Temeljem našeg istraživanja na uzorcima kože dijaliziranih bolesnika sa svrbežom uočili smo razlike u ravnoteži bjelančevina regulatora apoptoze u epidermisu, odnosno prevagu Bax (proapoptotske) bjelančevine u odnosu na Bcl-2 (antiapoptotsku) bjelančevinu u bolesnika na dugotrajnoj dijalizi.

Antiapoptotska Bcl-2 bjelančevina je, osim vodeće uloge tijekom embrionalnog razvoja, ključna u održavanju homeostaze i broja stanica u zrelim tkivima kao i u održavanju imunskog sustava. Poremećaj njene regulacije pridonosi nizu patoloških oštećenja, a uključuju poremećaje blokiranja apoptoze (karcinogeneze), neodgovorajuće ili pretjerane apoptoze (neurodegenerativne bolesti, autoimunosne bolesti i ishemiju) (89).

Našim istraživanjem dokazali smo najsnažniji izražaj Bcl-2 bjelančevine u bazalnom sloju epidermisa zdrave kože te u prva dva sloja stanica intermedijarnog sloja, s postupnim slabljenjem intenziteta prema površinskim slojevima epidermisa.

U epidermisu kože dijaliziranih bolesnika, nakon dvije godine dijalize, Bcl-2 bjelančevina bila je prisutna u bazalnom te prvom redu stanica intermedijarnog sloja, dok je nakon pet godina dijalize Bcl-2 bio snažnije izražen u površinskom i intermedijarnom sloju epidermisa u odnosu na bazalni sloj. Dobiveni rezultati pokazuju promjene u intenzitetu i raspodjeli antiapoptotske Bcl-2 bjelančevine u dijaliziranih bolesnika sa svrbežom.

Do sada je Bcl-2 bjelančevina dokazana u bazalnom i suprabazalnim slojevima epidermisa bolesnika na dijalizi, za razliku od zdrave kože gdje je imunohistokemijskim metodama dokazana samo u bazalnom sloju (62).

Najvažniji put apoptotske stanične smrti, odnosno mitohondrijski put, kontroliraju članovi obitelji Bcl-2 bjelančevina. Povećani izražaj Bcl-2 bjelančevine dokazan je u nastanku brojnih hematoloških bolesti (kronična limfocitna i akutna limfoblastična leukemija i non-Hodgkin limfom) te u karcinomu pluća i prostate. Niska razina proapoptotskih bjelančevina povezuje se s povećanom incidencijom, lošijom prognozom ili otpornošću na kemoterapiju u određenih tipova kolorektalnog karcinoma, melanoma i kronične limfocitne leukemije (90, 91).

Apoptotska neravnoteža odgovorna je i za nastanak ishemijskih poremećaja krvožilnog sustava i autoimunskih bolesti kao što su reumatoidni artritis, dijabetes tipa 1, sustavni eritematozni lupus, sindrom Sjogren i Chronova bolest. Miševi kojima je uklonjen gen za Bcl-2 u T i B- limfocitima, zaštićeni su od sepsom inducirane limfocitne apoptoze (92). Povišena razina Bcl-2 bjelančevina pronađena je u eozinofilima sputuma alergičnih bolesnika te je povezana s težinom astme (93,94). Iz navedenog je razvidno da bi regulacija Bcl-2 bjelančevine na molekularnoj razini mogla biti idući korak u terapiji navedenih poremećaja.

U zdravoj koži, Bcl-2 bjelančevina dokazana je u bazalnim keratinocitima, dlaci i znojnicama. Bcl-2 bjelančevina je imunohistokemijskom metodom dokazana i u melanocitima zdrave kože, odnosno dendritičkim stanicama neurogenog podrijetla bazalnog sloja (95).

U bazocelularnom karcinomu i melanomu, za razliku od planocelularnog karcinoma, dokazana je visoka prisutnost Bcl-2 bjelančevine što bi govorilo u prilog poremećene regulacije ove bjelančevine kao uzroka nekih nemelanomskih tumora kože (96, 97). U koži bolesnika koji boluju od psorijaze, nastaje hiperprolifracija s nepotpunom diferencijacijom epidermalnih keratinocita i smanjenom apoptozom keratinocita. Keratinociti ovih bolesnika otporni su na apoptozu, što je jedan od glavnih uzroka ovog poremećaja kože (98).

U koži psorijatičnih bolesnika dokazan je pojačan izražaj Bcl-2 bjelančevine, čak i u klinički nepromijenjenoj koži što doprinosi zadebljanju, odnosno hiperplaziji epidermisa. Prisutnost snažnog izražaja Bax i Bak bjelančevine u promijenjenoj koži ovih bolesnika vjerojatno je jedini inhibitorski mehanizam koji se suprotstavlja intenzivnoj proliferaciji (43).

Proapoptotska Bax (Bcl-2 associated x) bjelančevina je proapoptotski član Bcl-2 obitelji te zajedno s Bcl-2 bjelančevinom sudjeluje u kontroli apoptoze. Bcl-2 i Bax su antagonisti i u slučajevima kad Bax prevladava, stanica podliježe apoptozi. Kada je Bcl-2 izraženiji od Bax-a, zaustavljanjem procesa apoptoze, stanica preživljava. U poremećajima stanične proliferacije (tumori), relevantan indikator stupnja malignosti je odnos između ove dvije bjelančevine. Tzv. *high Bcl-2 ratio*, u kojem je Bcl-2 u prevlasti nad Bax bjelančevinom karakteristika je mnogih tumora (99). Do sada je imunohistokemijskim metodama dokazana prisutnost proapoptotske bjelančevine Bax u zdravoj koži i kožnim adneksima, s pojačanim izražajem u suprabazalnim slojevima epidermisa u odnosu na bazalne keratinocite. Dokazana je i njena prisutnost u koži bolesnika koji boluju od psorijaze te u keratoakantomu.

Western blot metodom potvrđena je njena prisutnost u zdravoj koži, psorijazi i planocelularnom karcinomu, a odsutnost u bazocelularnom karcinomu (100). Prisutnost Bax bjelančevine do sada nije istraživana u koži dijaliziranih bolesnika, za razliku od p-53 bjelančevine i Bcl-2 čiji je pojačan izražaj dokazan u pojedinim istraživanjima. Također je u istih bolesnika, suprotno našim rezultatima, dokazana povećana debljina epidermisa u odnosu na zdravu kožu. Apoptotske stanice u ovom slučaju nisu pronađene u epidermisu kože bolesnika na dijalizi (62). Našim istraživanjem dokazali smo prisutnost Bax bjelančevine u čitavom epidermisu zdrave kože, koja je bila slabijeg intenziteta u bazalnom sloju, a pojačanog u površinskom sloju epidermisa. U epidermisu kože bolesnika nakon dvije godine dijalize, izražaj Bax bjelančevine je sličnog rasporeda kao i u koži zdravih ispitanika.

Međutim, nakon pet godina dijalize, Bax bjelančevina bila je snažno izražena u čitavom epidermisu, uključujući intermedijarne slojeve i bazalni sloj. Stoga naši rezultati upućuju na biokemijske promjene u koži dijaliziranih bolesnika, posebice u onih s dugotrajnom dijalizom. Te se promjene očituju povećanim intenzitetom i promjenom rasporeda u izražaju proapoptotske Bax bjelančevine.

