

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

dr Predrag M. Rodić

UTICAJ KLONALNOSTI B LIMFOCITA I
POLIMORFIZAMA GENA ZA CITOKINE NA
TEŽINU KLINIČKE SLIKE I POJAVU
MONOKLONSKE GAMAPATIJE U
BOLESNIKA SA GOŠEOVOM BOLEŠĆU

doktorska disertacija

Beograd, 2018. godine

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

dr Predrag M. Rodić

INFLUENCE OF CLONAL B CELL
PROLIFERATION AND CYTOKINE GENE
POLYMORPHISMS ON DISEASE
SEVERITY AND OCCURENCE OF
MONOCLONAL GAMMOPATHY IN
PATIENTS WITH GAUCHER DISEASE

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

Mentor: Prof. dr Dragana Janić, pedijatar-hematolog, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

Prof. dr Nada Suvajdžić Vuković, internista-hematolog, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Dušan Popadić, imunolog, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Dr sci. Sonja Pavlović, viši naučni savetnik, Institut za molekularnu genetiku i genetički inženjering, Beograd

ZAHVALJUJEM SE

Mentoru, prof. dr Dragani Janić na ukazanom poverenju i strpljenju, bez čije bi pomoći u najtežim trenucima i idejnog vođstva u radu, svaki profesionalni cilj predstavljao teško osvojivu tvrđavu.

Prof. dr Lidiji Dokmanović, prof. dr Nadi Krstovski i asist. dr Jeleni Lazić na vrednim savetima i prijateljskoj toplini, koji svakodnevni klinički rad ispunjavaju lakoćom i zadovoljstvom.

Prof. dr Nadi Suvajdžić Vuković na izuzetnoj pomoći i podstreku, koji svaki istraživački poduhvat izdižu na još viši nivo kvaliteta.

Dr Sonji Pavlović na prijateljskim savetima, podršci i elokvenciji, kojima mi je lakše otvorila vrata u svet molekularne biologije.

Prof. dr Dušanu Popadiću, čija nezaobilazna pomoć i prijateljska posvećenost čine svaki posao lakšim i zanimljivijim.

Mr Zorici Šumarac na prijateljskoj pomoći u svakodnevnom radi sa obolelima od Gošeove bolesti.

Tatjani Kostić i Teodori Karan Đurašević na trudu i lakšem upoznavanju i savladavanju složenih metoda molekularne genetike.

dr Milanu Lakočeviću koji mi je olakšao borbu u najtežim fazama izrade teze.

dr Srđi Jankoviću i dr Goranu Miloševiću na kolegijanosti i zato što su uvek bili tu, u pravom trenutku.

Kompaniji Genzyme koja je finansijski pomogla izvođenje ovog projekta.

Mami, tati i nani, koji su me naučili da težim intelektualnom i koji su uvek bili tu da mi pruže podršku.

Svome sinu Mihailu, ćerki Leni i supruzi Ani, kojima posvećujem ovaj rad.

UTICAJ KLONALNOSTI B LIMFOCITA I POLIMORFIZAMA GENA ZA CITOKINE NA TEŽINU KLINIČKE SLIKE I POJAVU MONOKLONSKE GAMAPATIJE U BOLESNIKA SA GOŠEOVOM BOLEŠĆU

Rezime

Uvod: Gošeoova bolest je oboljenje lizozoma kod kojeg je korelacija između genotipa i fenotipske ekspresije bolesti slaba te se samim tim ni težina bolesti ne može pouzdano predvideti. Citopatološke promene u ovoj bolesti nisu izazvane samo nakupljanjem nerazgrađenog glikolipida, već i aktivacijom makrofaga, a koncentracije različitih citokina, važnih za proces inflamacije, su povišene u serumu ovih bolesnika. Takođe, nekoliko studija u literaturi navode dokaze o povećanoj incidenciji hematoloških komplikacija u bolesnika sa Gošeoovom bolešću, uključujući monoklonsku i poliklonsku gamapatiju i hematološke malignitete, a posebno multipli mijelom. U kohorti naših bolesnika u Srbiji je ranije već opisana visoka incidencija rearanžmana gena za teški lanac imunoglobulina, što sugeriše da se aktivacija imunskog sistema može javiti relativno rano tokom bolesti.

Predmet rada istraživanja ove studije je bila analiza uticaja klonskog rearanžmana gena za teški lanac imunoglobulina i/ili prisustva pojedinih alela gena koji kodiraju molekule važne u inflamaciji (TNF α , IL-10 i IL-6) na težinu kliničke slike obolelih od Gošeoove bolesti.

Materijal i metod: U ovu kohortnu studiju su bili uključeni pacijenti oboleli od Gošeoove bolesti u Srbiji koji su u periodu od 2008 – 2016. godine lečeni na Klinici za hematologiju i Klinici za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma Kliničkog centra Srbije, u Beogradu, kao i Klinici za hematologiju Kliničkog centra u Nišu. Kriterijumi za isključenje iz studije su bili: odbijanje pacijenta da učestvuje u studiji, smrt pacijenta ili emigracija u druge države. Kontrolna grupa za poređenje učestalosti ispitivanih polimorfnih genotipova za citokinske gene je bila selektovana iz baze DNK uzoraka Laboratorije za imunologiju Instituta za Mikrobiologiju i imunologiju. Svaki od ispitanika je detaljno obavešten o cilju studije i potpisao je dobrovoljan pristanak za učestvovanje u njoj. Iz uzoraka pune venske krvi je vršena izolacija DNK, a detekcija i analiza polimorfizama citokinskih gena *TNF*,

IL10 i *IL6* je vršena metodom Real-time PCR, u Laboratoriji za imunologiju Instituta za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. S druge strane, rearanžmani gena za teški lanac imunoglobulina su analizirani u RNK iz mononuklearnih ćelija periferne krvi. Analiza navedenih rearanžmana je vršena RT-PCR metodom, uz sledstvenu analizu PCR produkata elektroforezom. Detektovani klonalni rearanžmani su bili sekvencirani metodom direktnog sekvenciranja, a dobijene sekvence analizirane softverskim paketom IMGT/V-QUEST radi određivanja mutacionog statusa i produktivnosti rearanžmana. Ostali klinički i laboratorijski podaci o bolesnicima su dobijeni iz istorije bolesti. U analizi rezultata, su korišćeni adekvatni statistički testovi, u skladu sa prirodom varijabli obeležja posmatranja.

Rezultati: Klonalnost B limfocita je otkrivena u značajnom procentu ispitanika (29,6%) tj. u 8/27 bolesnika. U tri od navedenih osam bolesnika, klonalnost je otkrivena samo na nivou IGH rearanžmana tj. bez pratećeg serumskog monoklonskog proteina, a u dva je otkrivena i hipergamaglobulinemija. Među 17/27 (63%) bolesnika, za koje su postojali podaci o praćenju, u 4 bolesnika je rearanžman i dalje bio detektabilan, dok se u jednog bolesnika rearanžman izgubio nakon perioda praćenja. Sekvenciranjem rearanžmana, klonalnost je detektovana kod jednog bolesnika koji je tokom perioda praćenja uvek imao detektabilan biklonalni *IGH* rearanžman. Detektovani rearanžman je dodatno analiziran sekvenciranjem, a interpretacija sekvence je pokazala da se radi o dva različita nemutirana *IGH* rearanžmana. Bolesnici sa prisustvom klonskog rearanžmana *IGH* se nisu značajno razlikovali od bolesnika sa negativnim nalazom u odnosu na kliničko-laboratorijske varijable: uzrast, pol, SSI, dužinu trajanja terapije, prisustvo ili odsustvo slezine, aktivnost hitotriozidaze niti inicijalnu koncentraciju feritina u serumu. Bolesnici sa prisustvom monoklonskog proteina se nisu značajno razlikovali od bolesnika sa negativnim nalazom u odnosu na gore navedene kliničke i laboratorijske varijable. Bolesnici sa hipergamaglobulinemijom su imali značajno kraće trajanje terapije i značajno višu inicijalnu vrednost feritina u odnosu na bolesnike bez hipergamaglobulinemije. Poređenjem učestalosti genotipova i alela polimorfizama pojedinačnih nuklotida za gene *TNF*, *IL6* i *IL110* između bolesnika i zdravih kontrolnih ispitanika izabranih iz populacije u Srbiji, nije uočena značajna razlika ni za jedan od navedenih polimorfizama citokinskih

gena. Poređenjem učestalosti alela za polimorfizam *IL10* rs1800871 sa inicijalnom koncentracijom feritina, nađen je značajno veći stepen hiperferitinemije, kod nosilaca C alela, a posebno u grupi bolesnika koji su nosioci homozigotnog CC genotipa. Učestalosti alela za navedeni polimorfizam se nisu razlikovale u odnosu kliničko-laboratorijske varijable: pol, uzrast, SSI, dužinu trajanja terapije, prisustvo ili odsustvo slezine, aktivnost hitotriozidaze, inicijalnu koncentraciju feritina u serumu, niti u odnosu na prisustvo ili odsustvo monoklonskog proteina, klonskog rearanžmana *IGH* odnosno hipergamaglobulinemije. Poređenjem učestalosti alela za polimorfizam *IL10* rs1800896, *TNF* rs1800629, *TNF* rs361525 i *IL6* rs1800795 u odnosu na gore navedene kliničko-laboratorijske varijable, nije nađena značajna razlika.

Zaključak: iako klonska ekspanzija B limfocita može da nastane relativno rano u toku Gošeeve bolesti, barem sudeći prema rearanžmanu *IGH* gena, detektovani klonovi mogu biti tranzitorni. Pažljivo kliničko praćenje ovih bolesnika je obavezno, uključujući i nadzor nad limfoidnim neoplazmama, posebno multiplim mijelomom. Naša studija predstavlja prvo ispitivanje klonalne proliferacije B limfocita među obolelim od Gošeeve bolesti metodom ispitivanja rearanžmana *IGH* gena. Sa druge strane, postoji mogućnost da polimorfizam *IL10* rs1800871 utiče na težinu bolesti modifikovanjem stepena inflamacije utičući na koncentraciju IL10. Time bi mogao direktno da snižava antiinflamatornu aktivnost ovog citokina ili indirektno, putem uticaja IL10 na druge proinflamatorne citokine. Ovo je prva studija u kojoj određena učestalost alela za navedene polimorfizme citokinskih gena u bolesnika sa Gošeevom bolešću u Srbiji.

Ključne reči: Gošeeva bolest, *IGH* rearanžman, klonalnost B ćelija, gamapatija, hipergamaglobulinemija, multipli mijelom, citokini, polimorfizmi pojedinačnih nukleotida

Naučna oblast: medicina

Uža naučna oblast: hematologija

INFLUENCE OF CLONAL B CELL PROLIFERATION AND CYTOKINE GENE
POLYMORPHISMS ON DISEASE SEVERITY AND OCCURENCE OF
MONOCLONAL GAMMOPATHY IN PATIENTS WITH GAUCHER DISEASE

Summary

Introduction: Gaucher disease is a lysosomal storage disease showing weak genotype-phenotype correlation, with poorly predictable disease severity. Cytopathological alterations are caused not only by the accumulation of the undegraded glycolipid substrate, but also by macrophage activation, displaying serum elevation of various cytokines with important influence to inflammation. Several studies in the literature showed increased incidence of hematological complications in Gaucher patients, including monoclonal and polyclonal gammopathies as well as hematological malignancies, especially multiple myeloma. We had already described a high incidence of immunoglobulin heavy chain gene rearrangements in a cohort of Serbian patients, suggesting that an early occurrence of immune system activation is possible early in the disease course. The object of this study was the analysis of clonal rearrangements of *IGH* genes and frequencies of alleles of cytokine genes important for inflammation (*TNF α* , *IL-10* and *IL-6*) as well as their influence on disease severity in Gaucher patients.

Material and methods: the cohort study included patients with Gaucher disease treated in Serbia since 2008 – 2016, at the Clinic of hematology and Clinic for endocrinology, diabetes and metabolic diseases of Clinical center of Serbia in Belgrade, as well as Clinic of hematology, Clinical Center of Niš. Exclusion criteria were: patient refusal to participate in the study, death of a patient and / or emmigration of a patient. Control group for frequency analysis of polymorphic genotypes of cytokine genes was selected out of the database of DNA samples acquired from Laboratory of immunology, Institute of microbiology and immunology. Every subject was thoroughly informed of the aim of the study and signed the informed consent in order to participate in it voluntarily. Venous blood samples were taken with subsequent DNA isolation permitting detection and analysis of cytokine gene polymorphisms (*TNF*, *IL10* and *IL6*) using the method of Real-time PCR. This was performed in the Laboratory of immunology, Institute of microbiology and immunology,

School of medicine, University of Belgrade. *IGH* gene rearrangements were analyzed in the RNA samples obtained from mononuclear cells of the peripheral blood, using the RT-PCR method with subsequent electrophoresis of PCR products. Detected clonal rearrangements were sequenced by the method of direct sequencing, while the obtained sequences were analyzed using software package IMGT/V-QUEST in order to determine the mutational status as well as productivity of the rearrangement. Other relevant clinical and laboratory data about the patients were acquired from respective patient histories. During the analysis of the results, adequate statistical tests were chosen in accordance with the nature of the variables of the characteristics.

Results: B cell clonality was discovered in 29.6% (8/27) of the patients. In three out of the eight patients, clonality was discoverable by *IGH* rearrangement only i.e. without the subsequent serum monoclonal protein, while two among the eight patients showed hypergammaglobulinemia too. In the 17/27 (63%) of the patients, having follow up data, four of them showed persistence of the rearrangement, while it disappeared in one patient after the follow up. Using the sequence analysis of the rearrangements, clonality was detected in one patient showing a persistent biclonal *IGH* rearrangement during the whole follow up period. The interpretation of the sequence of the rearrangement showed two different unmutated *IGH* rearrangements. The patients with clonal *IGH* rearrangement did not differ significantly when compared to those without it, analyzing different clinical and laboratory characteristics, namely age, sex, SSI, duration of therapy, splenectomy status, initial chitotriosidase activity as well as initial serum ferritin concentration. The patients with monoclonal protein did not differ significantly when compared to those without it, analyzing the aforementioned clinical and laboratory characteristics. The patients with hypergammaglobulinemia had significantly shorter treatment duration as well as significantly higher ferritin levels in comparison to patients without hypergammaglobulinemia.

Comparing the frequencies of the genotypes and alleles of single nucleotide polymorphisms in cytokine genes *TNF*, *IL6* and *IL10* in patients versus healthy controls chosen among Serbian population, no significant difference was detected in any of the examined polymorphisms. After comparing the allele frequencies for *IL10* rs1800871 polymorphism,

a higher degree of initial hyperferritinemia was found in carriers of C allele, especially among CC homozygotes. However, allelic frequencies for this polymorphism did not differ significantly when compared to other clinical and laboratory data, namely: age, sex, SSI, duration of therapy, splenectomy status, initial chitotriosidase activity, initial serum ferritin concentration, serum monoclonal gammopathy, clonal *IGH* rearrangement as well as hypergammaglobulinemia. Comparing the allele frequencies for other polymorphisms (*IL10* rs1800896, *TNF* rs1800629, *TNF* rs361525 and *IL6* rs1800795) with the aforementioned clinical and laboratory variables, no significant difference was noted.

Conclusion: although clonal B cell expansion may arise early in the course of Gaucher disease, at least judging by the clonal *IGH* rearrangement, detected clones may be of transient nature. Careful clinical follow up is therefore mandated, including the surveillance for lymphoid neoplasms, especially multiple myeloma. This is the first study examining clonal B cell proliferation among Gaucher patients using the *IGH* gene rearrangement. On the other hand, the *IL10* rs1800871 single nucleotide polymorphism appears to affect disease severity by possibly modifying the degree of inflammation by affecting the IL10 concentration. It might affect the direct antiinflammatory activity of the cytokine or, indirectly, by IL10 based influences to other proinflammatory cytokines. To the best of our knowledge, this is the first study of cytokine gene single nucleotide polymorphism frequencies in Gaucher patients in Serbia.