4.4.1. Odnos između proapoptotskih i antiapoptotskih čimbenika u koži zdravih ispitanika i koži dijaliziranih bolesnika sa svrbežom

U epidermisu kože zdravih ispitanika antiapoptotska Bcl-2 bjelančevina prevladavala je u bazalnom (zametnom) sloju epidermisa i u prva dva reda stanica intermedijarnog (nazubljenog) sloja dok je u višim slojevima prevladavao izražaj proapoptotske Bax bjelančevine.

Navedeni raspored i odnos antiapoptotskih i proapoptotskih bjelančevina u zdravoj koži očekivan je nalaz, s obzirom na to da se u bazalnom sloju odvija dioba stanica i osigurava nastanak i preživljenje onih stanica koje će nadomjestiti stanice odumrle apoptozom u površinskom sloju.

Tijekom prve tri godine dijaliziranja nije uočena značajna razlika u raspodjeli navedenih bjelančevina u odnosu na zdravu kožu. Međutim, dijaliza koja traje duže od tri godine, uzrokuje značajni poremećaj ravnoteže bjelančevina regulatora apoptoze unutar epidermisa, a očituje se pojačanim izražajem Bax bjelančevine i smanjenim izražajem Bcl-2 bjelančevine u bazalnom i suprabazalnim slojevima epidermisa dijaliziranih bolesnika.

Također, tijekom razdoblja dugogodišnje dijalize, apoptotske stanice (pozitivne na TUNEL i kaspaza-3 metodu bojanja) pojavljuju se ne samo u površinskom sloju epidermisa (kao u zdravoj koži), nego i u intermedijarnom sloju.

4.4.2. Apoptoza i utjecaj regulatora apoptoze na epidermis kože zdravih ispitanika i kože dijaliziranih bolesnika sa svrbežom

Apoptoza je proces programirane stanične smrti koja održava homeostazu unutar kože, upravljajući proliferacijom keratinocita i stvaranjem rožnatog sloja. Poremećaj apoptoze čini patofiziološku osnovu brojnih bolesti kože. Imunofluorescencijske metode nisu prethodno korištene u istraživanju apoptotskih promjena u koži dijaliziranih bolesnika.

Apoptoza također sudjeluje u uklanjanju neželjenih stanica tijekom embrionalnog razvoja, normalne izmjene stanica u tkivima koja se dijele kao i u patološkim stanjima (34). Danas se zna da je apoptoza genski uvjetovana, a morfološke su promjene rezultat aktivacije unutarstaničnih signalnih puteva, čija je jedina uloga smrt stanice i uklanjanje njezinih ostataka (35).

Koža je najveći organ ljudskog tijela i zaštitna barijera organizma od gubitka vode te vanjskih fizikalnih, kemijskih i bioloških oštećenja kao što su ozljede, ultraljubičasto zračenje i mikroorganizmi. Apoptoza je odgovorna za homeostazu unutar kože, kao što je diferencijacija keratinocita i ciklus rasta dlake. Epidermis se neprestano obnavlja mitotskom aktivnošću zametnih stanica bazalnog sloja te nastaju keratinociti koji postupno gube svoje organele, uključujući jezgru i odumiru. Kornifikacija ili orožnjavanje je specijaliziran oblik programirane stanične smrti, a razlikuje se od klasične apoptoze. U koži mrtve stanice zadržavaju specifičnu funkciju, ponašajući se kao zaštitna barijera da bi se u konačnici odljuštile procesom deskvamacije. Neravnoteža proliferacije i diferencijacije keratinocita povezana je s brojnim poremećajima kože. Tako neodgovarajuće odstranjenje oštećenih stanica terminalnom diferencijacijom, može uzrokovati nastanak kanceroznih promjena (101). Proces orožnjavanja razlikuje se od apoptoze u morfološkom i biokemijskom smislu (102-104).

In vivo, terminalna diferencijacija keratinocita traje dva tjedna, dok je apoptoza brzi proces koji se zbiva u pojedinačnim stanicama koje odmah bivaju progutane fagocitnim stanicama kao što su makrofazi (102). Aktivacija proteaza je neophodna u slučaju apoptoze i orožnjavanja (105).

U keratinocitima, β 1-integrini određuju početak terminalne diferencijacije i signal apoptotske kaskadne reakcije, što uzrokuje aktivaciju Bax bjelančevine i oštećenje mitohondrija te konačno i staničnu smrt (106). Aktivacija NF- κ B transkripcijskog čimbenika jedan je od antiapoptotskih mehanizama pokrenutih tijekom terminalne diferencijacije (107).

Članovi TNF-receptor (TNF-R) superobitelji TNF-R1, Fas i TRAIL-R i njihovi pripadajući ligandi TNF, FasL i TRAIL izraženi su na keratinocitima i mogu inducirati njihovu smrt. U fiziološkim stanjima, ligandi su smješteni unutar stanice ili su slabo izraženi, tako da ne dovode do spontane apoptoze, ali patološka stanja ih aktiviraju te pokreću apoptozu (108). Iako se terminalna diferencijacija razlikuje od klasične apoptoze, sve komponente neophodne za taj proces, prisutne su u keratinocitima epidermisa.

Epidermalne stanice, kao što su keratinociti i melanociti, jedine su stanice ljudskog tijela koje su direktno izložene štetnom ultraljubičastom (UVA i UVB) zračenju, potencijalnom čimbeniku koji oštećuje DNK. Kao posljedica izloženosti UV zračenju, pojavljuju se akutna i kronična oštećenja. Mirovanje staničnog ciklusa, popravak DNK i upala, obrambeni su mehanizmi keratinocita na oštećenje UV zrakama. U slučaju znatnijeg oštećenja DNK, stvaraju se apoptotski keratinociti, tzv. *sun-burn cells* kojima je svojstveno oštećenje svjetlošću (fotolezija), piknotička jezgra i eozinofilna citoplazma (109). Transkripcijski čimbenik p-53 ima važnu ulogu u UVB-pokrenutoj apoptozu i smatra se tumorskim supresorom (110). Citoplazmatski p53 može se vezati direktno na više različitih članova superobitelji Bcl-2 bjelančevina, kao što su Bcl-2 i Bcl-XL, neutralizirajući njihovu antiapoptotsku aktivnost i ponašajući se kao proapoptotska bjelančevina (111).

Neravnoteža između apoptoze i preživljenja stanica u epidermisu kože, može uzrokovati nastanak tumora, koji se dijele na melanomske i nemelanomske. Najveći udio nemelanomskih tumora čine bazocelularni karcinomi (80 %) i planocelularni karcinomi koji nastaju iz keratinocita.

Apoptoza je mehanizam obrane kože od tumora, a povećanje osjetljivosti apoptotskog puta i njeno poticanje temelj je antitumorske terapije. Mutacije p-53 gena vjerojatno su rani korak u nastanku bazocelularnog i planocelularnog karcinoma kože (112,113). Pojedini mehanizmi kao što su povećana razina antiapoptotskih bjelančevina štite tumore od apoptoze. U melanomskim tumorima tu ulogu ima FLICE-like protein (FLIP), a u nemelanomskih je to bjelančevina, inhibitor apoptoze (IAP).

Razistencija tumora na citotoksične čimbenike i radioterapiju, povezana je s povećanim izražajem antiapoptotskih bjelančevina Bcl-2 obitelji kao što su BCL-Xl i Bcl-2 (114, 115). Apoptoza ima važnu ulogu u patogenezi različitih poremećaja kože. Tako su u lihenoidnoj reakciji, Civattova ili koloidna tjelešca keratinociti odumrli apoptozom (44). Toksična epidermalna nekroliza (TEN, Lyellova bolest) i sindrom Stevens Johnson (SJS) rijetki su dermatološki poremećaji u kojima nastaje nekroza epidermisa i erozija na sluznicama, gubitak spoja epidermisa i dermisa te masivna apoptoza keratinocita (116, 117).