Keywords: Gaucher disease, *IGH* rearrangement, B cell clonality, gammopathy, hypergammaglobulinemia, multiple myeloma, cytokines, single nucleotide polymorphism

Scientific area: Medicine

Discipline: Hematology

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. GAUCHER-OVA (GOŠEOVA) BOLEST	1
1.2. EPIDEMIOLOGIJA	1
1.3. ETIOLOGIJA I PATOGENEZA	2
1.4. KLINIČKA SLIKA	3
1.4.1. Gošeo va bolest – tip 1	3
1.4.2. Hematološke manifestacije Gošeo ve bolesti	7
1.4.3. Gošeo va bolest – tip 2 i tip 3	8
1.5. DIJAGNOZA I LABORATORIJSKE OSOBENOSTI GOŠEO VE BOLESTI	9
1.6. TERAPIJA GOŠEO VE BOLESTI	12
1.6.1. Simptomatska terapija	12
1.6.2. Enzim ska sup stituciona terapija (EST)	13
1.6.3. Drugi terapijski modaliteti	14
1.7. CITOPATOLOGIJA GOŠEO VE BOLESTI – ULOGA MAKROFAGA I CITOKINA	15
1.8. MALIGNA OBOLJENJA I GOŠEO VA BOLEST	16
1.8.1. Patogeneza multiplog mijeloma – zna čaj monoklonske gamapatije neodre denog zna čaja	17
1.9. IMUNOGLOBULINSKI GENI	18
1.10. GENSKI POLIMORFIZMI	25
2. CILJEVI RADA	27
3. MATERIJAL I METODI	28
3.1. ISPITANICI	28
3.2. ODREĐIVANJE MUTACIONOG STATUSA I GENSKOG REPERTOARA VARIJABILNOG REGIONA TEŠKIH LANACA IMUNOGLOBULINA	29
3.2.1. Izolacija DNK iz periferne krvi	29
3.2.2. Izolacija mononuklearnih ćelija iz periferne krvi	30
3.2.3. Izolacija RNK iz mononuklearnih ćelija	30
3.2.4. Reverzna transkripcija (RT)	31
3.2.5. PCR amplifikacija IGHV-IGHD-IGHJ rearan žmana	32
3.2.6. Analiza DNK na agaroznom gelu	38
3.2.7. Analiza DNK na poliakrilamidnom gelu	39
3.2.8. Prečiš ćavanje PCR produkata	39
3.2.9. Sekvenciranje IGHV-IGHD-IGHJ rearan žmana	40
3.2.10. Analiza sekvenci IGHV-IGHD-IGHJ rearan žmana	43
3.3. DETEKCIJA I ANALIZA POLIMORFIZAMA CITOKINSKIH GENA REAKCIJOM LANČANOG UMNOŽAVANJA (PCR) U REALNOM VREMENU (REAL-TIME PCR)	43
3.4. ODREĐIVANJE TEŽINE LEZIJA SKELETA NUMERIČKIM SKOROM	44
3.5. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	44
4. REZULTATI	46
4.1. KARAKTERISTIKE BOLESNIKA	46
4.2. ODREĐIVANJE PRISUSTVA KLONALNOG REARAN ŽMANA IGH GENA SA SEKVENCIRANJEM IGH GENA ..	48
4.3. UČESTALOST POLIMORFIZAMA CITOKINSKIH GENA	53
5. DISKUSIJA	59
6. ZAKLJUČCI	79
7. LITERATURA	81

1. UVOD

1.1. Gaucher-ova (Gošeova) bolest

Bolesti akumulacije lipida (lipidne teaurizmoze) su nasledni poremećaji u kojima dolazi do ekscesivnog nakupljanja lipidnih materija u jednom ili više tkiva ili organa. Tip i distribucija lipida pokazuju karakterističnu pravilnost u svakom od poremećaja iz ove grupe oboljenja. Najčešće bolesti ove grupe su Gošeova bolest i Niman-Pikova bolest.

Goševu bolest je prvi put opisao francuski dermatolog Filip Goše, 1882. godine u dvadeset trogodišnje bolesnice sa uvećanom slezinom [1]. Videvši neobične ćelije na patohistološkom preparatu tkiva slezine, Goše je zaključio da se radi o nekoj vrsti neoplazme. Početkom XX veka, istraživači su došli do zaključka da je Gošeova bolest posledica akumulacije lipida, a 1934. godine je otkriveno da je u pitanju glukocerebrozid (glukozilceramid) [2] koji se sintetiše praktično u svakoj ćeliji organizma. Glavni izvor ovog lipidnog metabolita u Gošeovoj bolesti je katabolizam glikosfingolipida u membranama senescentnih eritrocita i leukocita [3].

1.2. Epidemiologija

Gošeova bolest je najčešće prijavljivana i najprevalentnija u grupi bolesti akumulacije lipida. Prevalencija ovog poremećaja je posebno visoka u populaciji Aškenazi Jevreja i iznosi oko 1:855 živorođenih [4]. Podaci za ostale populacije nisu toliko precizni i sveobuhvatni: u portugalskoj studiji incidencija je iznosila oko 1:74000 [5], u australijskoj populaciji 1:57000 [6], u Italiji 1:40000 [7], a u Holandiji 1:86000 [8]. Procenjena incidencija za sve populacije iznosi oko 1:40.000 – 1:60.000 [9, 10]. Gošeova bolest je relativno česta i u jednom populacionom izolatu u oblasti Norboten u severnoj Švedskoj [11].

1.3. Etiologija i patogeneza

Tokom normalnog rasta, razvoja i starenja, ćelije ili delovi ćelija kontinuirano bivaju zamenjene u svim tkivima. Razlaganje složenih ćelijskih sastojaka zahteva sekvencijalnu enzimsku degradaciju različitih biomakromolekula. Proces degradacije uglavnom se odvija u sekundarnim lizozomima, organelama koje nastaju fuzijom primarnog lizozoma sa fagocitnom vakuolom koja sadrži ingestirani materijal.

Gošeova bolest je rezultat naslednog deficita aktivnosti lizozomalnog enzima kisele β -glukocerebrozidaze, neophodne za degradaciju glikolipida [12]. Prilikom razgradnje kompleksnih glikolipida neophodno je prethodno uklanjanje ugljeno-hidratnog dela, pre nego što može da započne hidroliza tzv. ceramidnog dela molekula (kompleks sfingozin – masna kiselina). Hereditarni nedostatak lizozomalnog enzima neophodnog za hidrolizu glikozidne veze dovodi do nagomilavanja glikolipida koji služi kao supstrat nedostajućem enzimu. U slučaju Gošeove bolesti, odsustvo β -glukocerebrozidaze dovodi do akumulacije glukocerebrozida čijim nagomilavanjem nastaje karakteristični fenotip ovog oboljenja. U veoma malom broju slučajeva, teška neuronopatska forma bolesti nastaje kao posledica nedostatka sapozina, termostabilnog kofaktora za glukocerebrozidazu, a ne samog enzimskog deficita [13].

Bolest se nasleđuje autozomno recesivnim mehanizmom mendelovskog nasleđivanja. Prošlo je više od dve decenije od otkrića gena za glukocerebrozidazu na hromozomu jedan (lokus 1q21) [14], a ubrzo potom je gen kloniran i sekvenciran [15]. Opisano je skoro 300 mutacija ovog gena [16]. Većinom se radi o tačkastim mutacijama, ali su moguće i insercije nukleotida, delecije i genske fuzije. Mutacije koje su prvo opisane, L444P [17] i N370S [18] i dalje su najprevalentnije u većini svetskih populacija. Pet najčešćih mutacija opisanih kod Gaucherove bolesti čine oko 97% alela kod Jevreja i oko 75% alela u drugim populacijama [19].

1.4. Klinička slika

Klinički se razlikuju tri glavna tipa Gošeove bolesti: tip 1, tip 2 i tip 3 [20]. Sva tri tipa su posledica deficita glukocerebrozidaze i nagomilavanja lipidnog supstrata, ali se ipak klinički značajno razlikuju. Bolesnici sa barem jednom „blagom” mutacijom oboljevaju od tipa 1, dok bolesnici sa „teškim” i „nultim” mutacijama uglavnom razvijaju tip 2 ili tip 3 bolesti [21]. Gošeova bolest pokazuje izuzetnu fenotipsku varijabilnost, a navedena tri tipa bolesti se razlikuju na osnovu odsustva (tip 1) ili prisustva i težine lezija centralnog nervnog sistema (CNS) (tipovi 2 i 3). Međutim, ove kliničke razlike nisu apsolutne, a eksperti sve više prepoznaju da se Gošeova bolest manifestuje kao fenotipski kontinuum, a ne kao strogo definisani i odeljeni klinički entiteti, pogotovu forme bolesti koje dovode do lezija CNS-a [22].

1.4.1. Gošeova bolest – tip 1

Tip 1 je ubedljivo najčešća forma bolesti [23]. Prema definiciji, u ovom tipu ne postoji oštećenje centralnog nervnog sistema prouzrokovano nakupljanjem lipidnog supstrata, dok su eventualni neurološki simptomi posledica sistemskih komplikacija bolesti. Ova hronična, neneuropatska forma bolesti je ranije nazivana adultnim tipom. Međutim, ovaj termin ne bi trebalo više upotrebljavati jer se razne kliničke manifestacije mogu pojaviti i u dečjem uzrastu. Tip 1 je multisistemska bolest koja se odlikuje velikom varijabilnošću u smislu uzrasta u kojem se bolest inicijalno prezentuje, vrste kliničkih znakova i simptoma, kao i toka bolesti [24]. I ovde pre možemo govoriti o fenotipskom kontinuumu, nego li o strogo definisanoj varijanti bolesti [25].

Bolest često počinje bezbolnom splenomegalijom, anemijom ili trombocitopenijom. Ovi bolesnici često pate od hroničnog zamora, imaju hepatomegaliju, bolove u kostima ili patološke frakture kosti kao i pojačanu sklonost krvarenju zbog trombocitopenije. Krvarenje se može manifestovati epistaksom, modricama ili i jednim i drugim.

Kod simptomatskih bolesnika, splenomegalija je progresivna i može dovesti do masivnog uvećanja slezine. Masivna splenomegalija se često viđa kod dece i može biti udružena sa kaheksijom, zaostajanjem u rastu i hipermetabolizmom [26]. Normalna masa slezine čini oko 0,2% ukupne telesne mase, a u Gošeovoj bolesti ovaj organ može biti uvećan od 5 do 80 puta, tj. od 300 g pa sve do 10 kg, što čini i do 25% telesne težine bolesnika. Napredovanjem splenomegalije dolazi i do pojave rekurentnih infarkta i fibroze slezine. Što je slezina veća, veća je i verovatnoća radiološkog nalaza fokalnih defekata koji odgovaraju infarktima, fibrozi, vaskularnim malformacijama, fokalnim nakupinama makrofaga prepunjenih glukocerebrozidom (tzv. Goševih ćelija) ili ekstramedularnoj hematopoezi [27]. Većinom, infarkti slezine ne dovode do simptoma, ali subkapsularni infarkti mogu dovesti do lokalizovanog bola u truhu.

Oko 50% bolesnika sa Goševom bolešću ima hepatomegaliju [28]. Kod masivnog uvećanja, jetra je prilikom palpacije obično čvrsta i hrapave, nepravilne površine. Kod malobrojnih bolesnika može doći do razvoja fibroze i ciroze jetre, portne hipertenzije i hepatičke insuficijencije [29]. Blago do umereno povišenje enzima jetre je uobičajeno čak i kod bolesnika sa lakšom formom bolesti, dok su prisustvo žutice i poremećaj sintetske funkcije jetre retki i predstavljaju indikator loše prognoze. Žutica je obično znak infekcije, razvoja hroničnog hepatitisa i retko, dekompenzacije jetre, a nekonjugovana hiperbilirubinemija je najčešće odraz hemolize [10].

Većina bolesnika sa tipom 1 bolesti ima radiološke promene na skeletnom sistemu. Klinički vidljive koštane promene se manifestuju u preko 20% bolesnika, bolom u kostima ili patološkim frakturama. Prema podacima iz Međunarodnog registra za Goševu bolest, lezije skeleta su, prema učestalosti, bile sledeće: deformiteti femura u obliku Erlenmajerove boce, infiltracija koštane srži, osteopenija, avaskularna nekroza, infarkti, patološke frakture i litičke lezije [30]. U navedenoj studiji je oko 30% bolesnika imalo bolne koštane krize, a čak oko 66% bolesnika je prijavilo smanjen kvalitet života zbog bolova u kostima. Koštane krize predstavljaju jednu od najdramatičnijih manifestacija bolesti i često zahtevaju upotrebu opioidnih analgetika. Diferencijalna dijagnoza u odnosu na osteomijelitis može ponekad biti veoma teška, dok se u dece ovaj poremećaj često pogrešno dijagnostikuje kao Pertesova bolest. Pored vazo-okluzivnih fenomena koji objašnjavaju ishemijske promene

(koštani infarkti i avaskularna nekroza), predložena je i mehanička teorija prema kojoj dolazi do pojave trabekularnih mikrofraktura. Od ostalih patofizioloških mehanizama, dolaze u obzir i promene u ćelijama koštane srži i ćelijama imunskog sistema, kao i učešće inflamacije, makrofaga, citokina i hormonskih činilaca [31, 32].

Zahvatanje ostalih organa i organskih sistema je retka. U jednoj velikoj studiji iz Izraela, bolesnici sa tipom 1 bolesti su imali visoku prevalenciju asimptomatskih plućnih abnormalnosti, pre svega smanjenje difuzionog kapaciteta i opstrukciju malih disajnih puteva [33]. Teška pulmonalna oštećenja su izuzetno retka i posledica su infiltracije alveola, intersticijuma i plućnih kapilara Goševim ćelijama kao i plućne fibroze, što dovodi do dispneje i hipoksemije. Ovakva oštećenja se javljaju u <1% bolesnika u velikim centrima za lečenje Goševе bolesti [34]. Postoji samo nekoliko izveštaja o bubrežnoj disfunkciji kod obolelih od ove bolesti. Studija sa 161 bolesnikom je zaključila da je brzina glomerulske filtracije značajno veća u bolesnika, nego u kontrolnih ispitanika. Izgleda da su suptilni renalni poremećaji u obliku hiperfiltracije češći nego što je to očekivano u bolesnika sa Goševom bolešću [35]. Poremećaji drugih organskih sistema su vrlo retki, uključujući očne manifestacije [36], zahvaćenost miokarda i srčanih zalistaka [37], insulinsku rezistenciju [38] i amiloidozu [39]. Uprkos konvencionalnoj definiciji tipa 1, određene neurološke manifestacije su ipak opisane, a pre svega povećan rizik od razvoja Parkinsonove bolesti [40] i pojava oligosimptomatske periferne neuropatije [41].

Skor težine bolesti (*Severity Score Index*, SSI) je razvijen od strane Zimrana i sar. [42] i služi kao semikvantitativni indeks težine bolesti, obuhvatajući celokupan fenotip bolesnika sa oboljenjem tipa 1. SSI obuhvata uzrast pojave bolesti, stepen zahvaćenosti različitih organskih sistema, stanje slezine i subjektivne kriterijume za procenu bola [43]. SSI je efikasno korišćen u studijama korelacije genotipa i fenotipa [42], u evaluaciji prirodnog toka bolesti [44], kao i za procenu efikasnosti biomarkera u praćenju aktivnosti oboljenja [45].

SSI se izračunava prema sledećoj shemi:

Shema 1: Izračunavanje indeksa težine bolesti (SSI)

Odlika	Skor	Odlika	Skor
Uzrast u vreme dijagnoze (godine)		Probe jetre	
<50	0	Normalne	0
26 – 50	1	Blagi poremećaji	1
11 – 25	2	Teški poremećaji	2
6 – 10	3	Klinički znaci bolesti jetre	4
1 – 5	4	Citopenija	
<1	6	Bez splenektomije	1
Splenektomija	3	Nakon splenektomije	3
Splenomegalija*		Zahvaćenost drugih organa	4
Odsutna	0	Kosti	
Blaga	1	Bez znakova / simptoma	0
Umerena	2	Radiografski znaci	1
Masivna	3	Blag bol	2
Hepatomegalija*		Hronični bol / potreba za analgeticima	3
Odsutna	0	Frakture	
Blaga	1	Patološke	4
Umerena	2	Posttraumatske	1
Masivna	3	Potreba za protezom zgloba	5
		Težak invaliditet	2

* Blaga = donja ivica jetre / slezine se ne prostire ispod umbilikusa; umerena = donja ivica palpabilna između umbilikusa i oboda male karlice; masivna = organ se prostire ispod oboda karlice, praktično ispunjavajući ceo abdomen.

1.4.2. Hematološke manifestacije Gošeoze

Anemija i/ili trombocitopenija su skoro univerzalni nalazi među simptomatskim bolesnicima [46] i koriste se za praćenje prirodnog toka bolesti i odgovora na terapiju [47]. Klinički značajna trombocitopenija može da se javi uprkos normalnim vrednostima hemoglobina, a ako se oboleli od Gošeoze prezentuje anemijom i normalnim trombocitima, veoma je verovatno da je anemija druge etiologije. Važno je naglasiti da je uzrok anemije i trombocitopenije u većine bolesnika povećana destrukcija ćelija u slezini. Međutim, pošto značajan broj bolesnika i dalje pati od anemije i trombocitopenije čak i posle splenektomije, verovatno je i infiltracija koštane srži Goševim ćelijama uzrok citopenije.

Među ostalim uzrocima anemije u Goševoj bolesti, kliničar treba da pomisli i na nedostatak gvožđa i deficit vitamina B12. Sideropenija i nizak kapacitet vezivanja gvožđa su često prisutni među decom i odraslima obolelim od Gošeoze, a kliničke manifestacije se obično javljaju kod žena, posebno tokom menstrualnog krvarenja i u peripartalnom periodu. Značaj deficita vitamina B12 je takođe opisan u studiji sa 148 bolesnika obolelih od Gošeoze, gde je čak 40% bolesnika imalo vrednosti vitamina B12 < 200 pg/ml [48]. Autoimunska hemolizna anemija je retka u ovih bolesnika, ali se sreće češće nego u opštoj populaciji [49].