Pojam ekcematoidnog dermatitisa (*eczema*) obuhvaća skupinu upalnih bolesti kože, kao što je atopijski dermatitis, a svojstveno im je stvaranje eksudativnih vezikula za čije je stvaranje potrebna apoptoza keratinocita (118). Keratinociti u kutanom obliku *graft versus host disease* (GvHD) odumiru apoptozom posredovanom FasL predočenim limfocitima i TNF-om (119). Poremećaj u prijenosu signala među stanicama tijekom apoptoze uzrok je brojnih poremećaja kože. Nemogućnost oštećenih stanica da podlegnu apoptozi, doprinosi razvoju i progresiji tumora. Nasuprot tome, pretjerana apoptoza uzrokuje razvoj nekrolize, GvHD-a i ekcematoidnog dermatitisa.

Posljednja istraživanja ukazuju da u određenim stanjima, signali Fas/FasL mogu usmjeriti apoptozu u smjeru upalnog stanja u keratinocitima, što bi značilo da apoptoza može regulirati nekontroliranu upalu, uzrokujući pri tomu tkivno oštećenje (101).

4.4.3. Kaspaza-3 ovisni put stanične smrti u koži zdravih ispitanika i koži dijaliziranih bolesnika sa svrbežom

Kaspaza-3 dio je velike obitelji cistein-aspartat proteaza koje su uključene u programiranu staničnu smrt, nekrozu i upalu. U ljudskim stanicama je otkriveno najmanje 11 kaspaza koje su podijeljene u dvije skupine: proapoptotske (kaspaza-2, -3, -6, -7, -8, -9, -10) i proupalne (kaspaza-1, -4, -5) (120). Proapoptotske kaspaze uključene su u unutarnji ili vanjski put apoptoze, dok je kaspaza-3 uključena u oba puta (121). Kaspaze slijede kaskadni put aktivacije tako da svaka aktivirana kaspaza cijepa sljedeću prokaspazu u njezin aktivni oblik. Aktivna kaspaza-3 do sada je pronađena u interdigitalnim područjima udova, u timusu, tankom crijevu, bubrezima, neuronima i spinalnim ganglijima (122).

Apoptotske kaspaze kao što su kaspaza-3, -6, -7 i -9 vjerojatno nisu uključene u proces orožnjavanja, što je potvrđeno istraživanjima na pokusnim životinjama (102,123). Uloga kaspaze-3 u održavanju homeostaze embrionalne kože predmet je rasprave (124,125).

Kaspaza-14 je antiapoptotska bjelančevina, neophodna za razvoj kože, a prisutna je u suprabazalnim stanicama epidermisa i aktivna tijekom procesa orožnjavanja (126,127). Embrionalni fibroblasti u miševa inaktivnom kaspazom-3 i -7 otporni su na staničnu smrt uzrokovanu UVB zračenjem (128). Osim aktivacije apoptotskih kaspaza, UV zračenje može aktivirati i upalne kaspaze (129).

Tako je koža miša s nedostatkom kaspaze-14 (prisutna jedino u sisavaca) vrlo osjetljiva na UVB zračenje. Međutim, mehanizmi kojima ova kaspaza štiti kožu od apoptoze pokrenute UVB zračenjem, nisu još razjašnjeni (130,131).

U našem istraživanju, u epidermisu kože bolesnika nakon pet godina dijalize, kaspaza-3 pozitivne apoptotske stanice uočene su u površinskom i intermedijarnom sloju. Kaspazom-3 obojana apoptotska tjelešca umirućih stanica nalaze se u intermedijarnom sloju epidermisa. Dok smo u epidermisu zdrave kože dokazali TUNEL pozitivne apoptotske stanice samo u najvišim slojevima epidermisa, odnosno u jezgrama površinskih orožjenih stanica, u epidermisu kože bolesnika nakon tri godine dijalize, nekoliko TUNEL pozitivnih stanica nađeno je u intermedijarnom sloju oko dubokih dermalnih papila.

U prethodnim istraživanjima primjenjivala se također TUNEL metoda u određivanju apoptotskog indeksa (broj TUNEL pozitivnih stanica x100 podijeljen s ukupnim brojem stanica) u koži dijaliziranih bolesnika, a TUNEL pozitivne stanice pronađene su u samo 2 od 10 uzoraka (126).

4.5. Mogući mehanizmi nastanka svrbeža u dijaliziranih bolesnika

Za razliku od dosadašnjih istraživanja, naše je istraživanje pokazalo da se epidermis stanjuje u dijaliziranih bolesnika u odnosu na epidermis kože zdravih ispitanika. Debljina epidermisa u bolesnika na dijalizi ipak se povećavala s trajanjem dijalize, no debljina epidermisa bolesnika bila je uvijek manja od debljine epidermisa zdrave kože.

Do sada su se promjene u debljini epidermisa u ovakvih bolesnika povezivale s neodgovarajućom prokrvljenošću, odnosno promjenama na kapilarama koje opskrbljuju epidermis (72). Mi smo u našem istraživanju u pojedinim uzorcima kože uočili izrazito visoke dermalne papile koje su prodirale duboko u epidermis (bolesnici na dugotrajnoj dijalizi), što bi se moglo objasniti povećanom potrebom epidermisa za ishranom koja se vrši difuzijom hranjivih tvari iz krvnih žila smještenim u ovim papilama.

Uzrok stanjivanja epidermisa u dijaliziranih bolesnika mogao bi biti posljedica poremećaja u odnosu proapoptotskih i antiapoptotskih bjelančevina, odnosno prevage apoptotskih bjelančevina u dubljim slojevima epidermisa, čija je ravnoteža ključna u održavanju debljine epidermisa.

Dokazali smo i prisutnost apoptotskih stanica, osim u površinskom još i u intermedijarnim slojevima epidermisa u bolesnika na dugotrajnoj dijalizi. Prethodna istraživanja su pokazala kako apoptoza može prouzrokovati poremećaj u broju stanica unutar tkiva te se kratkotrajno moduliranje apoptoze predlaže kao mogući mehanizam za ubrzavanje oporavka tkiva. Stoga bi ovaj mehanizam mogao imati značajnu preventivnu ulogu u oštećenju tkiva (132, 133). U zaključku, naše istraživanje dokazalo je prevagu izražaja proapoptotske Bax bjelančevine nad antiapoptotskom Bcl-2 bjelančevinom, kao i prisutnost apoptotskih stanica u dubokim slojevima epidermisa bolesnika sa KZB-om na dugotrajnoj dijalizi. Stoga bi se stanjenje epidermisa u ovih bolesnika moglo dijelom objasniti upravo pojavom apoptotskih stanica u njegovim dubljim slojevima, s posljedično povećanim uklanjanjem keratinocita koji doprinose debljini epidermisa.