Iako i leukopenija može biti posledica hipersplenizma kod Gošeoze, retko kada je klinički značajna. Sklonost pojedinih bolesnika infekcijama je pre svega rezultat defektne neutrofilne funkcije, a ne smanjenja apsolutnog broja neutrofila [50]. Istraživači su opisali i defektnu funkciju monocita periferne krvi što bi takođe moglo objasniti pojavu češćih infekcija [51, 52]. Iako sklonost infekcijama nije univerzalni fenomen među bolesnicima obolelim od Gošeoze, brojni izveštaji u literaturi govore u prilog činjenice da se infekcije neuobičajene težine i lokalizacije javljaju kod ovih bolesnika [53, 54]. U našoj prethodnoj studiji koja je urađena na 11 bolesnika i 11 zdravih kontrolnih ispitanika, određivana je sposobnost respiratornog praska u monocitima periferne krvi merenjem fluorescencije dihidrorodamina-123, metodom protočne citometrije. Nije nađena

značajna razlika u sposobnosti respiratornog praska između ispitanika i kontrolnih subjekata te smo u navedenom ispitivanju zaključili da poremećaj respiratornog praska u monocitima ne doprinosi povećanoj sklonosti infekcijama među bolesnicima [55].

Hemoragijska dijateza u Gošeovoj bolesti se ne može uvek objasniti samo trombocitopenijom. U jednoj studiji od 30 bolesnika, produženje protrombinskog vremena i parcijalnog tromboplastinskog vremena je uočeno kod 42% odnosno 38% ispitanika, dok je 30-60% bolesnika imalo ozbiljan deficit (<50%) XI, XII, VII, X, V i II faktora koagulacije [56]. Krvarenje kod bolesnika se uglavnom manifestuje mukokutanim hemoragijama, ali su opisana i hirurška krvarenja [57], kao i krvarenje tokom porođaja i postpartalno [58]. Defekti adhezije trombocita su opisani u dve trećine od 48 bolesnika, uz pozitivnu ličnu anamnezu mukokutanih krvarenja [59]. Takođe, u studiji Gillis-a i sar. sedam od 32 bolesnika je imalo poremećaj agregacije trombocita [60].

1.4.3. Gošeova bolest – tip 2 i tip 3

Smatra se da oko 6% bolesnika ima neuronopatsku Gošeovu bolest (NGB), iako nedostaju sistematske studije. Od toga, 5% ima hroničnu formu (tip 3), a 1% akutnu formu bolesti (tip 2) [28]. Tačna prevalencija NGB nije poznata.

Tip 2 NGB obično obuhvata decu kod kojih se neurološki poremećaji javljaju pre šestog meseca i koja umiru pre druge ili četvrte godine života, prosečno u uzrastu od 9 meseci [61]. Ovi bolesnici oboljevaju u ranom odojačkom periodu, pojavom disfunkcije moždanog stabla koja se manifestuje supranuklearnom paralizom pogleda uz pojavu hepatosplenomegalije sa sledstvenim progresivnim pogoršanjem. Pogoršanje se manifestuje razvojem konvergentnog strabizma, disfagije, stridora sa apnejom, piramidalnih ispada, nenapredovanja i kaheksije [62]. Klinički tok je izuzetno brz, a odojčad obično umire od stridora koji dovodi do laringealne opstrukcije i apneje ili od disfagije koja dovodi do aspiracije.

Opisana je i letalna neonatalna varijanta tj. kongenitalna forma Gošeove bolesti sa praktično odsutnom aktivnošću glukocerebrozidaze [63]. Ova novorođenčad se prezentuju

fetalnim hidropsom (“kolodion bebe”), mrtvorodenošću ili umiru nekoliko dana po porođaju usled preteranog gubitka vode isparavanjem sa kože, usled poremećenog lipidnog sastava epiderma [64].

Minimalni kriterijum za definisanje tipa 3 NGB je supranuklearna paraliza pogleda [65]. Ovaj neurološki poremećaj se sastoji od usporenja sakadičnih očnih pokreta, pre svega u horizontalnom pravcu. Nalaz može biti izolovan ili u kombinaciji sa kašnjenjem u razvoju, auditornom disfunkcijom, konvulzijama, mioklonusom i drugim znacima oštećenja moždanog stabla [66]. Bolesnici se, međutim, često prezentuju hepatosplenomegalijom, anemijom ili nenapredovanjem. Većina bolesnika se prezentuje u prvih 5 godina života [67]. Tip 3 NGB neki autori dalje dele u tri podtipa: tip 3A (blaga sistemska bolest sa progresivnom miokloničkom encefalopatijom), tip 3B (supranuklearna paraliza pogleda i teška sistemska bolest) i tip 3C (blaga neurološka bolest udružana sa kalcifikacijama aortne valvule) [66]. Opisan je i genetski izolat tipa 3 u oblasti Norboten u severnoj Švedskoj [68]. Sve ove podele su donekle veštačke i bilo koja kombinacija gore navedenih abnormalnosti se može pojaviti u datog bolesnika. Stoga se NGB najbolje može opisati kao kontinuum karakterističnih neuroloških abnormalnosti [22].

1.5. Dijagnoza i laboratorijske osobenosti Gošeove bolesti

Klinički pregled, radiološke metode i parametri krvne slike omogućavaju kliničaru da posumnja na Goševu bolest, dok je za postavljanje definitivne dijagnoze zlatni standard određivanje aktivnosti glukocerebrozidaze u leukocitima ili fibroblastima, primenom metode fluorogenog supstrata [69]. Sa druge strane, nalaz Goševih ćelija u bioptatu tkiva npr. koštane srži nije patognomoničan za Goševu bolest. Takozvane, pseudo-Goše ćelije se mogu naći u oboljenjima kao što su hronična mijeloidna leukemija, sindrom histiocita marinsko plave boje i Niman-Pikova bolest [70]. Analiza mutacija gena za glukocerebrozidazu reakcijom lančane polimerizacije se može upotrebiti kao potvrda dijagnoze, ali je uglavnom rezervisana za otkrivanje nosilaca mutiranog gena koji nisu

oboleli [71]. Određivanje aktivnosti glukocerebrozidaze u kulturi amniocita ili tkivu horionskih resica se koristi za prenatalnu dijagnozu Gošeove bolesti [72].

Ključna ćelija u Gošeovoj bolesti je citopatološki izmenjeni makrofag prepunjen nerazgrađenim lipidnim supstratom tj. Gošeova ćelija. Već je dugo poznato da patološki mehanizmi bolesti nisu prost efekat mase nakupljenih ćelija, već su i rezultat sekrecije raznih proteina kao što su hidrolaze i citokini koji su porekla kako samih Goševih ćelija tako i okolnih, aktiviranih makrofaga [73]. Neki od ovih proteina imaju biološku aktivnost i utiču na fenotipsku ekspresiju bolesti, dok se drugi mogu detektovati u plazmi i služiti kao korisni markeri težine oboljenja. Praćenje ovih markerskih proteina je veoma korisno i za monitoring terapijske intervencije.

Aktivnost nekolicine lizozomalnih hidrolaza je povišena u plazmi bolesnika obolelih od Gošeove bolesti. Još 1956. godine, otkrivena je povišena aktivnost tartarat rezistentne kisele fosfataze (TRAP) [74], a zatim su usledili izveštaji i o drugim hidrolazama: β -galaktozidaza, heksozaminidaza, β -glukuronidaza i α -fukozidaza [75]. Još dve hidrolaze su često povišene kod bolesnika, naime angiotenzin konvertujući enzim (ACE) [76] i lizozim [77]. Iako su učinjeni mnogi pokušaji uspostavljanja korelacije između određenih hidrolaza i konkretnih patoloških manifestacija ili težine Gošeove bolesti, direktna povezanost nije ustanovljena. Nijedan od navedenih enzima se ne može staviti u korelaciju sa težinom oštećenja skeleta niti je ijedan dovoljno senzitivna da predstavlja plazmatski biomarker prisustva i broja Goševih ćelija [78].

Potruga za senzitivnim i specifičnim biomarkerom Gošeove bolesti je dovela do otkrića enzima koji degradira fluorogeni supstrat sa hitotriozidom i koji je nazvan hitotriozidaza [79]. Ovaj enzim je humani analog različitih hitinaza prisutnih kod evolutivno nižih organizama i analogno njihovoj funkciji, hitotriozidaza verovatno učestvuje u urođenom imunitetu protiv patogena koji sadrže hitin, kao što su gljive poput *Candida albicans* [80]. Hitotriozidazu veoma specifično proizvode Gošeove ćelije i postoji linearna korelacija između aktivnosti hitotriozidaze u serumu i koncentracije glukocerebrozida u tkivu slezine bolesnika. Pošto je glukocerebrozid najbolja kvantitativna mera Goševih ćelija, produkcija hitotriozidaze je direktno proporcionalna broju ovih ćelija tj. ukupnom opterećenju organizma patološki izmenjenim makrofagima sa akumuliranim

supstratom. Ovaj enzim može da se koristi za praćenje efikasnosti terapije i smatra se da ima izvesnu prognostičku vrednost [81]. Međutim, oko 6% ukupne populacije su homozigoti koji nose mutantni alel za ovaj enzim i koji nemaju mogućnost produkcije ovog enzima [82]. Kod ovih pojedinaca, enzim se ne može koristiti za praćenje aktivnosti bolesti niti efekata terapije [83]. Takođe, aktivnost hitotriozidaze može biti povišena i kod drugih oboljenja kao što su: Niman-Pikova bolest, sarkoidoza, beta-talasemija, multipla skleroza, Alchajmerova bolest i visceralna lajšmanijaza [84, 85].

Zbog mogućnosti postojanja genski uslovljenog deficita hitotriozidaze, dalja potraga za korisnim biomarkerom je dovela do otkrića hemokina koji je nazvan pulmonalni, aktivacijom regulisani hemokin (PARC) [86] koji predstavlja dobru i pouzdanu alternativu hitotriozidazi. PARC ili CCL18 je hemokin koji proizvode razni tipovi ćelija, posebno makrofagi i dendritične ćelije [87]. CCL 18 promoviše regrutovanje T limfocita posredstvom molekula CCR8 [88]. Kod bolesnika sa Gošeovom bolešću, nivoi CCL18 u plazmi su povišeni 10-50 puta u odnosu na kontrolne ispitanike. Nivoi ovog biomarkera variraju manje nego hitotriozidaza jer ne postoji genetski polimorfizam. Kinetika oba biomarkera se slično ponaša tokom uvođenja terapije GB. Visoke koncentracije CCL18 u serumu su takođe povezane sa lošijom prognozom bolesti [86].

Glukozilsfingozin je novootkriveni biomarker čija je senzitivnost i specifičnost superiornija u odnosu na hitotriozidazu i CCL18 [89]. Dokazana je velika vrednost ovog proteina u praćenju bolesnika obolelih od GB, ali su za definitivnu potvrdu efikasnosti još uvek potrebne veće studije [90].

Pored navedenih proteina, većina bolesnika ima i povišenu koncentraciju feritina u plazmi [91]. Kod drugih poremećaja makrofaga, povišen nivo feritina se javlja tokom akutne faze i veruje se da predstavlja efekat aktivacije makrofaga [92]. U prilog ove činjenice bi moglo da govori i smanjivanje nivoa feritina u Gošeovoj bolesti, tokom enzimske terapije [93]. Uprkos hiperferitinemiji koja se javlja u >85% bolesnika sa GB, serumsko gvožđe, saturacija transferina i koncentracija solubilnog transferinskog receptora ostaju normalni [94]. Visoka feritinemija može da predvidi pojavu skeletnih komplikacija, kao i češću potrebu za splenektomijom [95]. Stoga se preporučuje praćenje feritina u GB,

iako je nespecifičan marker, kao i praćenje drugih markera inflamacije kao što je npr. C-reaktivni protein..

Poremećaji imunoglobulina su takođe česti u Gošeovoj bolesti. Povećanje gamaglobulinske frakcije na elektroforezi je primećeno još 1950. godine [96], a nekoliko autora je opisalo visoku prevalenciju poliklonskih i monoklonskih gamapatija. Pratt i sar. su opisali hipergamaglobulinemiju i monoklonsku gamapatiju u 10 od 16 bolesnika sa tipom 1 Gošeove bolesti [97], a u drugoj studiji prevalencija poliklonalne gamapatije je iznosila 44%, a monoklonalne 5%, uz predominaciju IgG kapa lanca [98]. U jednoj studiji je uočeno da poliklonska gamapatija može da se smanji po davanju enzimske terapije, dok monoklonska gamapatija ostaje nepromenjena [99].

1.6. Terapija Gošeove bolesti

1.6.1. Simptomatska terapija

Citopenije u Gošeovoj bolesti su češće posledica hipersplenizma, nego infiltracije koštane srži Goševim ćelijama. Većina citopenija pokazuje zadovoljavajući odgovor na splenektomiju, ali se ta terapijska metoda sve manje uzima u obzir otkako je uvedena enzimaska supstituciona terapija (EST) [100]. Štaviše, u eri EST postoji preporuka da splenektomiju treba izbegavati jer se povećava rizik od infekcije, tromboze ili neoplazije [101], a dolazi do pogoršanja i same GB, u smislu pogoršanja lezija skeleta, češće pojave fibroze i ciroze jetre, hepatocelularnog karcinoma i plućne hipertenzije [102].

Kod lezija skeleta koje dovode do fraktura, često su neophodni ortopedski zahvati. Protetska hirurgija kuka često dovodi do uspešnog izlečenja bolesnika, sa uspostavljanjem normalnih svakodnevnih aktivnosti [103]. Radioterapija se pominje kao terapijska opcija kod bolnih lezija skeleta, ali često ne daje zadovoljavajuće rezultate, te se više ne preporučuje [104].

Kod retkih bolesnika sa teškom insuficijencijom jetre, preporučuje se transplantacija jetre što je i opisano u literaturi [105].

1.6.2. Enzimaska supstituciona terapija (EST)

Enzimaska supstituciona terapija je postala uspešna tek nakon započinjanja komercijalne proizvodnje enzima ekstrahovanog iz placentе [106]. Tri godine kasnije, američka Agencija za hranu i lekove je registrovala upotrebu humane rekombinantne glukocerebrozidaze - imigluceraze (*Cerezyme*®, *Genzyme*), nakon kliničke studije u dva velika centra [107]. Od tada je rekombinantni enzim postao zlatni standard u terapiji Gošeeve bolesti, sa izuzetnom dobrim profilom bezbednosti i podnošljivosti [108]. Smanjenje jetre i slezine, kao i porast koncentracije hemoglobina i broja trombocita nastupa prosečno posle šest meseci terapije. Terapijski odgovor je znatno sporiji kada su u pitanju lezije skeleta, ali nastupa prosečno nakon dve godine terapije, bez obzira na korišćenu dozu leka [109]. Prema mišljenju proizvođača leka i nekih istraživača, preporučena doza je 60 U/kg svakih dve nedelje [106]. Lek se daje intravenskim putem. Troškovi lečenja za prosečnu odraslu osobu muškog pola, poštujući navedeni dozni režim iznose oko 500,000 američkih dolara godišnje, tako da se terapija preporučuje samo za bolesnike sa umereno teškom ili teškom bolešću [106]. To su uglavnom bolesnici sa značajnom organomegalijom, teškim ili umereno teškim citopenijama ili ekstenzivnim lezijama skeleta. Ovi kriterijumi obuhvataju i decu mlađu od 15 godina, obzirom da deca češće imaju bolest progresivnog toka [110]. Razvijeni su i drugi rekombinantni enzimi: velagluceraza (*Vpriv*®, *Shire*) koja se proizvodi na humanim fibroblastima i taligluceraza (*Elelyso*®, *Pfizer*) koja se proizvodi na ćelijama šargarepe.

I pored velikog uspeha EST, postoje još uvek nerešena pitanja uključujući optimalno doziranje leka, sa posebnim osvrtom na tkiva i organe koja slabo ili nikako ne reaguju na primenu terapije (pluća, kosti, mozak) [111].

Svi ovi činiooci podvlače značaj iznalaženja novih terapijskih pristupa, kao što su supstrat redukujuća terapija [112] i šaperonska terapija [113].