5. ZAKLJUČCI

1. Usporedba **raspodjele antiapoptotske Bcl-2 i apoptotske Bax bjelančevine** u različitim slojevima epidermisa kože zdravih ispitanika i kože dijaliziranih bolesnika sa svrbežom pokazala je:

- Najsnažniji je izražaj **Bcl-2** bjelančevine u bazalnom te u prva dva sloja stanica nazubljenog sloja epidermisa kože zdravih ispitanika kao i u bolesnika nakon dvije godine dijalize, dok je nakon pet godina dijalize Bcl-2 snažnije izražen u površinskom i nazubljenom sloju epidermisa u odnosu na bazalni sloj;

- Izražaj **Bax** bjelančevine bio je slabijeg intenziteta u bazalnom, a pojačanog u površinskom sloju epidermisa i u koži zdravih ispitanika i u koži bolesnika nakon dvije godine dijalize, dok je nakon pet godina dijalize Bax bjelančevina snažno izražena u čitavom epidermisu, uključujući nazubljeni i bazalni sloj;

- U epidermisu kože zdravih ispitanika i bolesnika nakon dvije godine dijalize **odnos izražaja između Bcl-2 / Bax bjelančevine** vrlo je sličan. Nakon pet godina dijalize, odnos izražaja Bcl-2/Bax bjelančevina se značajno mijenja, pri čemu izražaj Bax bjelančevina veći od izražaja Bcl-2 bjelančevine u bazalnom sloju epidermisa.

2. Usporedba **raspodjele apoptotskih kaspaza-3 i TUNEL pozitivnih apoptotskih stanica** u slojevima epidermisa kože zdravih ispitanika i kože dijaliziranih bolesnika sa svrbežom pokazala je:

- U epidermisu zdrave kože TUNEL pozitivne apoptotske stanice prisutne su samo u površinskim slojevima epidermisa (jezgrama orožjenih stanica);

- Nakon tri godine dijalize nađeno je nekoliko TUNEL pozitivnih stanica u nazubljenom sloju, a nakon pet godina dijalize apoptotske kaspaza-3 pozitivne stanice ili apoptotska tjelešca nađena u površinskom i nazubljenom sloju epidermisa kože bolesnika;

- U bolesnika na dugotrajnoj dijalizi povećava se broj apoptotskih stanica kao i njihova raspodjela u dubljim slojevima epidermisa.

3. Usporedbom **raspodjele i broja Ki-67 pozitivnih stanica** u različitim slojevima epidermisa kože zdravih ispitanika i kože dijaliziranih bolesnika sa svrbežom uočena je:

- Intenzivna proliferacijska aktivnost u bazalnom sloju epidermisa zdrave kože;
- Pad stanične proliferacije u bazalnom i suprabazalnim slojevima epidermisa nakon tri godine dijalize u odnosu na epidermis zdrave kože, s tendencijom daljnjeg pada proliferacije nakon pet godina dijalize u odnosu na epidermis kože zdravih ispitanika i kože bolesnika nakon tri godine dijalize.

4. Usporedba **debljine epidermisa** kože zdravih ispitanika i epidermisa kože dijaliziranih bolesnika sa svrbežom pokazala je:

- Epidermis kože dijaliziranih bolesnika tanji je u odnosu na epidermis zdrave kože;
- Porast debljine epidermisa dijaliziranih bolesnika sa svrbežom s godinama trajanja dijalize.

5. Usporedba **izražaja svih antiapoptotskih, proliferacijskih i apoptotskih čimbenika** u epidermisu kože zdravih ispitanika i kože dijaliziranih bolesnika sa svrbežom u odnosu na trajanje dijalize pokazala je:

- Tijekom prve tri godine dijalize, nije uočena značajna razlika u raspodjeli navedenih bjelančevina u odnosu na zdravu kožu;
- Dijaliza koja traje duže od tri godine uzrokuje značajan poremećaj ravnoteže bjelačevina regulatora apoptoze unutar epidermisa što se očituje pojačanim izražajem Bax bjelačevine kao i broja apoptotskih stanica u nazubljenom i površinskom sloju epidermisa;
- Uočava se pad stanične proliferacije u bazalnom i suprabazalnim slojevima epidermisa bolesnika na dijalizi, a koji je proporcionalan trajanju dijalize,
- Kao posljedica navedenih promjena, epidermis bolesnika na dugotrajnoj dijalizi je stanjen, a živčani završetci osjetljiviji u smislu prijenosa osjeta svrbeža prema središnjem živčanom sustavu.

6. SAŽETAK

Svrbež je česta pojava u dijaliziranih bolesnika s kroničnim zatajenjem bubrega. U cilju istraživanja mogućih uzroka svrbeža u tih bolesnika, istraženo je 12 uzoraka kože uzete s bedra dijaliziranih bolesnika sa svrbežom i 5 uzoraka kože zdravih ispitanika. U histološkim rezovima navedenih uzoraka tkiva kože izmjerena je debljina epidermisa, a podaci su statistički obrađeni. Rezovi tkiva imunohistokemijski su obojani biljezima proliferacije Ki-67, antiapoptotskim biljekom Bcl-2, proapoptotskim biljezima Bax i kaspaza-3, a primijenjena je i TUNEL metoda za dokazivanje stanične smrti ili apoptoze. Naše je istraživanje pokazalo u kontrolnoj zdravoj koži proliferacijski indeks od 10.8 %, dok je u koži dijaliziranih bolesnika proliferacijski indeks bio 11.8 % nakon tri godine na dijalizi te 12.5 % nakon 5 godina dijalize. Navedeni rezultati ukazuju na povećani proliferacijski indeks u koži bolesnika na dijalizi te njegovu povezanost s trajanjem dijalize. Statistička analize mjesta stanične proliferacije u bazalnom i suprabazalnim slojevima, ukazala je da je u zdravih ispitanika proliferacija bila smještena ponajprije u bazalnom sloju dok je u dijaliziranih bolesnika uočen pad stanične proliferacije u bazalnom i suprabazalnom sloju nakon tri godine dijalize u odnosu na kožu zdravih ispitanika. Značajan pad proliferacije u suprabazalnim slojevima uočen je nakon pet godina dijalize u odnosu na kožu zdravih ispitanika kao i kožu dijaliziranih bolesnika nakon tri godine. Prosječna debljina epidermisa kože zdravih ispitanika iznosila je 53 μm , a u dijaliziranih bolesnika od 23 do 34 μm tijekom 3-5 godina trajanja dijalize. Ravnoteža između Bcl-2 i Bax bjelančevina nije se značajno promijenila u epidermisu dijaliziranih bolesnika nakon tri godine dijalize, u usporedbi s epidermisom kože zdravih ispitanika. Nakon petogodišnjeg razdoblja dijalize, uočen je pojačani izražaj proapoptotske Bax bjelančevine, a smanjeni izražaj antiapoptotske Bcl-2 bjelančevine u bazalnom i nazubljenom sloju epidermisa, kao i prisutnost apoptotskih stanica (TUNEL i kaspaza-3 pozitivnih) u površinskom i nazubljenom sloju epidermisa bolesnika sa svrbežom.

Naše istraživanje dokazalo je prevladavanje proapoptotske Bax bjelančevine u odnosu na antiapoptotsku Bcl-2 bjelančevinu, kao i prisutnost apoptotskih stanica u dubljim slojevima epidermisa u bolesnika na dugotrajnoj dijalizi. Pretpostavljamo kako bi stanjenje epidermisa u tih bolesnika moglo biti povezano s pojavom apoptotskih stanica u dubljim epidermalnim slojevima, dok bi promjena unutarnje ravnoteže između stanica epidermisa mogla utjecati na živčane završetke smještene u epidermisu, s posljedičnim nastanka svrbeža.

7. ABSTRACT

Chronic renal failure is often associated with skin itching (pruritus) in dialyzed patients. In order to investigate the possible causes of pruritus in those patients, the epidermis of the thigh of 12 dialyzed patients and 5 controls from patients without renal disease were examined. The sections of the epidermis were measured and statistically analyzed, and were immunohistochemically stained using antibodies to proliferation marker Ki-67, anti-apoptotic marker Bcl-2, and pro-apoptotic markers Bax and caspase-3, as well as TUNEL method. Proliferation index of epidermal cells was 10.8 % in normal skin, 11.3 % in the skin of patients after 3 years of dialysis and 12.5 % after 5 years of dialysis. An increased proliferation index characterized the skin of patients on dialysis, and accorded with duration of dialysis. After 3 years period on dialysis, a moderate increase of basal layer cell proliferation was noted in patient's epidermis, while a significant decrease of proliferation in suprabasal layer of epidermis characterized patients after 5 years on dialysis. While the mean thickness of normal epidermis was 53 μm , in dialyzed patients it ranged between 23 and 34 μm during the 3–5 year period on dialysis. Compared to normal skin, the fine balance between the Bcl-2 and Bax proteins did not greatly change in the epidermis of dialyzed patients during the three years of dialysis. Following five-year dialysis, the epidermis displayed increased Bax and decreased Bcl-2 expression in the basal and intermediate epidermal layers, as well as the presence of apoptotic cells (TUNEL and caspase-3 positive) both in the superficial and intermediate epidermal layers. Our study demonstrated the predominant expression of cell death Bax proteins over cell survival Bcl-2 proteins, and apoptotic cells in the deeper layers of the epidermis in patients on long-term dialysis.

We speculate that the thinning of the epidermis might be associated with the appearance of dead cells in the deeper epidermal layers, while the changed internal milieu of epidermal cells could possibly affect the intra-epidermal nerve endings thus leading to the sensation of pruritus.

8. LITERATURA

1. Galešić K, Sabljarić Matovinović M. Kronična insuficijencija bubrega. U: Vrhovac B, Jakšić B, Reiner Ž, Vucelić B, ur. *Interna medicina*. 4. izd. Zagreb: Naklada Ljevak; 2008, str. 1087-90.
2. Kes P, Bašić-Jukić N. Liječenje bolesnika s kroničnim zatajenjem bubrega. U: Vrhovac B, Jakšić B, Reiner Ž, Vucelić B, ur. *Interna medicina*. 4. izd. Zagreb: Naklada Ljevak; 2008, str. 1091-7.
3. Brenner MB, Lazarus JM. Kronično zatajenje bubrega. U: Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL, ur. *Harrisonovi Principi interne medicine*. 15. izd. New York: McGraw-Hill; 2001. str. 1543-67.
4. Udayakumar P, Balasubramanian S, Ramalingam KS, Lakshmi C, Srinivas CR, Mathew AC. Cutaneous manifestations in patients with chronic renal failure on hemodialysis. *IJDVL* 2006;72:119-25.
5. Kuypers RJD. Skin problems in chronic kidney disease. *Nat Clin Pract Nephrol* 2009;5:157-71.
6. Murphy M, Carmichael AJ. Renal itch. *Clin Exp Dermatol* 2000;25:103-6.
7. Gilchrist BA, Rowe JW, Mihm MC. Clinical and histological skin changes in chronic renal failure: evidence for a dialysis-resistant, transplant responsive microangiopathy. *Lancet* 1980;2:1271-5.
8. Kato A, Kamada M, Maruyama T, Maruyama Y, Hishida A. Pruritus and hydration state of stratum corneum in hemodialysis patients. *Am J Nephrol* 2000;20:437-42.
9. Altmeyer P, Kachel HG, Koch KM, Holzmann H. Skin changes in long-term dialysis patients. Clinical study. *Hautartz* 1982;33:303-9.
10. Pico MR, Lugo-Somolinos A, Sanchez JL, Burgos-Calderon R. Cutaneous alterations in patients with chronic renal failure. *Int J Dermatol* 1992;31:860-3.
11. Avermaete A, Altmeyer P, Bacharach-Buhles M. Skin changes in dialysis patients: a review. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:2293-6.
12. Patel TS, Freedman BI, Yosipovitch G. An update on pruritus associated with CKD. *Am J Kidney Dis* 2007;50:11-20.

13. Pisoni RL, Wikstrom B, Elder SJ i sur. Pruritus in haemodialysis patients: international results from the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS). *Nephrol Dial Transplant* 2006;21:3495-505.
14. Dyachenko P, Shustak A, Rozenman D. Hemodialysis-related pruritus and associated cutaneous manifestations. *Int J Dermatol* 2006;45:664-7.
15. Narita I, Alchi B, Omori K i sur. Etiology and prognostic significance of severe uremic pruritus in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int* 2006;69:1626-32.
16. Kimmel M, Alscher DM, Dunst R i sur. The role of micro-inflammation in the pathogenesis of uremic pruritus in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21:749-55.
17. Umeuchi H, Togashi Y, Honda T i sur. Involvement of central μ -opioid system. *Eur J Pharmacol* 2003;477:29-35.
18. Kumagai H, Matsukawa S, Saruta T i sur. Prospects for a novel kappa-opioid receptor agonist, TRK-820, in uremic pruritus. U: Yosipovitch G i sur., ur. *Itch, Basic Mechanisms and Therapy*. New York: NY, Dekker; 2004. str. 279-86.
19. Peer G, Kivity S, Agami O i sur. Randomised cross-over-trial of naltrexone in uraemic pruritus. *Lancet* 1996;348:1552-4.
20. Chou FF, Ho JC, Huang SC, Sheen-Chen SM. A study on pruritus after parathyroidectomy for secondary hyperparathyroidism. *J Am Coll Surg* 2000;190:65-70.
21. Momose A, Kudo S, Sato M. Calcium ions are abnormally distributed in the skin of haemodialysis patients with uraemic pruritus. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19:2061-6.
22. Dugas-Breit S, Scöpf P, Dugas M, Schiffel H, Ruëff H, Przybilla B. Baseline serum levels of mast cell tryptase are raised in hemodialysis patients. *J Dtsch Dermatol Ges* 2005;3:343-7.
23. Ashmore SD, Jones CH, Newstead CG, Daly MJ, Chrystyn H. Ondansetron therapy for uremic pruritus in hemodialysis patients. *Am J Kidney* 2000;35:827-31.
24. Fantini F, Baraldi A, Sevignani C, Spattini A, Pincelli C, Gianetti A. Cutaneous innervation in chronic renal failure patients: an immunohistochemical study. *Acta Derm Venereol* 1992;72:102-5.
25. Wolff HH. *Introduction to the Skin and Dermatology*. U: Burgdorf WHC, Plewig G, Wolff HH, Landthaler M, ur. *Braun-Falco's Dermatology*. 3. izd. Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg; 2009. str. 4-5.