1.6.3. Drugi terapijski modaliteti

Pored klasičnog pristupa lečenju Gošeove bolesti, razvijena je i tzv. supstrat redukujuća terapija koja je predložena kao terapijski model još 1980. godine [114]. U slučaju klasičnih glikosfingolipidoza kao što je i Gošeova bolest, ukoliko se brzina sinteze glikosfingolipida uspori, akumuliranje novostvorenih lipida u lizozomalnom odeljku ćelije bi se moglo značajno smanjiti. Rezidualna enzimaska aktivnost u lizozomima bi bila dovoljna za razgradnju glikolipida što bi kao krajnji efekat dovelo do poboljšanja stanja bolesnika. Dakle, cilj ovog terapijskog pristupa je uravnotežavanje brzine biosinteze i patološki smanjene brzine katabolizma supstrata. Čak i u odsustvu bilo kakve enzimске aktivnosti, brzina akumulacije lipida bi se smanjila što bi dovelo i do usporenja evolucije bolesti. Veoma je važno naglasiti da je cilj ove terapije parcijalna inhibicija biosinteze glikosfingolipida, a ne kompletna, koja bi verovatno dovela do citotoksičnih efekata [115].

Gošeova bolest, kao i većina drugih sfingolipidoza, predstavlja posledicu nakupljanja glikosfingolipida koji nastaju od glukozil-ceramida. Formiranje glukozil-ceramida od ceramida čini prvi opredeljeni korak u biosintetskom putu glikosfingolipida. U ovoj reakciji dolazi do prenosa uridil-difosfat (UDP)-glukoze na molekul ceramida [116], a enzim koji katalizuje ovu reakciju je UDP-glukozilceramid transferaza. Upravo ovaj enzim je izabran kao meta za supstrat redukujuću terapiju [117]. Jedan od prvih lekova sa ovim mehanizmom dejstva, registrovan u terapiji bolesnika sa Gošeovom bolešću je N-butil deoksinojirimicin ili miglustat (*Zavesca*®, *Searle*) [112]. Navedeni lek se koristi u terapiji blage do umerene GB tip 1 kada EST nije pogodna [118]. Još jedan predstavnik ove grupe lekova je eliglustat (*Cerdelga*®, *Sanofi-Genzyme*) koji je dobio odobrenje u Evropi 2015. godine i koji predstavlja dobru alternativu infuzijama EST [119].

Pored uloge supstrat redukujuće terapije, u poslednje vreme se kao novi terapijski modalitet za Gošeovu bolest pominje i terapija molekularnim šaperonima [120]. Mehanizam dejstva šaperona se sastoji u „spašavanju“ pogrešno struktuiranih, mutiranih proteina. Proteini koji zbog genske mutacije imaju pogrešnu sekundarnu i terciarnu strukturu, upućuju se u proces razgradnje preko endoplazmatskog retikuluma. Sprečavajući

ovaj proces, šaperoni usmeravaju mutirane proteine do lizozoma omogućujući njihovu rezidualnu aktivnost. Farmakološki šaperoni razvijeni za Goševu bolest su predmet nekoliko studija u literaturi [113, 121, 122], uključujući i pozitivne rezultate pilot studija sa primenom ambroksola [123].

1.7. Citopatologija Goševе bolesti – uloga makrofaga i citokina

Patološke promene u ćeliji u Goševoj bolesti nastaju na nivou lizozoma. Endogeni i egzogeni makromolekuli, uključujući i glukocerebrozid, dopremaju se do lizozoma procesima endocitoze, pinocitoze, fagocitoze i autofagocitoze [124]. Sami lizozomalni proteini tj. kisele hidrolaze se ciljano dostavljaju do lizozoma uglavnom putem receptora za manoza-6-fosfat [125].

Iako se uglavnom pretpostavlja da težina bolesti zavisi od nivoa rezidualne aktivnosti glukocerebrozidaze [20], ovu činjenicu je teško dokazati za najveći broj mutacija [126]. Takođe, korelacija između određenog genotipa i fenotipske ekspresije bolesti je slaba, iako se zna da određene mutacije predisponiraju određeni tip bolesti. Tako mutacija L444P uglavnom dovodi do neuronopatske forme bolesti, dok prisustvo barem jednog alela N370S uglavnom isključuje oboljenje centralnog nervnog sistema. Težina i fenotipska ekspresija bolesti može da se razlikuje među rođenom braćom i sestrama, pa čak i između identičnih blizanaca [127].

Još uvek se ne zna na koji način akumulacija glukocerebrozida dovodi do citopatoloških promena. Jedno važno pitanje još uvek zahteva odgovor: da li glukocerebrozid posreduje u svim citopatološkim efektima unutar lizozoma ili nešto supstrata uspe da izmakne van lizozoma interagujući sa biohemijskim i celularnim putevima u drugim organelama. U svakom slučaju, posle akumulacije, glukocerebrozid izaziva mnogobrojne celularne reakcije, posebno u tzv. Goševim ćelijama – makrofagima prepunjenim supstratom koji aktivno fagocituju druge ćelije, pre svega senescentne ćelije krvi [128]. Makrofagno poreklo Goševih ćelija je dokazano u mnogim studijama [73, 129]. Ove ćelije su veličine 20 – 100 µm i imaju mala, obično ekscentrična jedra i

citoplazmu sa karakterističnim naborima ili prugama. Štaviše, sve ćelije monocitno-makrofagnog sistema, a posebno tkivni makrofagi mogu biti pogođeni u Gošeovoj bolesti [130]. Pošto su makrofagi glavni citopatološki supstrat Gošeove bolesti, uloženi su napori da se utvrdi kako i zašto je biologija makrofaga izmenjena. Danas se zna da citopatološke promene nisu izazvane samo nakupljanjem glukocerebrozida, već i aktivacijom makrofaga [131]. Dokazano je da su nivoi različitih citokina povišeni u serumu bolesnika, kao što su interleukin (IL) 1 β , faktor tumorske nekroze (TNF), antagonist IL1-receptora, IL-6, solubilni IL2-receptor, CD14 i faktor stimulacije kolonija makrofaga (M-CSF) [132, 133]. Ove promene bi mogle objasniti neke od kliničko-patoloških odlika Gošeove bolesti, pošto IL-1 β , TNF, IL-6 i IL-10 mogu doprineti razvoju osteopenije, IL-1 β , TNF, IL-6 i IL-10 pojavi aktivacije koagulacionog sistema i hipermetabolizma, dok IL-6 i IL-10 mogu doprineti razvoju gamopatija i multiplog mijeloma [99, 132]. Osteoporoza se može povezati i sa povećanjem citokina MIP-1 α i MIP-1 β u plazmi što utiče na resorpciju kosti povećanjem aktivnosti osteoklasta [134].

1.8. Maligna oboljenja i Gošeova bolest

Hematološke neoplazme su relativno retke u opštoj populaciji, uključujući multipli mijelom i leukemije. Godišnja incidencija multiplog mijeloma u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) iznosi oko 3-4 na 100.000 i predstavlja oko 1% svih formi kancera odnosno 10% svih hematoloških maligniteta [135]. Incidencija leukemije iznosi oko 6-10 na 100.000 stanovnika [136], dok je limfom najčešća forma maligne hemopatije.

U literaturi postoje brojni opisi slučajeva koji navode koincidentnu pojavu kako hematoloških tako i ostalih maligniteta u bolesnika sa tipom 1 Gošeove bolesti, uključujući limfome [137, 138], leukemije [139, 140] i mutipli mijelom [141, 142]. Brojne studije su pokušale da daju odgovor na veoma važna pitanja o postojanju statistički značajno više incidencije maligniteta u bolesnika sa Gošeovom bolešću, o eventualnoj uzročno posledičnoj vezi između ovih stanja i proceni rizika za razvoj maligne bolesti kod ovih bolesnika [143-145]. Među navedenim studijama, studija de Fost-a iz 2006. godine, koja je

obuhvatila 131 bolesnika, navodi kao zaključak posebno visoko povećanje incidencije multiplog mijeloma iz grupe hematoloških neoplazmi, kao i hepatocelularnog karcinoma, bez prethodnog postojanja ciroze jetre [143].

1.8.1. Patogeneza multiplog mijeloma – značaj monoklonske gamapatije neodređenog značaja

Multipli mijelom (MM) je progresivna hematološka neoplazma koja se odlikuje povećanjem broja maligno transformisanih plazma ćelija u koštanoj srži i prekomernom produkcijom monoklonskih imunoglobulina (IgG, IgA, IgD ili IgE klase) ili slobodnih lakih kapa i lambda lanaca imunoglobulina (Bens-Džonsov protein). Ostale kliničke manifestacije uključuju povećanu osetljivost na bakterijske infekcije, hiperkalcemiju, anemiju, amiloidozu, oštećenje bubrega, hiperviskozni sindrom, destrukciju kosti i generalizovanu osteoporozu kao i poremećaj produkcije normalnih imunoglobulina. Smatra se da razvoju multiplog mijeloma prethodi takozvana monoklonska gamapatija neodređenog značaja (*monoclonal gammopathy of undetermined significance*, MGUS) i stanje označeno kao „tinjajući“ (*smouldering*) multipli mijelom [146].

MGUS se definiše kao prisustvo monoklalnog proteina seruma (M-protein), bilo IgA, IgG ili IgD klase, u koncentraciji <3 g/dL, uz prisustvo <10% plazma ćelija u koštanoj srži i odsustvo karakterističnih promena koje su posledica proliferacije plazma ćelija tj. litičkih lezija kosti, anemije, hiperkalcemije i bubrežne insuficijencije. Definicija tzv. tinjajućeg mijeloma se razlikuje od prethodno navedene definicije MGUS-a u tome što su plazma ćelije prisutne sa više od 10% u koštanoj srži i što je koncentracija M-proteina seruma >3 g/dL [147].

Mehanizmi neoplastične transformacije B ćelija još uvek nisu dovoljno poznati, ali izgleda da obuhvataju više koraka [148]. Mogući inicijatori procesa bi mogle biti translokacije genskog lokusa za teški lanac imunoglobulina na hromozomu 14q32 i/ili delecija hromozoma 13 kao odgovor na infekciju ili imunsku disregulaciju [149]. Povećana ekspresija *c-myc* onkogene u B ćelijama je takođe predložena kao jedan od ranih koraka u onkogenezi [150].

Maligno transformisana B prekursorska ćelija najverovatnije nastaje u limfnom čvoru, a potom migrira u koštanu srž koja predstavlja pogodnu mikrookolinu za terminalnu diferencijaciju u plazma ćelije [151]. U koštanoj srži, brojni faktori mogu uticati na plazma ćelije i produžiti njihovu vijabilnost, i to razni proinflamatorni i antiinflamatorni citokini, hemokini, faktori rasta, kao i direktne ćelijsko-ćelijske interakcije [152].

Enzim ciklooksigenaza-2 (COX-2) pokazuje pojačanu ekspresiju u koštanoj srži bolesnika sa MM. Ekspresija COX-2 je povećana u oko 11% bolesnika sa MGUS, 31% bolesnika prilikom postavljanja dijagnoze MM i u 47% bolesnika sa recidivom bolesti ili refrakternim oboljenjem [153]. Koncentracije IL-10, IL-11, interferona alfa i TNF su takođe značajno povišene u kulturi ćelija koštane srži bolesnika sa MM [154]. Smatra se da IL-6 i IL-1 beta imaju istaknutu ulogu u progresiji premijelomskih stanja u MM [155], a posebno u konverziji MGUS u MM, kao i u podsticanju proliferacije i preživljavanja mijelomskih ćelija [156].

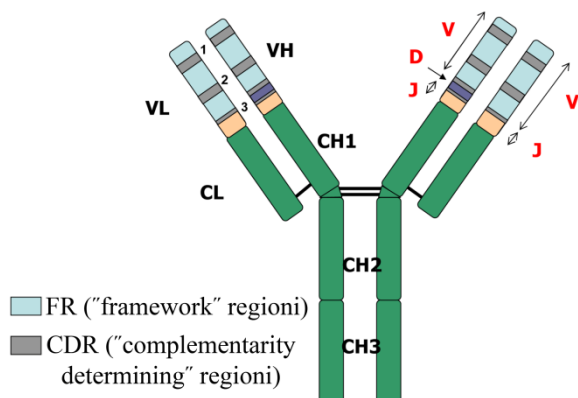
1.9 Imunoglobulinski geni

B limfociti na svojoj površini eksprimiraju B ćelijski receptor ("B cell receptor"; BcR), odgovoran za prepoznavanje velikog broja stranih antigena. BcR se sastoji od dve komponente: imunoglobulinske, koja prepoznaje i vezuje antigen, i signalne, koja se sastoji od heterodimernog koreceptora CD79A/CD79B i odgovorna je za transmisiju signala sa aktiviranog BcR u unutrašnjost ćelije.

Imunoglobulinski molekul (IG) je heterodimer koji se sastoji od 2 identična teška (H) lanca i 2 identična laka (L) lanca (kapa ili lambda), povezana disulfidnim vezama. Svaki lanac sadrži varijabilni N-terminalni domen, odgovoran za prepoznavanje antigena i konstantni, C-terminalni region koji kod H lanca definiše izotipove imunoglobulina sa različitim efektorskim funkcijama.

Varijabilni domen teških lanaca (VH) kodiraju 3 grupe gena: *V* ("variable"), *D* ("diversity") i *J* ("joining"), dok *V* domen lakih lanaca (VL) kodiraju samo *V* i *J* geni. *V* domen sadrži 4 relativno konzervisana regiona okvira čitanja ("framework region" - FR; od FR1 do FR4) koji održavaju strukturu domena, između kojih se nalaze 3 visoko varijabilna

regiona koji određuju komplementarnost ("complementarity determining region"; CDR1-3) koji direktno interaguju sa antigenom (Slika 1). CDR3 je glavna determinanta antigenske specifičnosti; nalazi se na mestu spajanja *V*, (*D*) i *J* gena i, stoga, pokazuje najveći stepen varijabilnosti [157]. Konstantni region je kodiran *C* genima.



Slika 1. Shematski prikaz molekula imunoglobulina
[<http://www.ericll.org>]

Geni koji kodiraju teške lance imunoglobulina se nalaze u okviru *IGH* lokusa lociranog na hromozomu 14 (14q32.33). *IGK* lokus sadrži gene koji kodiraju kapa L lance i nalazi se na hromozomu 2 (2p11.2), dok *IGL* lokus sadrži gene koji kodiraju lambda L lance i nalazi se na hromozomu 22 (22q11.2).

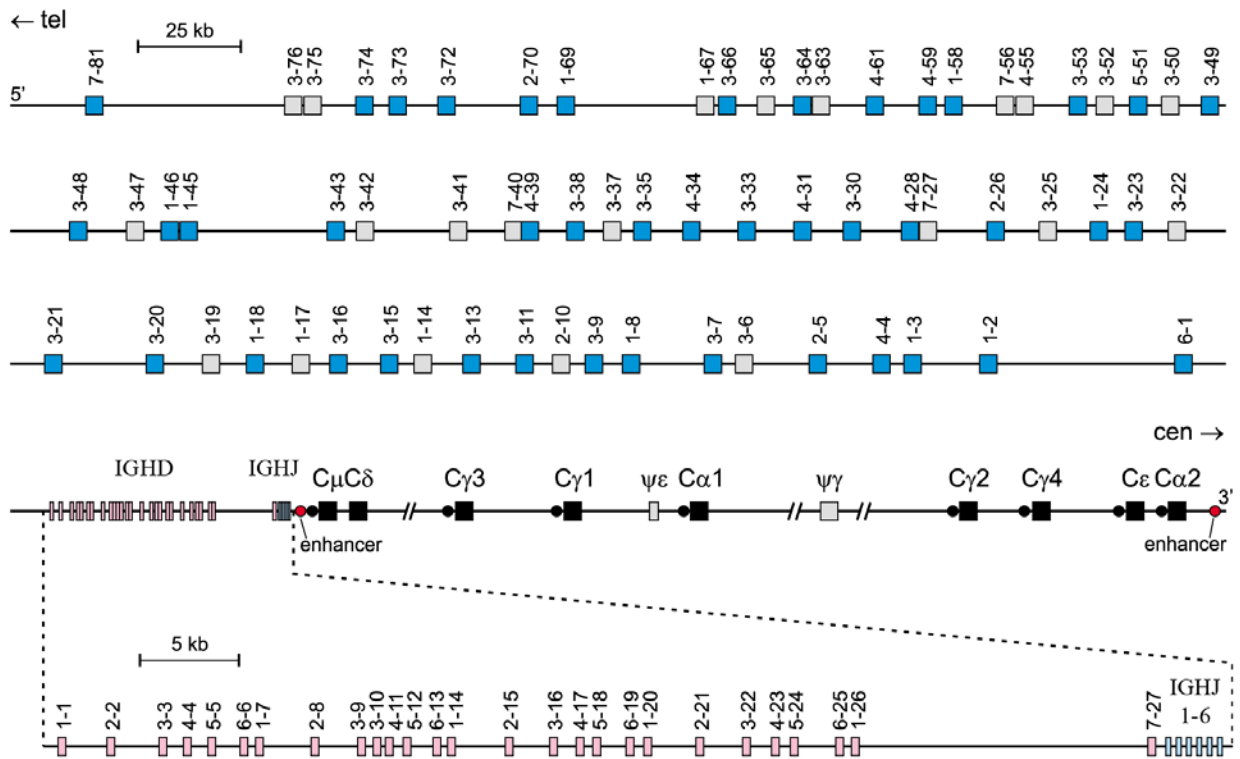
***IGH* lokus**

Većina gena koji kodiraju teške lance imunoglobulina (*IGH*) je locirana na hromozomu 14q32.33 i organizovana u 4 klastera, *V*, *D*, *J* i *C* u 5'- 3' orijentaciji (Slika 2). *IGH* lokus obuhvata ukupno 123-129 *IGHV* gena, u zavisnosti od haplotipa, a 38-46 gena je funkcionalno. Na osnovu homologije nukleotidne sekvence, ovi funkcionalni geni su podeljeni u 6-7 familija (*IGHV1*- *IGHV7*) [157].