26. King KL, Cidlowski JA. Cell cycle regulation and apoptosis. *Annu Rev Physiol* 1998;60:601-17.
27. Golias CH, Charalabopoulos A, Charalabopoulos K. Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. *Int J Clin Pract* 2004;58:1134-41.
28. Robker RL, Richards JS. Hormonal control of the cell cycle in ovarian cells: proliferation versus differentiation. *Biol Reprod* 1998;59:476-82.
29. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000;182:311-22.
30. Kreitz S, Fackelmayer FO, Gerdes J, Knippers R. The proliferation-specific human Ki-67 protein is a constituent of compact chromatin. *Exp Cell Res* 2000;261:284-92.
31. Schluter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MH, Key G, Flad HD i sur. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol* 1993;123:513-22.
32. Cernea CR, Ferraz AR, de Castro IV i sur. Ki-67 index and skin carcinomas with skull base invasion: a case-control study. *Cancer Therapy* 2005;3:471-6.
33. Ando M, Kawashima T, Kobayashi H, Ohkawara A. Immunohistological detection of proliferating cells in normal and psoriatic epidermis using Ki-67 monoclonal antibody. *J Dermatol Sci* 1990;1:441-6.
34. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-57.
35. Hacker G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res* 2000;301:5-17.
36. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007;35:495-516.
37. Martinvalet D, Zhu P, Lieberman J. Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity* 2005;22:355-70.
38. Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, Kobayashi Y. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J Immunol* 2003;171:4672-9.
39. Korsmeyer SJ. Regulators of cell death. *Trends Genet* 1995;11:101-5.
40. Blaineau SV, Aouacheria A. BCL2DB: moving 'helix-bundled' BCL-2 family members to their database. *Apoptosis* 2009;14:923-5.
41. Sreedhar AS, Csermely P. Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy: a comprehensive review. *Pharmacol Ther* 2004;101:227-57.

42. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998;281:1309-12.
43. Batinac T, Zamolo G, Hadžisejdić I i sur. Expression of Bcl-2 family proteins in Psoriasis. *Croat Med J* 2007;48:319-26.
44. Teraki Y, Shiohara T. Apoptosis and the skin. *Eur J Dermatol* 1999;9:413-26.
45. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW i sur. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996;87:171.
46. Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 1999;6:1028-42.
47. Liang SH, Clarke MF. Regulation of p53 localization. *Eur J Biochem* 2001;268:2779-83.
48. Hockenbery DM, Olitvai ZN, Yin XM i sur. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 1993;75:241-51.
49. McCall C, Cohen JJ. Programmed cell death in terminally differentiating keratinocyte: role of endogenous endonuclease. *J Invest Dermatol* 1991;97:111-4.
50. El-Domyati M, Attia S, Saleh F i sur. Expression of p53 protein in normal sun-exposed and protected skin (type IV-V) in different decades of age. *Acta Derm Venereol* 2003;83:98-104.
51. El-Domyati M, Attia S, Saleh F i sur. Effect of topical tretinoin, chemical peeling and dermoabrasion on p53 expression in facial skin. *Eur J Dermatol* 2003;13:433.
52. Weedon D. Apoptosis. *Adv Dermatol* 1990;5:243-56.
53. Paus R, Rosenbach T, Haas N, Czarnetzki BM. Patterns of cell death: the significance of apoptosis for dermatology. *Exp Dermatol* 1993;2:3-11.
54. Wrone-Smith T, Johnson T, Nelson B i sur. Discordant expression of Bcl-x i Bcl-2 by keratinocytes *in vitro* and psoriatic keratinocytes. *Am J Pathol* 1995;146:1079-88.
55. Van den Oord JJ, Vandeghinste N, De Ley M, De Wolf-Peeters C. Bcl-2 expression in human melanocytes and melanocytic tumors. *Am J Pathol* 1994;145:294-300.
56. Chiodino C, Cesinaro AM, Ottani D i sur. Expression of the novel inhibitor of apoptosis survivin in normal and neoplastic skin. *J Invest Dermatol* 1999;113(3):415-8.
57. Verhaegh ME, Sanders CJ, Arends JW, Neumann HA. Expression of the apoptosis-suppressing protein Bcl-2 in non-melanoma skin cancer. *Br J Dermatol* 1995;5:740-44.
58. Kocak M, Bozdogan O, Erkek E, Atasoy P, Birol A. Examination of Bcl-2, Bcl-x and bax protein expression in psoriasis. *Int J Dermatol* 2003;42:789-93.

59. Zheng Z, Ye R, Yu X, Bergström J, Lindholm B. Peritoneal dialysis solutions disturb the balance of apoptosis and proliferation of peritoneal cells in chronic dialysis model. *Adv Perit Dial* 2001;17:53-7.
60. Raj DS, Boivin MA, Dominic EA i sur. Haemodialysis induces mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Eur J Clin Invest* 2007;37:971-7.
61. Moser B, Roth G, Brunner M i sur . Abberant T cell activation and heightened apoptotic turnover in end-stage renal failure patients: a comparative evaluation between non-dialysis, haemodialysis, and peritoneal dialysis. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;308:581-5.
62. El-Domyati MM, Ahmad HM, Nagy I, Zahran A. Expression of apoptosis regulatory protein p53 and Bcl-2 in skin of patient with chronic renal failure on maintenance haemodialysis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2007;21:795-801.
63. Penninger JM, Kroemer G. Molecular and cellular mechanisms of T lymphocyte apoptosis. *Adv Immunol* 1998;38:334-6.
64. Sadler TW. Kožni sustav. U: Sadler TW, ur. *Langmanova medicinska embriologija*. 7. izd. Zagreb: Školska knjiga; 1996. str. 368-74.
65. Stratigos AJ, Kapranos N, Petrakou E i sur. Immunophenotypic analysis of the p53 gene in non-melanoma skin cancer and correlation with apoptosis and cell proliferation. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2005;19:180-6.
66. Väisänen A, Kuvaja P, Kallioinen M, Turpeenniemi-Hujanen T. A prognostic index in skin melanoma through the combination of matrix metalloproteinase-2, Ki67, and p53. *Hum Pathol* 2011;42:1103-11.
67. Matsuta M, Kimura S, Kosegawa G, Kon S, Matsuta M. Immunohistochemical detection of Ki-67 in epithelial skin tumors in formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections using a new monoclonal antibody (MIB-1). *J Dermatol* 1996;23:147-52.
68. Da Silva TA, Coelho G, Lorenzetti Bocca A, Figueiredo Cavalcante Neto F. Expression of apoptotic, cell proliferation regulatory, and structural proteins in actinic keratosis and their association with dermal elastosis. *J Cutan Pathol* 2007;34:315-23.
69. Batinac T, Zamolo G, Coklo M, Hadzisejdic I, Stemberger C, Zauhar G. Expression of cell cycle and apoptosis regulatory proteins in keratoacanthoma and squamous cell carcinoma. *Pathol Res Pract* 2006;202:599-607.
70. Vidal D, Matías-Guiu X, Alomar A. Efficacy of imiquimod for the expression of Bcl-2, Ki67, p53 and basal cell carcinoma apoptosis. *Br J Dermatol* 2004;151:656-62.