Velikom repertoaru *IGHV* gena doprinosi i činjenica da su mnogi od njih polimorfni, kako po pitanju broja kopija, tako i po pitanju nukleotidne sekvence. Ukupan broj *IGHV* gena u ćeliji je različit kod različitih individua usled alelskog polimorfizma koji je rezultat insercije/delecije 6 *IGHV* gena. Na primer, insercija fragmenta od 50 kb koji obuhvata 5 *IGHV* gena je prisutna kod 45% pripadnika bele rase. Pored toga, alelske varijante koje se razlikuju u pojedinačnim nukleotidnim supstitucijama su detektovane kod mnogih *IGHV* gena, pa tako neki (*IGHV1-69*, *IGHV4-34*) imaju i do 13 alela. Pored funkcionalnih gena, *IGH* lokus sadrži i tzv. otvoreni okvir čitanja - ORF ("open reading frame") za 4 potencijalna gena, kao i 79 pseudogena.

Nizvodno od *IGHV* klastera locirano je 27 *IGHD* gena, od kojih je 23 funkcionalno i svrstano u 7 familija (*IGHD1-IGHD7*), a za njima sledi 9 *IGHJ* gena (6 funkcionalnih). Kao u slučaju *IGHV* gena, i kod *IGHD* i *IGHJ* gena su opisane alelske varijante.

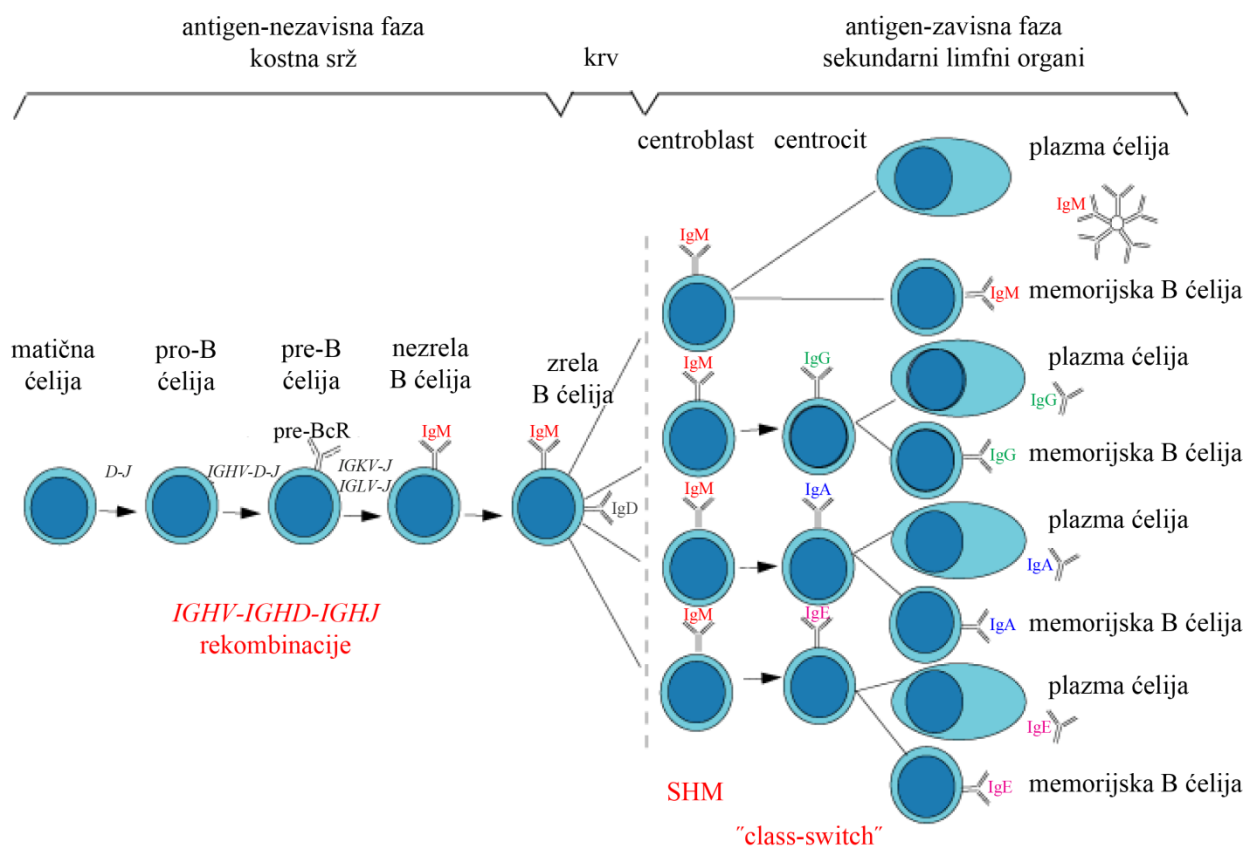
Na 3' kraju *IGH* lokusa se nalazi 11 *IGHC* gena, od kojih su 2 pseudogeni. Još 35 gena, uključujući *IGHV* i *IGHD*, je nađeno na hromozomima 15 i 16; oni se nazivaju "orfon" i ne doprinose *IGH* genskom repertoaru B limfocita.



Slika 2. Shematski prikaz *IGH* lokusa. Od *IGHV* gena su prikazani samo funkcionalni geni (plavo) i pseudogeni koji mogu da se rearanžiraju (sivo) [158]

Imunoglobulinski geni u razviću B limfocita

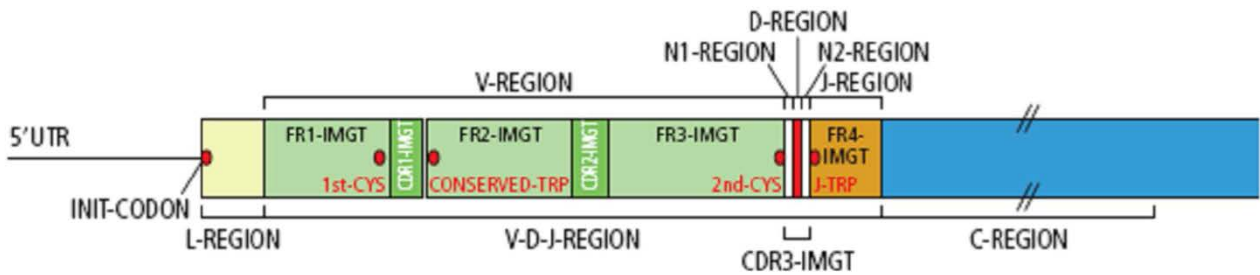
Diferencijacija B limfocita je kompleksan proces koji se sastoji iz dve faze (Slika 3). U prvoj, koja se dešava u kostnoj srži (i fetalnoj jetri) i nezavisna je od prisustva antigena, dolazi do kombinovanja *V*, (*D*) i *J* gena putem DNK rekombinacija i ekspresije jedinstvenog membranski vezanog IG na površini svakog B limfocita.



Slika 3. Diferencijacija B limfocita [<http://www.ericll.org>]

Proces somatskih DNK rekombinacija započinje na *IGH* lokusu, a zatim se odvija na lokusima za L lance; prvo se rekombinuju geni na *IGK* lokusu, a u slučaju da je dobijeni rearanžman neproduktivan, rearanžira se *IGL* lokus.

Na *IGH* lokusu prvo dolazi do rearanžiranja nasumično odabranog *IGHD* i *IGHJ* gena; nastali *IGHD-IGHJ* rearanžman se zatim kombinuje sa nasumično odabranim *IGHV* genom [159, 160]. Tokom rekombinacije, sekvence između rearanžiranih gena bivaju deletirane. Finalni *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžman se transkribuje u primarni transkript koji uključuje i C region; procesom splajsinga se uklanjaju intronske sekvence, a ujedno dolazi i do spajanja *IGHV-IGHD-IGHJ* gena sa *IGHC* genom (*C μ* ili *C δ*) (Slika 4). Sličan proces se odvija i u okviru *IGK*, odnosno *IGL* lokusa.



Slika 4. Shematski prikaz *IGH* transkripta. Označene su pozicije konzerviranih amino-kiselina koje, prema IMGT ("The International ImMunoGeneTics Information System"), definišu granice VH CDR regiona: "1st-CYS" - kodon za konzervirani cistein na poziciji 23; "conserved-TRP" - kodon za konzervirani triptofan na poziciji 41; "2nd-CYS" - kodon za konzervirani cistein na poziciji 104; "J-TRP" - kodon za konzervirani triptofan na poziciji 118. N1 i N2 regiona nastaju delecijom nukleotida sa krajeva gena koji se rearanžiraju, koja je praćena nasumičnom adicijom nukleotida (broj deletiranih i dodatih nukleotida je varijabilan). L region kodira signalni peptid koji se nakon translacije iseca sa polipeptidnog lanca [<http://www.ericll.org>].

Dok se rekombinacija između *IGHD* i *IGHJ* gena odvija na oba *IGH* alela, rekombinacija *IGHD-IGHJ* rearanžmana sa *IGHV* genom se dešava na samo jednom alelu. Samo u slučaju da je dobijeni *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžman neproduktivan, dolazi do rekombinacije i na drugom *IGH* alelu [161]. Ovim mehanizmom "alelskog isključivanja" se obezbeđuje da B limfocit produkuje samo jedan tip H lanaca i time bude specifičan za samo jedan tip antigena. Ukoliko rekombinacija ni na jednom alelu ne dovede do nastanka produktivnog rearanžmana, B ćelije umiru apoptozom. U veoma retkim slučajevima se dešava da kontrola "alelskog isključivanja" zataji, pa B limfocit eksprimira dva različita funkcionalna H lanca. "Alelsko isključivanje" je prisutno i u rekombinaciji gena za L lance.

Nakon uspešnih rekombinacija lokusa za H i L lance imunoglobulina, sintetisani IG lanci formiraju IgM koji u asocijaciji sa CD79A/CD79B koreceptorom formira BcR eksprimiran na površini ćelije. Ovi nezreli B limfociti napuštaju kostnu srž i migriraju u slezinu gde sazrevaju u naivne B ćelije.

Druga faza diferencijacije B limfocita se odvija u perifernim limfnim organima gde se naivne B ćelije susreću sa antigenom. Aktivacija BcR, u kombinaciji sa aktivacijom CD40 receptora i sekrecijom citokina od strane T "helper" limfocita, dovodi do formiranja sekundarnih folikula, a u njima do organizovanja visoko specijalizovanih struktura, tzv. "germinalnih centara" [162]. U germinalnim centrima, tokom proliferacije B limfocita,

dolazi do njihove dalje diverzifikacije putem uvođenja somatskih hipermutacija u IG V domene, kao i "class-switch" rekombinacija tokom kojih se C region zamenjuje drugim izotipom [163, 164]. Kao rezultat ovih procesa dolazi do produkcije B limfocita sa visokim afinitetom i specifičnošću za određeni antigen, koji se diferenciraju u memorijske B ćelije ili IG-sekretujuće plazma ćelije. Ćelije koje proizvode IG sa niskim afinitetom za antigen ili ne proizvode IG, umiru apoptozom u germinalnom centru.

Somatske hipermutacije

Somatske hipermutacije (SHM) se uglavnom sastoje od pojedinačnih nukleotidnih supstitucija [165] koje se dešavaju sa frekvencom od oko 10^{-5} do 10^{-3} po baznom paru po ćelijskoj deobi, što je stopa oko 10^6 puta veća od stope spontanijih mutacija u drugim ćelijama. Zbog specifičnog mehanizma kojim se generišu SHM, a koji uključuje AID enzim ("activation-induced cytidine deaminase"), neophodno je da se tokom replikacije DNK odvija i transkripcija rearanžiranog *IG* lokusa [166].

Uvođenje SHM počinje nizvodno od IG promotora i obuhvata region dugačak 1.5 do 2Kb. Najveću frekvencu mutacije dostižu u IGHV-IGHD-IGHJ regionu, dok C region nije zahvaćen. SHM se najčešće uvode u (A/T)A i G(C/T)(A/T), kao i njima komplementarne reverzne motive, pri čemu su tranzicije mnogo češće od transverzija. Mutacije se dešavaju na oba lanca DNK i mogu biti lokalizovane kako u FR, tako i u CDR regionima. Mutacije koje dovode do zamene amino-kiseline na datoj poziciji mogu povećati afinitet IG za antigen, pa se zato akumuliraju u CDR sekvencama. S druge strane, u FR regionima su favorizovane mutacije koje ne dovode do zamene amino-kiseline, kako bi se sačuvala struktura domena [167, 168].

U retkim slučajevima može doći do uvođenja insercija ili delecija jednog ili više nukleotida u rearanžiranu IG sekvencu [169]. Ukoliko se pri tome ne poremeti okvir čitanja, rearanžman ostaje produktivan.

Treba naglasiti da se proces uvođenja SHM može odvijati i izvan germinalnih centara, pa čak i u odsustvu T "helper" limfocita.

1.10 Genski polimorfizmi

Varijanta genske sekvence predstavlja trajnu izmenu u sekvenci baza DNK koja čini jedan gen, čime se dati redosled baza razlikuje u odnosu na većinu ljudi. Genske varijante mogu biti različite veličine. Mogu da utiču samo na jedan par baza, sa jedne strane ili pak na čitav segment hromozoma koji obuhvata više gena, sa druge strane. Nekoliko tipova genskih varijanti mogu prouzrokovati bolest. Modifikacije jedne nukleotidne baze, tzv. polimorfizam pojedinačnog nukleotida (engl. *single-nucleotide polymorphism* - *SNP*) predstavlja najčešću vrstu genske varijante. Promena izazvana SNP-om može imati funkciju "missense" mutacije, "nonsense" mutacije ili mutacije sa poremećajem okvira čitanja (engl. *frameshift* mutacija). "Missense" mutacija predstavlja zamenu jedne baze drugom što dovodi do zamene jedne aminokiseline drugom, u strukturi proteina, dovodeći do izmene funkcije proteina. "Nonsense" mutacija, sa druge strane, dovodi do prevremenog stvaranja stop kodona, čime nastaje protein nedovoljne dužine koji obično nije funkcionalan. "Frameshift" mutacija je uzrokovana insercijama ili delecijama nukleotida do broja koji nije deljiv sa tri, te usled poremećenog okvira čitanja dolazi do potpunog gubitka aminokiselinske sekvence originalnog proteina počev od mesta mutacije. Ukoliko genske varijante nastanu u germinativnim ćelijama, one se nasleđuju jer gameti nastaju od tih ćelija [170].

Genske varijante mogu imati različite funkcionalne efekte. Varijanta u kodirajućem regionu gena koja ne menja redosled aminokiselina u proteinu ne bi trebalo da ima efekat na fenotip. Međutim, iako se ne bi očekivala direktna promena u šifrovanoj sekvenci aminokiselina, moglo bi da dođe do izmene isecanja ("splajsinga") preinformacione RNK (tokom obrade RNK koja nosi informaciju o strukturi proteina iz DNK) i na taj način bi posredno došlo do izrazite izmene redosleda aminokiselina. Neke varijante koje menjaju aminokiselinu mogu imati samo blag uticaj, a druge mogu snažno uticati na funkciju proteina. Efekat zavisi od prirode i pozicije izmene aminokiseline, a značajne promene dovode do zdravstvenih posledica. Najčešće dolazi do gubitka funkcije proteina, a ponekad se funkcija menja na taj način da protein stiče novu "patogenu", nekada čak i antagonističku funkciju u odnosu na normalni protein. U retkim slučajevima, varijante

mogu da smanje rizik od oboljevanja. Primera radi, "frameshift" mutacija u *CCR5* genu dovodi do otpornosti na infekciju HIV-1 virusom. Pored navedenih uticaja na funkciju proteina, genske varijante mogu da naruše delove strukture DNK koji kontrolišu regulaciju genske ekspresije tj. njeno vreme, mesto i slično [170].

2. CILJEVI RADA

1. Utvrditi da li su u bolesnika sa Goševom bolešću koji imaju klonalni rearanžman gena za teški lanac imunoglobulina, navedeni rearanžmani produktivni tj. da li postoji ekspresija rearanžiranih gena.
2. Odrediti učestalost različitih alela proinflammatoryh molekula (*TNFA*, *IL10* i *IL6*) u grupi pacijenata sa Goševom bolešću i uporediti ih sa podacima za zdrave kontrole u Srbiji i pacijente sa Goševom bolešću u drugim populacijama.
3. Utvrditi da li su klonalni rearanžmani gena za teški lanac imunoglobulina i navedeni polimorfizmi gena za proinflammatory citokine koji nastaju usled izmene pojedinačnih nukleotidnih baza povezani sa težinom Goševе bolesti, procenjenom na osnovu indeksnog skora.