71. Kovačević LM, Puizina-Ivić N, Ljutić D i sur. Differences in epidermal thickness and expression of apoptosis regulatory proteins in the skin of patients with chronic renal failure and pruritus. *Acta Histochem* 2013;115:144-50.
72. Lundin AP, Fani K, Berlyne GM, Friedman EA. Dermal angiopathy in hemodialysis patients: the effect of time. *Kidney Int* 1999;47:1775-80.
73. Altmeyer P, Kachel HG, Runne U. Microangiopathy, connective tissue changes and amyloid deposits in chronic renal failure. *Hautarzt* 1983;34:277-83.
74. Al Habeeb A, Partington S, Rosenthal D, Salama S. Skin thickening in a hemodialysis patient: a case of nephrogenic fibrosing dermatopathy. *J Cutan Med Surg* 2009;13:110-4.
75. Tada J, Torigoe R, Shimoe K, Ohara S, Arata J, Ashizawa K. Calcium deposition in the skin of a hemodialysis patient with widespread skin necrosis. *J Dermatopathol* 1991;13:605-10.
76. Hsieh ST, Lin W-M, Chiang H-Y i sur. Skin innervation and its effects on the epidermis. *J Biomed Sci* 1997;4:264-8.
77. Tominaga M, Takamori K. Recent advances in pathophysiological mechanisms of itch. *Expert Rev Dermatol* 2010;5:197-212.
78. Ikoma A, Steinhoff M, Ständer S, Yosipovitch G, Schmelz M. The neurobiology of itch. *Nat Rev Neurosci* 2006;7:535-47.
79. Tominaga M, Ozawa S, Tengara S, Ogawa H, Takamori K. Intraepidermal nerve fibers increase in dry skin of acetone-treated mice. *J Dermatol Sci* 2007;48:103-11.
80. Witmann M, Werfel T. Interaction of keratinocytes with infiltrating lymphocytes in allergic eczematous skin diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2006;6:329-34.
81. Zucker I, Yosipovitch G, David M i sur.. Prevalence and characterization of uremic pruritus in patients undergoing hemodialysis: uremic pruritus is still a major problem for patients with end-stage renal disease. *J Am Acad Dermatol* 2003;49:842-6.
82. Twycross R, Greaves MW, Handwerker H i sur. Itch: scratching more than surface. *QJ Med* 2003; 96:7-26.
83. Schmelz M. Itch and pain. *Dermatol Ther* 2005;18:304-7.
84. Kidd BL, Urban LA. Mechanism of inflammatory pain. *Br J Anaesth* 2001;87:3-11.
85. Manenti L, Tansinda P, Vaglio Augusto. Uraemic pruritus Clinical Characteristics, Pathophysiology and Treatment. *Drugs* 2009;69:251-63.
86. Patel TS, Freedman BI, Josipovitch G. An update on pruritus associated with CKD. *Am J Kidney Dis* 2007;50:11-20.

87. Wikstrom B, Gellert R, Ladefoged SD, i sur. K-opioid system in uremic pruritus: multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical studies. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:3742-7.
88. Dimkovic N, Djukanovic L, Radmilovic A, Bojic P, Juloski T. Uremic pruritus and skin mast cell. *Nephron* 1992; 61:5-9.
89. Nys K, Agostinis P. Bcl-2 family members: essential players in skin cancers. *Cancer Lett* 2012;320:1-13.
90. Jansson A, Sun XF. Bax expression decreases significantly from primary tumor to metastasis in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2002;20:811-6.
91. Fecker LF, Geilen CC, Tchernev G i sur. Loss of proapoptotic Bcl-2-related multidomain proteins in primary melanomas is associated with poor prognosis. *J Invest Dermatol* 2006;126:1366-71.
92. Hotchkiss RS, Swanson PE, Knudson CM i sur. Overexpression of Bcl-2 in transgenic mice decreases apoptosis and improves survival in sepsis. *J Immunol* 1999;162:4148-56.
93. Jang AS, Choi IS, Lee S, Seo JP, Yang SW, Park CS. Bcl-2 expression in sputum eosinophils in patients with acute asthma. *Thorax* 2000;55:370-4.
94. El-Gamal Y, Heshmat N, Mahran M, El-Gabbas Z. Expression of the apoptosis inhibitor Bcl-2 in sputum eosinophils from children with acute asthma. *Clin Exp Allergy* 2004;34:1701-6.
95. Helga A. Klein-Parker, Larry Warshawski, Victor A. Melanocytes in human skin express bcl-2 protein. *J Cutan Pathol* 1994;21:297-301.
96. Rodriguez-Villanueva J, Colome MI, Brisbay S, McDonnell TJ. The expression and localization of bcl-2 protein in normal skin and in non-melanoma skin cancers. *Pathol Res Pract* 1995;191:391-8.
97. Morales-Ducet CR, van de Rijn M, LeBrun DP, Smoller BR. Bcl-2 expression in primary malignancies of the skin. *Arch Dermatol* 1995;131:909-12.
98. Kastelan M, Prpić-Massari L, Brajac I. Apoptosis in psoriasis. *Acta Dermatovenerol Croat* 2009;17:182-6.
99. Chao DT1, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* 1998;16:395-419.

100. Tomková H, Fujimoto W, Arata J. Expression of the bcl-2 homologue bax in normal human skin, psoriasis vulgaris and non-melanoma skin cancers. *Eur J Dermatol* 1998;8:256-60.
101. Lippens S, Hoste E, Vandenabeele P, Agostinis P, Wim Declercq W. Cell death in the skin. *Apoptosis* 2009;14:549-69.
102. Lippens S, Denecker G, Ovaere P, Vandenabeele P, Declercq W. Death penalty for keratinocytes: apoptosis versus cornification. *Cell Death Differ* 2005;12:1497-508.
103. Raj D, Brash DE, Grossman D. Keratinocyte apoptosis in epidermal development and disease. *J Invest Dermatol* 2006;126:243-57.
104. Candi E, Schmidt R, Melino G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *NatRev Mol Cell Biol* 2005;6:328-40.
105. Zeeuwen PL. Epidermal differentiation: the role of proteases and their inhibitors. *Eur J Cell Biol* 2004;83:761-3.
106. Levy L, Broad S, Diekmann D, Evans RD, Watt FM. Beta1 integrins regulate keratinocyte adhesion and differentiation by distinct mechanisms. *Mol Biol Cell* 200;11:453-66.
107. Krajewski S, Krajewska M, Reed JC .Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of Bak expression, aproapoptotic member of the Bcl-2 protein family. *Cancer Res* 1996;56:2849-55.
108. Viard-Leveugle I, Bullani RR, Meda P i sur. Intracellular localization of keratinocyte Fas ligand explains lack of cytolytic activity under physiological conditions. *J Biol Chem* 2003;278:16183-8.
109. Daniels F Jr, Brophy D, Lobitz WC Jr. Histochemical responses of human skin following ultraviolet irradiation. *J Invest Dermatol* 1961;37:351-7.
110. Efeyan A, Serrano M. p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes. *Cell Cycle* 2007;6:1006-10.
111. Erster S, Moll UM. Stress-induced p53 runs a transcription-independent death program. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;331:843-50.
112. Fesik SW. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nat Rev* 2005;5:876-85.
113. Lacour JP. Carcinogenesis of basal cell carcinomas:genetics and molecular mechanisms. *Br J Dermatol* 2002;146:17-9.

114. Djerbi M, Screpanti V, Catrina AI, Bogen B, Biberfeld P, Grandien A. The inhibitor of death receptor signaling, FLICE-inhibitory protein defines a new class of tumor progression factors. *J Exp Med* 1999;190:1025-32.
115. Bowen AR, Hanks AN, Murphy KJ, Florell SR, Grossman D. Proliferation, apoptosis, and survivin expression in keratinocytic neoplasms and hyperplasias. *Am J Dermatopathol* 2004;26:177-81.
116. Paul C, Wolkenstein P, Adle H i sur. Apoptosis as a mechanism of keratinocyte death in toxic epidermal necrolysis. *Br J Dermatol* 1996;134:710-4.
117. Nassif A, Bensussan A, Boumsell L i sur. Toxic epidermal necrolysis: effector cells are drug-specific cytotoxic T cells. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:1209-15.
118. Trautmann A, Akdis M, Blaser K, Akdis CA. Role of dysregulated apoptosis in atopic dermatitis. *Apoptosis* 2000;5:425-9.
119. Gilliam AC, Whitaker-Menezes D, Korngold R, Murphy GF. Apoptosis is the predominant form of epithelial target cell injury in acute experimental graft-versus-host disease. *J Invest Dermatol* 1996; 107:377-83.
120. Li J, Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene* 2008;27:6194-206.
121. Miura M, Chen XD, Allen MR i sur. A crucial role of caspase-3 in osteogenic differentiation of bone marrow stromal stem cells. *J Clin Invest* 2004;114:1704-13.
122. Vukojevic K, Carev D, Sapunar D, Petrovic D, Saraga-Babic M. Developmental patterns of caspase-3, bax and bcl-2 proteins expression in the human spinal ganglia. *J Mol Histol* 2008;39:339-49.
123. Raymond AA, Mechin MC, Nachat R i sur. Nine procaspases are expressed in normal human epidermis, but only caspase-14 is fully processed. *Br J Dermatol* 2007;156:420-7.
124. Okuyama R, Nguyen BC, Talora C i sur. High commitment of embryonic keratinocytes to terminal differentiation through a Notch1-caspase 3 regulatory mechanism. *Dev Cell* 2004;6:551-62.
125. Fischer H, Rossiter H, Ghannadan M i sur. Caspase-14 but not caspase-3 is processed during the development of fetal mouse epidermis. *Differentiation* 2005;73:406-13.
126. Fischer H, Stichenwirth M, Dockal M i sur. Stratum corneum-derived caspase-14 is catalytically active. *FEBS Lett* 2004;577:446-50.
127. Lippens S, VandenBroecke C, Van Damme E, Tschachler E, Vandenabeele P, Declercq W. Caspase-14 is expressed in the epidermis, the choroid plexus, the retinal pigment epithelium and thymic Hassall's bodies. *Cell Death Differ* 2003;10:257-9.

128. Lakhani SA, Masud A, Kuida K i sur. Caspases 3 and 7:key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science* 2006;311:847-51.
129. Feldmeyer L, Keller M, Niklaus G, Hohl D, Werner S, Beer HD. The inflammasome mediates UVB-induced activation and secretion of interleukin-1beta by keratinocytes. *Curr Biol* 2007;17:1140-5.
130. Denecker G, Ovaere P, Vandenaabeele P, Declercq W. Caspase-14 reveals its secrets. *J Cell Biol* 2008;180:451-8.
131. Eckhart L, Ballaun C, Hermann M i sur. Identification of novel mammalian caspases reveals an important role of gene loss in shaping the human caspase repertoire. *Mol Biol Evo* 2008;25:831-41.
132. Santamaria B, Uceros AC, Benito-Martin A i sur. Taming apoptosis in peritoneal dialysis. *Perit Dial Int* 2009;29:45-8.
133. Puizina-Ivić N, Sapunar D, Marasović D, Mirić L. An overview of Bcl-2 expression in histopathological variants of basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma, actinic keratosis and seborrheic keratosis. *Collegium Antropologicum* 2008;32:61-5.

9. ŽIVOTOPIS

LINA MIRIĆ KOVAČEVIĆ, dr. med.

Datum i mjesto rođenja: 12. veljače 1982. u Splitu

Kućna adresa: Bihakačka 13, Split e-mail: lina.miric@gmail.com

OBRAZOVANJE:

1988. – 2000. Osnovna škola i opća gimnazija Marko Marulić

2000. – 2006. Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

2007. - 2010. Poslijediplomski znanstveni doktorski studij “Klinička medicina utemeljena na dokazima” Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu

AKADEMSKI STUPNJEVI:

2006. Doktorica medicine

STRUČNI I NASTAVNI RAD:

2006. – 2007. Stručni staž u Kliničkom bolničkom centru Split

2007. – 2010. rad pri Katedri za dermatovenerologiju kao znanstvena novakinja na projektu MZOS „Fotodinamska terapija u dermatološkoj onkologiji“ /šifra projekta 141-210056-0481/ pod voditeljstvom prof. dr sc. Neire Puizina-Ivić te sudjelovanje u izvođenju nastave na katedri iz Dermatovenerologije Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu

2011. - specijalizacija iz dermatovenerologije pod mentorstvom prof. drsc. Neire Puizine-Ivić.

POPIS PUBLIKACIJA:

1. Vanjaka-Rogošić Lucija, Puizina-Ivić Neira, Mirić Lina, Rogošić Veljko, Kuzmić-Prusac Ivana, Saraga Babić Mirna, Vuković Dubravka, Mardešić Snježana. Matrix metalloproteinases and E-cadherin immunoreactivity in different basal cell carcinoma histological types. *Acta histochemica* 2014; u tisku.
2. Mirić Kovačević Lina, Puizina-Ivić Neira, Ljutić Dragan, Mardešić Brakus Snježana, Kalibović Govorko Danijela, Jeličić Ivo, Mirić Dino, Rešić Jasminka, Saraga-Babić Mirna. Differences in epidermal thickness and expression of apoptosis regulatory proteins in the skin of patients with chronic renal failure and pruritus. *Acta Histochemica* 2013;115:144-50.
3. Aljinović Jure, Novak Katarina, Mirić Lina, Grandić Leo, Kunac Nenad, Pešutić Pisac Valdi. The epidemiology of non-traumatic prehospital sudden death in Split-Dalmatia Country. *Coll Antropol* 2013;37:1127-31.
4. Kopriva Ivica, Peršin Antun, Puizina-Ivić Neira, Mirić Lina. Robust demarcation of basal cell carcinoma by dependent component analysis-based segmentation of multi-spectral fluorescence images. *J Photochem Photobiol B* 2010;100:10-18.
5. Titlić Marina, Bradić-Hammoud Mirna, Mirić Lina. Amaurosis fugax caused by hereditary thrombophilia due to mutation of gene. *Bratislava medical journal* 2009;4:245-6.
6. Titlić Marina, Bradić-Hammoud Mirna, Mirić Lina, Punda Ante. Clinical manifestations of neurosarcoidosis. *Bratislava medical journal* 2009;9:576-9.
7. Puizina-Ivić Neira, Sapunar Damir, Marasović Dujomir, Mirić Lina. An overview of Bcl-2 expression in histopathological variants of basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma, actinic keratosis and seborrheic keratosis. *Collegium Antropologicum* 2008;32:61-5.
8. Mirić Lina, Mirić Dinko, Duplančić Darko, Kokić Slaven, Ljutić Dragan, Pešutić Pisac Valdi, Čulić Viktor, Fabijanić Damir, Titlić Marina. Specific and gender differences between hospitalized and out of hospital mortality due to myocardial infarction. *Collegium antropologicum* 2008;32:361-7.

9. Puizina-Ivić Neira, Zorc Hrvoje, Vanjaka-Rogošić Lucija, Mirić Lina, Peršin Antun. Fractionated illumination improves the outcome in the treatment of precancerous lesions with photodynamic therapy. *Collegium antropologicum* 2008;32:67-73.

10. Đogas Zoran, Kardum Goran, Mirić Lina, Ševo Vana, Tolić Tihana, Ursić Anita, Vasiljević Petra, Zekić Sandra. Attitudes towards science and alternative medicine of medical, economics and business, and electrical engineering students in Split, Croatia. *Croatian medical journal* 2003;44:75-9.

ZNANSTVENO ISTRAŽIVAČKI PROJEKTI:

Sudjelovanje u projektu Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa

Republike Hrvatske „Fotodinamska terapija u dermatološkoj onkologiji“ /šifra projekta 141-210056-0481/

OSTALE AKTIVNOSTI:

Od 2006. članica Hrvatske liječničke komore

Posjeduje položen ispit engleskog jezika FCE (*First certificate in English*) *University of Cambridge* te se služi talijanskim jezikom.

2001.-2012.- ženske dalmatinske klape: „Špirit“ i „Dalmatinke-Filip Dević“