3. MATERIJAL I METODI

3.1. Ispitanici

Krv bolesnika za navedena ispitivanja je uzimana venepunkcijom, prilikom sprovođenja obaveznih i preporučenih dijagnostičkih procedura za Goševu bolest (rutinske biohemijske analize i praćenje enzima – biomarkera bolesti, pre svega hitotriozidaze, kisele fosfataze i ACE). Nakon razgovora i detaljnog obaveštavanja bolesnika, potpisan je dobrovoljni informisani pristanak za učestvovanje u studiji koji je potom sačuvan u istoriji bolesti. Studija je odobrena od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Uzorci pune krvi (3 ml) za analizu genskih polimorfizama uzeti su od ispitanika u vacutainer-e sa EDTA kao antikoagulantom i transportovani do Laboratorije za imunologiju gde su dalje obrađivani i gde je izolovana i sačuvana genomska DNK u cilju analize polimorfizama citokinskih gena. Drugi uzorak pune krvi (4 mL) sa Na-citratom je transportovan na Institut za molekularnu genetiku i genetički inženjering u Beogradu radi određivanja rearanžmana gena za teški lanac imunoglobulina i sekvenciranja uzoraka u kojima je navedeni rearanžman pozitivan. Ostali klinički podaci i laboratorijske analize su uzete iz odgovarajućih istorija bolesti, uključujući inicijalnu vrednost feritina i hitotriozidaze, kao i kliničke parametre vezane za hepatosplenomegaliju i lezije skeleta što je omogućilo izračunavanje skora težine bolesti i skora težine skeletnih lezija.

Kontrolna grupa za poređenje učestalosti ispitivanih genotipova je selektovana iz baze DNK uzoraka Laboratorije za imunologiju Instituta za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu, ukoliko nisu postojali dostupni podaci u objavljenoj literaturi za zdravu populaciju Srbije.

Kriterijumi za isključenje iz studije: odbijanje pacijenata da učestvuje u studiji, smrt pacijenta ili emigracija u druge države.

3.2. Određivanje mutacionog statusa i genskog repertoara varijabilnog regiona teških lanaca imunoglobulina

3.2.1. Izolacija DNK iz periferne krvi

Za izolaciju DNK iz krvi korišćen je QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen).

Protokol:

- na dno tube sipati 20 µl Qiagen proteaze, dodati 200 µl uzorka, 200 µl pufera AL i promešati vorteksovanjem
- inkubirati u vodenom kupatilu 10 min/56°C kako bi se obezbedilo liziranje ćelija i oslobađanje DNK od proteina
- dodati 200 µl 96-100% etanola i promešati vorteksovanjem
- ovako pripremljen uzorak naneti na QIAamp Mini spin kolonicu, staviti je u tubu i centrifugirati na 6000 g (8000 rpm)/1 min (ispiranje DNK vezane za kolonicu od nečistoća)
- odbaciti tubu sa filtratom, kolonicu premestiti u novu tubu, naneti 500 µl pufera AW1 i centrifugirati na 6000 g (8000 rpm)/1 min (ispiranje DNK vezane za kolonicu od nečistoća)
- odbaciti tubu sa filtratom, kolonicu premestiti u novu tubu, naneti 500 µl pufera AW2 i centrifugirati na 20000 g (14000 rpm)/3 min (ispiranje DNK vezane za kolonicu od nečistoća)
- na kraju prebaciti kolonicu u čistu tubu, dodati 200 µl pufera AE i inkubirati 1 min na sobnoj temperaturi kako bi se povećao prinos DNK
- centrifugiranjem na 6000 g (8000 rpm)/1 min dobija se eluat u kome je rastvorena DNK

- koncentraciju i čistoću DNK odrediti merenjem na spektrofotometru

3.2.2. Izolacija mononuklearnih ćelija iz periferne krvi

Protokol:

- uzorak krvi razblažiti fiziološkim rastvorom u odnosu 1:1
- na dno sterilne epruvete zapremine 10 ml sipati 3 ml Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare)
- 4 ml razblaženog uzorka pažljivo naneti na površinu Ficoll-Paque PLUS, pazeći da se slojevi ne pomešaju
- centrifugirati na 1500 rpm/25 min na sobnoj temperaturi, u kliničkoj centrifugi, bez kočenja
- nakon centrifugiranja, u novu sterilnu epruvetu pipetom prebaciti interfazu ("buffy coat") koja sadrži mononuklearne ćelije
- isprati dva puta 1 x PBS puferom pH=7.4 (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄); nakon svakog ispiranja centrifugirati na 1500 rpm/15 min
- talog mononuklearnih ćelija resuspendovati u TRI reagent-u (Sigma-Aldrich)

3.2.3. Izolacija RNK iz mononuklearnih ćelija

Za izolaciju RNK iz mononuklearnih ćelija je korišćen TRI reagent (Sigma-Aldrich). TRI reagent predstavlja monofazni rastvor fenola i guanidin-izotiocijanata, a sam proces izolacije predstavlja unapređen klasični metod izolacije RNK definisan od strane Chomczynski i saradnika [171].

Protokol:

- u 1 ml TRI reagent-a resuspendovati maksimalno 1×10^7 ćelija i lizirati provlačenjem kroz iglu promera 0.7 mm
- liziran uzorak ostaviti da stoji na sobnoj temperaturi 5-10 min
- dodati 200 μ l hloroforma, snažno promućkati, a zatim uzorak ostaviti da stoji 5-15 min na sobnoj temperaturi
- nakon centrifugiranja na 12000 rcf/15 min/+4°C pojavljuju se jasno odvojene faze: gornja, vodena faza u kojoj se nalazi RNK, interfaza i donja, organska faza u kojoj se nalaze DNK i proteini
- vodenu fazu prebaciti u novu tubu i dodati 0.5 ml izopropanola; promešati invertovanjem tube i ostaviti da stoji 10-15 min na sobnoj temperaturi (precipitacija RNK)
- centrifugirati na 12000 rcf/15 min/+4°C, a zatim ukloniti supernatant dekantovanjem i oprati talog sa 1 ml hladnog 70% etanola
- centrifugirati na 12000 rcf/10 min/+4°C, ukloniti pažljivo etanol i talog osušiti na sobnoj temperaturi
- talog RNK rastvoriti u "RNase-free" vodi
- koncentraciju i čistoću RNK odrediti merenjem na spektrofotometru

3.2.4. Reverzna transkripcija (RT)

Sinteza cDNK je izvršena reakcijom reverzne transkripcije.

Protokol:

- smešu finalnog volumena 11 μ l koja sadrži 2 μ g RNK i 2 μ l $1 \times$ "random-hexamer" prajmera inkubirati 5 min/70°C, a zatim ohladiti na ledu

- dodati smešu finalnog volumena 9 μ l koja sadrži 4 μ l 5 x RT pufera (Fermentas) , 20 U "Ribo-Lock" RNaznog inhibitora (Fermentas), 2 μ l dNTP (10 mM) i 40 U M-MuLV reverzne transkriptaze (Fermentas)
- inkubirati 10 min/25°C, a zatim 1h/42°C
- reakciju zaustaviti inkubacijom 10 min/70°C

3.2.5. PCR amplifikacija *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžmana

PCR ("polymerase chain reaction") je *in vitro* amplifikacija definisane DNK sekvence i predstavlja imitaciju procesa DNK replikacije. Reakcija koristi dva oligonukleotida (prajmeri) komplementarna krajevima sekvence koja se umnožava, koji su međusobno suprotno orijentisani ("forward" i "reverse" prajmer) i dugački najčešće 15-20 nukleotida. Sinteza DNK katalizovana je termostabilnom DNK polimerazom. Ponavljanje ciklusa, od kojih se svaki sastoji od denaturacije DNK, hibridizacije prajmera (aniling) i ekstenzije hibridizovanih prajmera od strane DNK polimeraze, za rezultat ima eksponencijalnu amplifikaciju specifičnog DNK fragmenta. Krajevi amplifikovanog fragmenta su definisani 5' krajevima prajmera, a njihova veličina određena je rastojanjem između sekvenci koje prajmeri prepoznaju. PCR reakciona smeša mora da sadrži komponente potrebne za *in vitro* sintezu DNK: matricu (DNK koja se kopira), prajmere (oligonukleotide komplementarne krajevima sekvence koja se kopira), nukleotide (gradivne elemente DNK), *Taq* polimerazu (termostabilnu DNK polimerazu koja katalizuje ugradnju nukleotida po principu komplementarnosti sa matricom), jone magnezijuma i pufer (neophodni za optimalni rad *Taq* polimeraze).

RT-PCR ("reverse transcriptase polymerase chain reaction") je varijanta PCR metode u kojoj se, kao matrica za amplifikaciju specifične sekvence, koristi cDNK.

U ovom radu su za PCR amplifikacija *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžmana paralelno korišćena dva pristupa.

Prvi pristup je podrazumevao korišćenje tzv. "leader" prajmera koji su komplementarni "leader" sekvencama specifičnim za pojedinačne *IGHV* genske familije (IGHV1-6) [172].

Reakciona smeša finalnog volumena 100 μ l je sadržala sledeće komponente:

- 200 ng cDNK ili 300-500 ng DNK
- 1 x reakcionu pufer (Qiagen)
- 1 x Q pufer (Qiagen)
- dNTP finalne koncentracije 200 μ M
- 60 pmol VHL prajmera
- 60 pmol JH prajmera
- 2.5 U HotStarTaq polimeraze (Qiagen)

VHL prajmer je oligonukleotidni miks dobijen mešanjem "leader" prajmera specifičnih za svaku *IGHV* gensku familiju u ekvimolarnom odnosu (npr. po 10 pmol VH1aL, VH1bL, VH2aL, VH2bL, VH3aL, VH3bL i po 20 pmol VH4L, VH5L i VH6L prajmera).

JH prajmer je takođe oligonukleotidni miks dobijen mešanjem prajmera specifičnih za svaki *IGHJ* gen u ekvimolarnom odnosu (npr. po 20 pmol JH1-2 i JH4-5, i po 10 pmol JH3 i JH6).

Tabela 1. Prajmeri korišćeni za amplifikaciju i sekvenciranje *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžmana

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera
VH1aL	5' - AAA TCG ATA CCA CCA TGG ACT GGA CCT GGA GG - 3'
VH1bL	5' - AAA TCG ATA CCA CCA TGG ACT GGA CCT GGA G(C/A) - 3'
VH2aL	5' - AAA TCG ATA CCA CCA TGG ACA CAC TTT GCT (A/C)AC - 3'
VH2bL	5' - AAA TCG ATA CCA CCA TGG ACA TAC TTT GTT CCA C - 3'
VH3aL	5' - AAA TCG ATA CCA CCA CCA TGG AGT TTG GGC TGA GC - 3'
VH3bL	5' - AAA TCG ATA CCA CCA CCA TGG A(A/G)(C/T) T(G/T)(G/T) G(G/A)C T(G/C/T)(A/C/T) GC - 3'
VH4L	5' - AAA TCG ATA CCA CCA TGA AAC ACC TGT GGT TCT T - 3'
VH5L	5' - AAA TCG ATA CCA CCA TGG GGT CAA CCG CCA TC - 3'
VH6L	5' - AAA TCG ATA CCA CCA TGT CTG TCT CCT TCC TC - 3'
JH1-2	5' - TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT GCC - 3'
JH3	5' - TGA AGA GAC GGT GAC CAT TGT CCC - 3'
JH4-5	5' - TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT TCC - 3'
JH6	5' - TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT CCC - 3'
VLJH	5' - GTG ACC AGG GTN CCT TGG CCC CAG - 3'

Napomena:

- VH1-6L prajmeri su oligonukleotidi komplementarni "leader" sekvencama specifičnim za pojedinačne *IGHV* genske familije; u slučaju *IGHV1*, *IGHV2* i *IGHV3*, za amplifikaciju se koriste 2 VH prajmera (aL i bL) u ekvimolarnim koncentracijama.
- JH1-6 prajmeri su oligonukleotidi komplementarni *IGHJ* genima
- VLJH prajmer je oligonukleotid komplementaran konzervisanom regionu na 3' kraju *IGHJ* gena, koji pokazuje visok stepen homologije kod svih 6 *IGHJ* gena

Temperaturni profil reakcije:

1. 15 min/95°C – aktivacija HotStarTaq polimeraze
2. 40 ciklusa:
 - 1 min/95°C – denaturacija
 - 1 min/59°C – aniling
 - 1.5 min/72°C – elongacija
3. 7 min/72°C – finalna elongacija

Analiza dobijenih RT-PCR ili PCR produkata je vršena elektroforezom na 4% agaroznom gelu ili 8 % poliakrilamidnom gelu.

U slučajevima kada je elektroforetskim razdvajanjem detektovano prisustvo više od jednog konalnog produkta, *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžmani su ponovo umnožavana RT-PCR ili PCR reakcijama specifičnim za pojedinačne *IGHV* genske familije ("family-specific" PCR). Na ovaj način se izbegava isecanje i elucija traka sa agaroznog gela, što je naročito značajno u slučajevima kada su dva klonalna rearanžmana približno jednake dužine.

Reakciona smeša finalnog volumena 100 µl je sadržala sledeće komponente:

~ *IGHV1L / IGHV2L / IGHV3L "family-specific" RT-PCR/PCR*

- 200 ng cDNK ili 300-500 ng DNK
- 1 x reakcioni pufer (Qiagen)
- 1 x Q pufer (Qiagen)
- dNTP finalne koncentracije 200 µM
- 15 pmol VH1aL / VH2aL / VH3aL prajmera
- 15 pmol VH1bL / VH2bL / VH3bL prajmera

- 30 pmol JH prajmera
- 2.5 U HotStarTaq polimeraze (Qiagen)

~ *IGHV4L / IGHV5L / IGHV6L "family-specific" RT-PCR/PCR*

- 200 ng cDNK ili 300-500 ng DNK
- 1 x reakcioni pufer (Qiagen)
- 1 x Q pufer (Qiagen)
- dNTP finalne koncentracije 200 μ M
- 30 pmol VH4L / VH5L / VH6L prajmera
- 30 pmol JH prajmera
- 2.5 U HotStarTaq polimeraze (Qiagen)

Temperaturni profil "family-specific" RT-PCR/PCR reakcija je bio isti kao u slučaju multipleks RT-PCR/PCR reakcije.

Produkti svih šest pojedinačnih reakcija su analizirani elektroforezom na 4% agaroznom gelu ili 8 % poliakrilamidnom gelu.

Drugi pristup je podrazumevao korišćenje tzv. "framework" prajmera koji su komplementarni "framework" regionima (FR1 i FR3) u okviru *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžmana [173]. Da bi se postigla neophodna senzitivnost (10^{-5} - 10^{-6}), rađene su dve runde amplifikacije, pri čemu su za prvu korišćeni tzv. "spoljašnji prajmeri" (FR1 i J1H), a za drugu rundu produkti prve i tzv. "unutrašnji prajmeri" (FR3A i J1H), koji u odnosu na prajmere korišćene u prethodnoj rundi ograničavaju nešto užu region (Tabela 2).

Tabela 2. Prajmeri korišćeni za amplifikaciju *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžmana u dve runde

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera
FR1	5' - (GC)AG GT(AG) CAG CTG (GCT)(AT)G (GC)AG- 3'
J1H	5' - ACC TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT - 3'
FR3A	5' - ACA CGG C(CT)(CG) TGT ATT ACT GT – 3'

Napomena:

- FR1 I FR3A prajmeri su oligonukleotidi komplementarni sekvencama tzv. "framework" regionima *IGHV* gena
- JH1 prajmer je oligonukleotid komplementarni *IGHJ1* genu

Reakciona smeša finalnog volumena 40 µl je sadržala sledeće komponente:

- 200 ng DNK
- 1 x reakcioni pufer (Qiagen)
- 1 x Q pufer (Qiagen)
- dNTP finalne koncentracije 250 µM
- 10 pmol FR1 (prva runda) ili FR3A (druga runda) prajmera
- 10 pmol J1H prajmera (obe runde)
- 2.5 U HotStarTaq polimeraze (Qiagen)

Temperaturni profil reakcije:

4. 15 min/95°C – aktivacija HotStarTaq polimeraze
5. 35 ciklusa:
 - 15 sek/95°C – denaturacija

- 20 sek/50°C – aniling
 - 30 sek/72°C – elongacija
6. 10 min/72°C – finalna elongacija

Uslovi PCR reakcije su bili isti u obe runde amplifikacije.

Produkti prve runde PCR amplifikacije su su analizirani elektroforezom na 4% agaroznom gelu, a produkti druge runde na 8 % poliakrilamidnom gelu.

Dobijeni RT-PCR/PCR produkti su prečišćeni na koloni (QIAquick PCR Purification kit, Qiagen), a koncentracija i čistoća su izmerene na spektrofotometru.

Oba lanca na ovaj način umnoženih *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžmana su zatim sekvencirana upotrebom odgovarajućih prajmera

3.2.6. Analiza DNK na agaroznom gelu

Analiza DNK je vršena na horizontalnom agaroznom gelu [174] odgovarajuće koncentracije (1 – 4%), u zavisnosti od veličine molekula DNK koje treba razdvojiti. Kao pufer za pripremanje gelova korišćen je 1 x TAE pufer (40 mM Tris-acetat, 1mM EDTA pH=8). U gelove je pre polimerizacije dodavana fluorescentna boja etidijum-bromid (u finalnoj koncentraciji 0.5 µg/ml) koja se interkalira u DNK i omogućava njenu vizuelizaciju pod UV svetlom.

Elektroforeza je tekla u 1 x TAE puferu, pri naponu od 4-7 V/cm. DNK je vizuelizovana osvetljavanjem gela UV svetlom, a trajni zapis rezultata je dobijen fotografisanjem gela CCD kamerom integrisanom u sistem za automatsku digitalnu akviziciju slike (BioDocAnalyze System). Veličina fragmenata DNK je određena pomoću adekvatnih komercijalnih markera (Fermentas).

3.2.7. Analiza DNK na poliakrilamidnom gelu

Fragmenti DNK su razdvajani na nenedenaturišućem 8% poliakrilamidnom gelu sledećeg sastava: akrilamid : N,N-metilenbisakrilamid = 29 : 1, 89 mM Tris, 89 mM borna kiselina, 2 mM EDTA pH=8, 0.1% amonijumpersulfat, 0.1% TEMED. Elektroforeza je tekla pri naponu od 10 V/cm u 1 x TBE puferu (89 mM Tris, 89 mM borna kiselina, 2 mM EDTA pH=8).

Vizuelizacija DNK na poliakrilamidnim gelovima vršena je bojenjem srebronitratom [175].

Poliakrilamidni gelovi su, nakon elektroforeze, najpre fiksirani 30 minuta u rastvoru 10% etanola i 0.5% sirćetne kiseline. Nakon toga, gelovi su bojeni 0.1% rastvorom AgNO₃ 10 minuta, uz neprekidno mućkanje na klackalici. Višak AgNO₃ je uklanjan ispiranjem najpre u bi-distilovanoj vodi, a zatim u razvijaču sledećeg sastava: 1.5% NaOH, 0.01% NaBH₄ i 0.048% formaldehid. Gelovi su u razvijaču držani 15-20 minuta, do pojave traka. Razvijanje je stopirano potapanjem gelova u 0.75% rastvor Na₂CO₃.

3.2.8. Prečišćavanje PCR produkata

Za prečišćavanje produkata dobijenih PCR reakcijama korišćen je QIAquick PCR Purification kit (Qiagen).

Protokol:

- pomešati PCR reakcionu smešu i pufer PB u odnosu 1:5
- dodati 10 µl 3M Na-acetata pH=5
- naneti uzorak na QIAquick kolonicu, staviti je u tubu i centrifugirati na 17900 g (13000 rpm)/1 min (adsorpcija DNK)
- odbaciti filtrat, naneti 750 µl pufera PE na kolonicu i centrifugirati na 17900 g (13000 rpm)/1 min (ispiranje DNK od nečistoća)

- odbaciti filtrat i ponoviti centrifugiranje na 17900 g (13000 rpm)/1 min
- prebaciti kolonicu u novu tubu, naneti 30 µl pufera EB i inkubirati 1 min na sobnoj temperaturi kako bi se povećao prinos DNK
- centrifugiranjem na 17900 g (13000 rpm)/1 min dobija se eluat u kome je rastvoren prečišćeni PCR produkt
- koncentraciju i čistoću DNK odrediti merenjem na spektrofotometru

3.2.9. Sekvenciranje IGHV-IGHD-IGHJ rearanžmana

Sekvenciranje DNK je rađeno BigDye™ Terminator v.3.1 Ready Reaction Kit-om (Applied Biosystems) kapilarnom elektroforezom na automatskom sekvenceru (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems). Ovaj kit omogućava sekvenciranje u PCR reakciji u kojoj se, pored deoksinukleotida, koriste i 2',3'-dideoksinukleotidi [176]. DNK polimeraza kopira jedan lanac DNK matrice ugrađujući nukleotide na 3' kraj prajmera, sve dok u rastući lanac ne ugradi neki od dideoksinukleotida. Dideoksinukleotidi nemaju OH-grupu na 3' poziciji, zbog čega nemaju sposobnost vezivanja sledećeg nukleotida, pa njihovom ugradnjom dolazi do terminacije polimerizacije. Reakcije se rade sa samo jednim prajmerom (asimetrični PCR), tako da se dobija serija fragmenata različitih dužina koji se završavaju dideoksinukleotidom. Svaki od 4 dideoksinukleotida je obeležen različitim fluorescentnom bojom, čime je omogućena detekcija fragmenata u sekvenceru. Za razliku od kitova u kojima su svi dideoksinukleotidi obeleženi istom fluorescentnom bojom, ovaj kit omogućava da se sekvenciranje jednog uzorka radi u jednoj, umesto u četiri odvojene PCR reakcije.

Prvo je PCR reakcijom umnožen region DNK koji treba da se sekvencira. Nakon provere PCR produkta elektroforezom, vršeno je njegovo prečišćavanje na koloni. Koncentracija i čistoća prečišćenih PCR produkata merena je na spektrofotometru.

Smeša za sekvenciranje finalne zapremine 8 µl je sadržala sledeće komponente:

- 3-20 ng prečišćenog PCR produkta (za dužine 200-1000 bp) / 150-300 ng plazmidnog konstrukta
- 3.2 pmol prajmera
- 3 μ l Ready Reaction Mix (Applied Biosystems)

Temperaturni profili PCR reakcije za sekvenciranje:

1. 1 min/960C
2. 25 ciklusa:
 - 10 sek/960C
 - 5 sek/500C
 - 4 min/600C
3. ∞ /40C

Produkti PCR reakcije za sekvenciranje su prečišćavani Na-acetatnom precipitacijom.

Protokol:

- u uzorke dodati 40 μ l Na-acetata, promućkati i centrifugirati na 13000 rpm/20 min
- ukloniti supernatant i talogu dodati 200 μ l 70% etanola
- centrifugirati na 13000 rpm /10 min
- ukloniti supernatant i ponoviti prethodni korak još jednom
- talog u potpunosti osušiti, rastvoriti 25 μ l Hi-Di formamida i celokupnu količinu naneti u bunarić na mikrotitarskoj ploči

Dobijeni rezultati su analizirani programom Sequencing Analysis v.5.2 [<http://www.applied biosystems.com>].

Izbor prajmera i postupak sekvenciranja *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžmana je zavisio od načina na koji su oni amplifikovani.

Ukoliko je rearanžman umnožen multipleks RT-PCR/PCR reakcijom, sekvenciranje se odvijalo u tri runde. Naime, u zavisnosti od *IGHV-IGHD-IGHJ* sastava klonalnog rearanžmana, on je umnožen pomoću odgovarajuće kombinacije VHL i JH prajmera. Međutim, pošto multipleks smeša sadrži miks VHL i JH prajmera, ne može se znati koja kombinacija prajmera je dovela do amplifikacije. Samim tim, otežan je izbor prajmera koji će se koristiti u reakciji sekvenciranja. Zbog toga je u prvoj rundi sekvenciranja korišćen VLJH prajmer koji je komplementaran konzervisanom regionu na 3' kraju *IGHJ* gena, i dobijena sekvenca je analizirana u IMGT V-QUEST softveru (<http://www.imgt.org>). S obzirom na poziciju VLJH prajmera, najčešće se ne može dobiti sekvenca celog rearanžmana, ali se dobija sekvenca njegovog 5' kraja, tako da IMGT V-QUEST može da identifikuje prisutan *IGHV* gen. Kada je poznato kojoj *IGHV* familiji pripada *IGHV* gen u datom rearanžmanu, pristupa se drugoj rundi sekvenciranja, gde se kao prajmer za sekvenciranje koristi odgovarajući VHL prajmer. U slučaju *IGHV1*, *IGHV2* i *IGHV3* familije, sekvenciranje u drugoj rundi vršeno je sa oba VHL prajmera (aL i bL) u dve odvojene PCR reakcije, dok je u slučaju *IGHV4*, *IGHV5* i *IGHV6* korišćen samo jedan VHL prajmer. Na ovaj način je dobijena sekvenca kompletnog rearanžmana koja je analizirana u IMGT V-QUEST softveru, čime se otkriva tačan *IGHV-IGHD-IGHJ* sastav klonalnog rearanžmana. U cilju provere dobijenih rezultata, u trećoj rundi je sekvenciran i suprotan lanac rearanžmana, korišćenjem odgovarajućeg JH prajmera, a dobijena sekvenca analizirana u IMGT V-QUEST softveru.

U slučajevima kada je amplifikacija rearanžmana vršena u šest pojedinačnih "family-specific" RT-PCR reakcija, sekvenciranje se odvijalo u dve runde. Pošto se u ovako postavljenom eksperimentu zna kojoj *IGHV* familiji pripada *IGHV* gen prisutan u klonalnom rearanžmanu, u prvoj rundi sekvenciranja korišćen je odgovarajući VHL prajmer. U slučaju *IGHV1*, *IGHV2* i *IGHV3* familije, sekvenciranje je vršeno sa oba VHL prajmera (aL i bL) u dve odvojene PCR reakcije, dok je u slučaju *IGHV4*, *IGHV5* i *IGHV6*

korišćen samo jedan VHL prajmer. Dobijena sekvenca je analizirana u IMGT V-QUEST softveru, čime se otkriva tačan *IGHV-IGHD-IGHJ* sastav klonalnog rearanžmana. U cilju provjere dobijenih rezultata, u drugoj rundi je sekvenciran i suprotan lanac rearanžmana, korišćenjem odgovarajućeg JH prajmera, a dobijena sekvenca analizirana u IMGT V-QUEST softveru.

3.2.10. Analiza sekvenci *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžmana

Sekvence klonalnih *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžmana dobijene sekvenciranjem RT-PCR/PCR produkata su analizirane u IMGT/V-QUEST softveru (<http://www.imgt.org>). IMGT® ("The International ImMunoGeneTics information system") obuhvata 6 baza podataka koje sadrže informacije vezane za imunoglobuline (IG), T-ćelijske receptore (TR), MHC ("major histocompatibility complex") i RPI ("related proteins of the immune system"), kao i 15 interaktivnih programa koji omogućavaju njihovu analizu [177, 178]. IMGT/V-QUEST ("V-QUERy and Standardization") vrši detaljnu karakterizaciju unetih sekvenci i identifikuje *IGHV*, *IGHD* i *IGHJ* gene i alele u rearanžmanu poravnavanjem sa referentnim sekvencama nerearanžiranih ("germline") gena i alela. Pored toga, definišu se FR ("framework") i VH CDR ("heavy complementarity determining") regioni, mutacioni status *IGHV* gena kao i to da li je rearanžman produktivan ili neproduktivan [179, 180].

3.3 Detekcija i analiza polimorfizama citokinskih gena reakcijom lančanog umnožavanja (PCR) u realnom vremenu (Real-time PCR)

Za izolaciju DNK iz periferne krvi pacijenata sa Goševom bolešću i kontrolnih osoba primenjene su odgovarajuće kolone (Genomic DNA Purification Kit, Fermentas) prema uputstvu proizvođača. Nakon izolacije DNK izvršeno je određivanje čistoće i količine prečišćene DNK merenjem apsorbancije na 230, 260, 280 i 320 nm. Uzorci izolovane i izmerene DNK su razblaživani sa vodom do koncentracije od 5 ng/μl i čuvani na -20°C do analize.

Za detekciju i analizu polimorfizama gena *TNF*, *IL10* i *IL6* korišćena je SNP TaqMan metoda upotrebom komercijalno dostupnih smeša oligonukleotida i to: *TNF* rs1800629 #C__7514879_10; *TNF* rs361525 #C__2215707_10; *IL10* rs1800896 #C__1747360_10; *IL10* rs1800871 #C__1747362_10; *IL6* rs1800795, #C__1839697_20 (PE, AppliedBiosystems). Amplifikacija fragmenata DNK Real-time PCR metodom vršena je prema preporukama proizvođača testova.

Real-time PCR amplifikacija je vršena u Realplex² PCR mašini (Eppendorf) pomoću komercijalnog reagensa (Maxima™ Probe qPCR 2X MasterMix, Fermentas) u finalnoj zapremini od 20 µl u optičkim pločama od 96 mesta (PE, AppliedBiosystems).

Ova ispitivanja su urađena u Laboratoriji za imunologiju Instituta za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

3.4 Određivanje težine lezija skeleta numeričkim skorom

Težina afekcije skeletnog sistema u bolesnika obolelih od Gošeoove bolesti je izražena numeričkim skorom težine prema preporukama Hermana i sar. [181]. Veća vrednost skora označava teže lezije skeleta.

Skor 1 označava prisustvo difuzne osteoporoze, skor 2 infiltraciju i ekspanziju medule kostne srži Goševim ćelijama i/ili nalaz deformiteta femura u obliku Erlenmajerove boce, skor 3 prisustvo osteolize (litičkih lezija), skor 4 prisustvo nekroze ili skleroze kosti, a skor 5 destrukciju ili kolaps (frakturu) kosti.

3.5. Statistička obrada podataka

Dobijeni podaci u studiji su obrađeni i prikazani na tabelama i grafikonima uz propratnu diskusiju istih, a u zavisnosti od prirode posmatrane varijable.

Deskripcija numeričkih obeležja je urađena klasičnim metodama opisne statistike i to aritmetičkom sredinom, medijanom i modom kao merama centralne tendencije, standardnom devijacijom kao merom varijabiliteta, kao i opsegom vrednosti.

Analiza raspodela posmatranih varijabli urađena je testom slaganja po Kolmogorov - Smirnovu u cilju primene parametarskih analitičkih metoda.

U analizi rezultata, u zavisnosti od prirode samih varijabli, korišćeni su Student-ov t test kod parametarskih podataka i Mann - Whitney-ev test sume rangova za poređenje razlike između dve grupe neparametarskih podataka po jednom obeležju.

U situacijama kada je bilo više od dva obeležja, primenjena je ili parametarska ili neparametarska analiza varijansnog količnika (ANOVA).

Za analizu učestalosti dva atributivna obeležja korišćen je Pearsonov Hi kvadrat test u obliku tablica kontingencije, a za analizu tri i više obeležja Fisherova analiza varijanse za proporcije.

4. REZULTATI

4.1. Karakteristike bolesnika

Ispitivanjem je bilo obuhvaćeno 27 bolesnika obolelih od tipa I Gošeove bolesti koji se prate i leče na Klinici za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma Kliničkog centra Srbije, Klinici za hematologiju Kliničkog centra Srbije i Klinici za hematologiju Kliničkog centra Niš. U svih bolesnika je pre studijskih aktivnosti uzet pisani informisani pristanak za učešće u studiji. Među navedenim ispitanicima, bilo je 15 žena (55,5%) i 12 muškaraca (44,5%), uzrasta od 19,2 – 65,8 godina (prosečno $40,9 \pm 14,2$ godina). Težina bolesti u momentu postavljanja dijagnoze, izražena Zimranovim SSI skorom je iznosila od 3 – 21 (prosečno $10,8 \pm 4,8$). Inicijalna aktivnost enzima hitotriozidaze je iznosila 1224 - 43428 (prosečno $12457,8 \pm 9501,8$) nmol/mL/h, dok je inicijalni feritin imao vrednosti od 58 - 2136 (prosečno $562,2 \pm 563,1$) ng/mL. Osam bolesnika (29,6%) nije primalo terapiju za Gošeovu bolest u momentu ispitivanja, dok je preostalih 19/27 bolesnika (70,4%) dobijalo enzimsku supstituciju ili terapiju redukcije supstrata. U osam bolesnika (29,6%) je učinjena ranija terapijska splenektomija zbog izraženih kliničkih znakova hipersplenizma. Skorovanjem težine lezija skeleta donjih ekstremiteta i kičme, dobijene su vrednosti od 0 – 5 (medijana 2, mod 2) (Tabela 3).

Tabela 3. Karakteristike bolesnika

Bolesnik	Uzrast (godine)	Pol	Hitotriozidaza (nmol/ml/h)	Feritin (ng/ml)	SSI	Sx	Tx	Skor lezija skeleta
1	19	Ž	3688	58	7	0	36	0
2	23	Ž	4648	64	7	0	36	2
3	41	Ž	18354	544	9	7,5	0	2
4	30	Ž	19960	296	8	0	156	2
5	19	Ž	9464	330	9	0	48	4
6	38	M	3686	432	3	0	0	0
7	54	M	12118	2136	7	8,2	6	2
8	40	Ž	7003	100	6	0	0	2
9	31	Ž	16784	165	7	0	12	2
10	42	M	2982	1160	8	0	0	2
11	34	Ž	22364	140	7	0	0	2
12	62	Ž	1224	330	9	0	0	2
13	66	M	6208	492	12	0	132	2
14	28	M	25000	172	13	0	60	2
15	64	Ž	9553	2060	14	0	123	5
16	21	M	43428	97	6	0	36	2
17	56	M	6804	1500	15	0	36	2
18	43	M	26280	362	16	0	168	2
19	58	Ž	12456	573	19	21,5	132	4
20	49	Ž	6060	495	12	20,3	132	2
21	35	Ž	6589	241	21	14	140	2
22	56	Ž	2604	320	11	22	156	2
23	25	M	13079	186	11	0	160	2
24	34	M	18500	698	19	0	144	4
25	38	M	6298	447	6	0	12	2
26	58	Ž	12816	1078	19	31	0	5
27	41	M	18411	703	12	25	0	3

Legenda: M=muški pol, Ž=ženski pol, SSI=skor težine bolesti, Sx=vremenski period nakon učinjene splenektomije u godinama, Tx=vremenski period primanja terapije u mesecima, n.o.=nije određen.

4.2. Određivanje prisustva klonalnog rearanžmana IGH gena sa sekvenciranjem IGH gena

Određivanje klonalne proliferacije B-limfocita ispitivanjem rearanžmana gena IGH je urađeno kod svih 27 bolesnika. Dobijeni rezultati su upoređeni sa već postojećim rezultatima o prisustvu monoklonalnog proteina u serumu kao i koncentraciji klasa imunoglobulina (IgA, IgG i IgM) u serumu istih bolesnika. Navedeni podaci su već postojali u istorijama bolesti jer predstavljaju redovan deo kliničkog i laboratorijskog praćenja ovih bolesnika.

Klonalnost B-limfocita ispitivanjem rearanžmana gena IGH je detektovana u osam od ukupno 27 ispitanika (29,6%). Pet od navedenih osam bolesnika je imalo monoklonalni rearanžman (62,5%), a tri je imalo biklonalni rearanžman IGH gena (37,5%). Među navedenih 8 bolesnika, pet je imalo i monoklonski protein, dok je u tri bolesnika (37,5%) klonalnost registrovana samo na nivou IGH rearanžmana. Među pet bolesnika koji su imali detektabilni monoklonski protein u serumu, dva su imala IgG paraprotein, jedan IgG λ , jedan IgA κ , a jedan bolesnik kombinaciju klonskih IgA κ i IgG λ lanaca. Dva bolesnika od navedenih osam su imala i hipergamaglobulinemiju. Povećana vrednost imunoglobulina seruma je inače nađena kod ukupno 9/27 bolesnika (33,3%). Većina bolesnika je imala povišen samo IgG (8 od 9, 88,9%), dok je jedan bolesnik uz to imao i povećanje IgA koncentracije u serumu.

Za 17 od 27 bolesnika (63%), postojalo je longitudinalno praćenje podataka o postojanju klonskog IGH rearanžmana, sa prosečnim vremenom praćenja od 5 godina. Među pet bolesnika koji su ranije imali detektabilni rearanžman, kod 4 bolesnika stanje je neizmenjeno, dok je u jednog bolesnika rearanžman postao nedetektabilni nakon perioda praćenja. U preostalih 12/17 bolesnika, rearanžman IGH gena nije nikada detektovan. Navedeni rezultati su prikazani u tabeli 4.

Tabela 4. Rezultati ispitivanja rearanžmana gena *IGH*.

Bolesnik	IGH	M-protein	HG	Prethodni IGH
1	Monoklonalan	Negativan	ne	n.r.
2	Normalan	Negativan	ne	n.r.
3	Normalan	Negativan	IgG↑	n.r.
4	Normalan	Negativan	ne	Normalan
5	Normalan	Negativan	ne	n.r.
6	Normalan	Negativan	ne	Normalan
7	Normalan	Negativan	IgG↑ i IgA↑	n.r.
8	Monoklonalan	Negativan	IgG↑	n.r.
9	Normalan	Negativan	IgG↑	n.r.
10	Monoklonalan	IgGλ	IgG↑	n.r.
11	Biklonalan	IgG paraprotein	ne	n.r.
12	Monoklonalan	Negativan	ne	Monoklonalan
13	Biklonalan	IgAκ + IgGλ	ne	Biklonalan
14	Normalan	Negativan	ne	Normalan
15	Normalan	Negativan	IgG↑	Normalan
16	Normalan	Negativan	ne	Normalan
17	Negativan	Negativan	IgG↑	Triklonalan
18	Normalan	Negativan	ne	Normalan
19	Normalan	Negativan	ne	Normalan
20	Biklonalan	IgAκ	ne	Biklonalan
21	Normalan	Negativan	ne	Normalan
22	Monoklonalan	IgG paraprotein	ne	Monoklonalan
23	Normalan	Negativan	ne	Normalan
24	Normalan	Negativan	ne	Normalan
25	Normalan	Negativan	ne	n.r.
26	Normalan	Negativan	IgG↑	Normalan
27	Normalan	Negativan	IgG↑	Normalan

Legenda: IGH=klonski rearanžman IGH gena, M-protein=monoklonalni protein u serumu, HG=hipergamaglobulinemija, n.r.=nije rađeno.

Svim bolesnicima kojima je IGH klonalnost detektovana, urađena je i analiza IGHV-IGHD-IGHJ rearanžmana. Ovom analizom, klonalnost je detektovana kod jednog bolesnika (bolesnik broj 13). Ovaj bolesnik je tokom perioda praćenja uvek imao

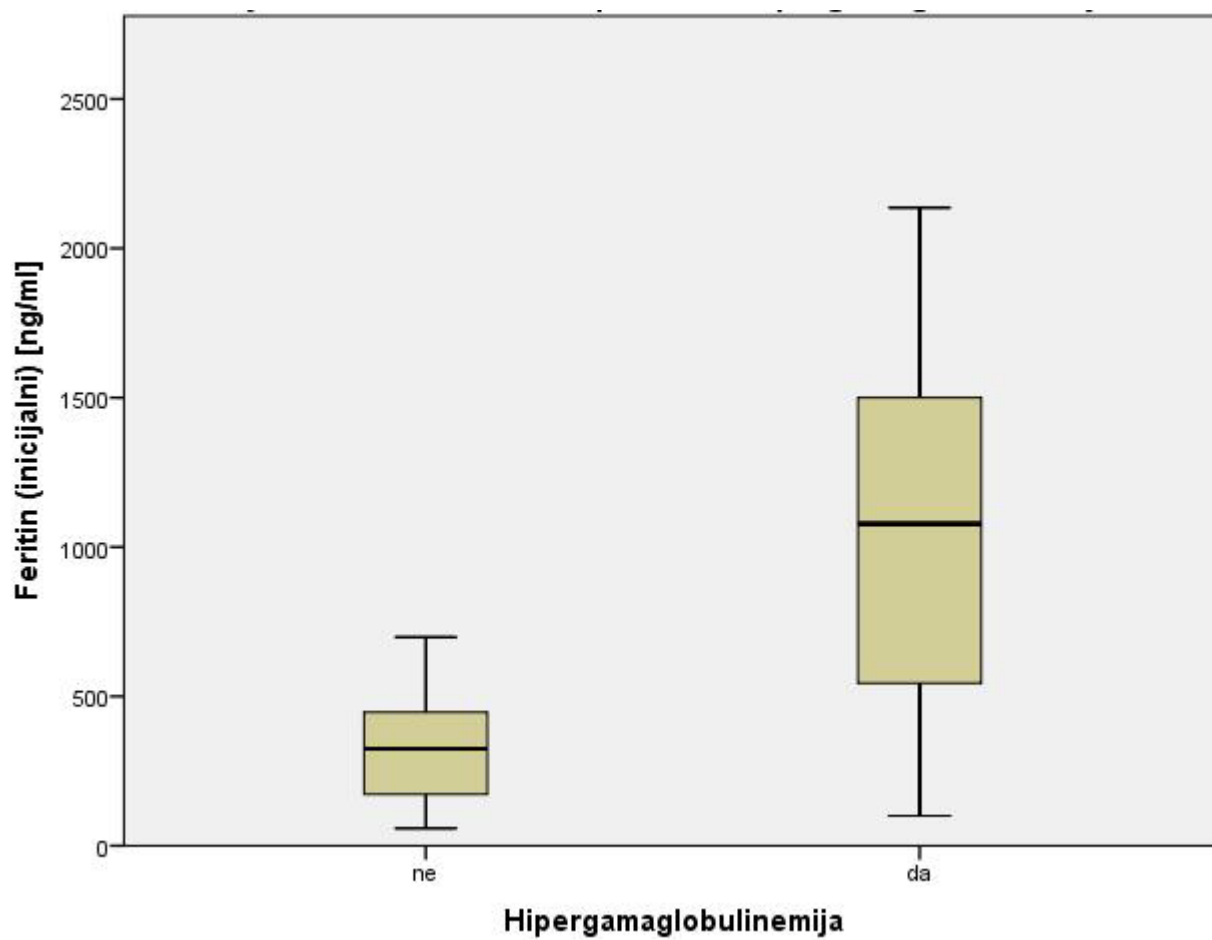
detektabilni biklonalni IGH rearanžman, koristeći konsenzus par prajmera. On se prezentovao očiglednom biklonalnošću u prvoj rundi analize IGHV-IGHD-IGHJ rearanžmana. Detektovani rearanžman je dodatno analiziran sekvenciranjem, a interpretacija sekvence je pokazala da se radi o nemutiranom rearanžmanu koji se sastoji od sekvence IGHV1-2*04, IGHD3-3*02 i IGHJ4*02. Međutim, kada je analiza istog uzorka bila ponovljena, dobijen je drugačiji rearanžman, naime IGHV1-69*01, IGHD3-3*01, IGHJ4*02.

Bolesnici sa prisustvom monoklonskog proteina se nisu značajno razlikovali od bolesnika sa negativnim nalazom u odnosu na uzrast, pol, SSI, dužinu trajanja terapije, prisustvo ili odsustvo slezine, aktivnost hitotriozidaze niti inicijalnu koncentraciju feritina u serumu ($p>0,05$).

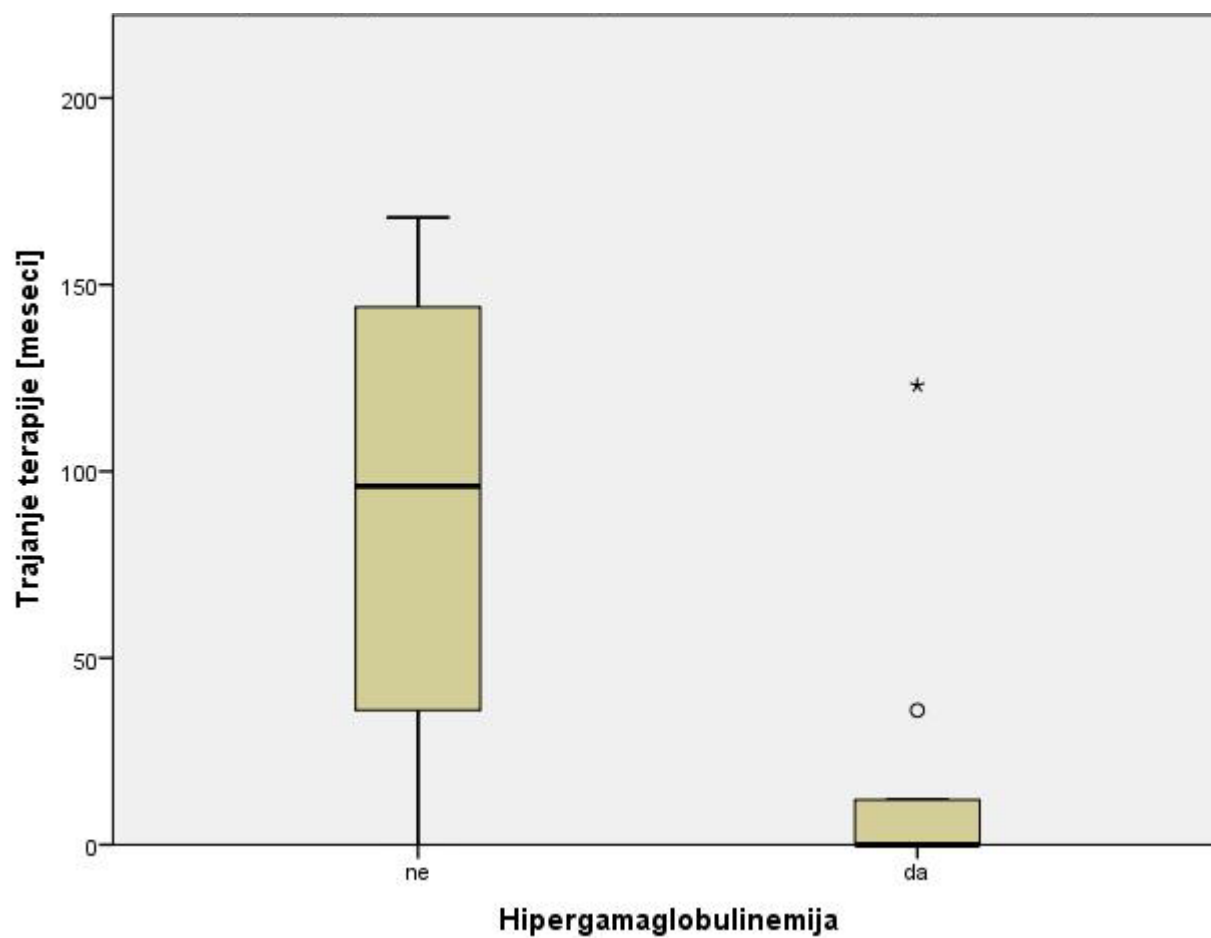
Bolesnici sa prisustvom klonskog rearanžmana IGH se nisu značajno razlikovali od bolesnika sa negativnim nalazom u odnosu na uzrast, pol, SSI, dužinu trajanja terapije, prisustvo ili odsustvo slezine, aktivnost hitotriozidaze niti inicijalnu koncentraciju feritina u serumu ($p>0,05$).

Bolesnici sa hipergamaglobulinemijom su imali značajno kraće trajanje terapije ($p<0,05$) (Grafikon 1) i značajno višu inicijalnu vrednost feritina ($p<0,01$) (Grafikon 2) u odnosu na bolesnike bez hipergamaglobulinemije. Nije bilo razlike između ove dve grupe bolesnika u odnosu na uzrast, pol, SSI, prisustvo ili odsustvo slezine ni aktivnost hitotriozidaze ($p>0,05$).

Grafikon 1. Distribucija feritina u odnosu na prisustvo hipergamaglobulinemije



Grafikon 2. Distribucija terapije u odnosu na prisustvo hipergamaglobulinemije



4.3. Učestalost polimorfizama citokinskih gena

Određena je učestalost sledećih polimorfizama za citokinske gene: *IL10* rs1800871 u 22/27 pacijenata, *IL10* rs1800896 u 18/27 pacijenata, *TNF* rs1800629 u 23/27 bolesnika, *TNF* rs361525 takođe u 23/27 bolesnika i *IL6* rs1800795 u 23/27 bolesnika. Rezultati su navedeni u tabeli 5.

Tabela 5. Prikaz genotipova za polimorfizme citokinskih gena po pacijentu

Bolesnik	<i>IL10</i>		<i>TNF</i>		<i>IL6</i>
	rs1800871	rs1800896	rs1800629	rs361525	rs1800795
1	CT	AA	GG	GG	GC
2	TT	AA	GA	GG	GC
3	CC	GG	GG	GG	GC
4	CT	AA	GG	GG	GG
5	CC	GG	GG	GG	GG
6	CT	GG	GG	GG	GC
7	CC	AA	GG	GG	GC
8	CT	GA	GG	GG	GC
9	CT	n.r.	GA	GG	GC
10	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
11	CT	GA	GG	GG	GC
12	CC	GG	GG	GG	CC
13	CC	GA	GA	GG	GC
14	CT	GA	GG	GG	GG
15	CC	AA	GG	GG	GC
16	CC	GA	GA	GG	GC
17	CC	AA	GG	GG	CC
18	CC	n.r.	GG	GA	GG
19	CC	n.r.	GG	GG	GC
20	CC	GA	GG	GG	GG
21	n.r.	n.r.	GG	GG	GG
22	CT	GA	GG	GG	CC
23	CT	GA	GA	GA	GC
24	CC	n.r.	GA	GG	GC
25	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
26	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
27	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.

Legenda: n.r.=nije rađeno

Učestalosti genotipova i alela za sve određivane polimorfizme, uključujući i učestalosti kod zdravih kontrola iz srpske populacije su prikazane na tabeli 6.

Tabela 6: Učestalost genotipova i alela za navedene polimorfizme citokinskih gena

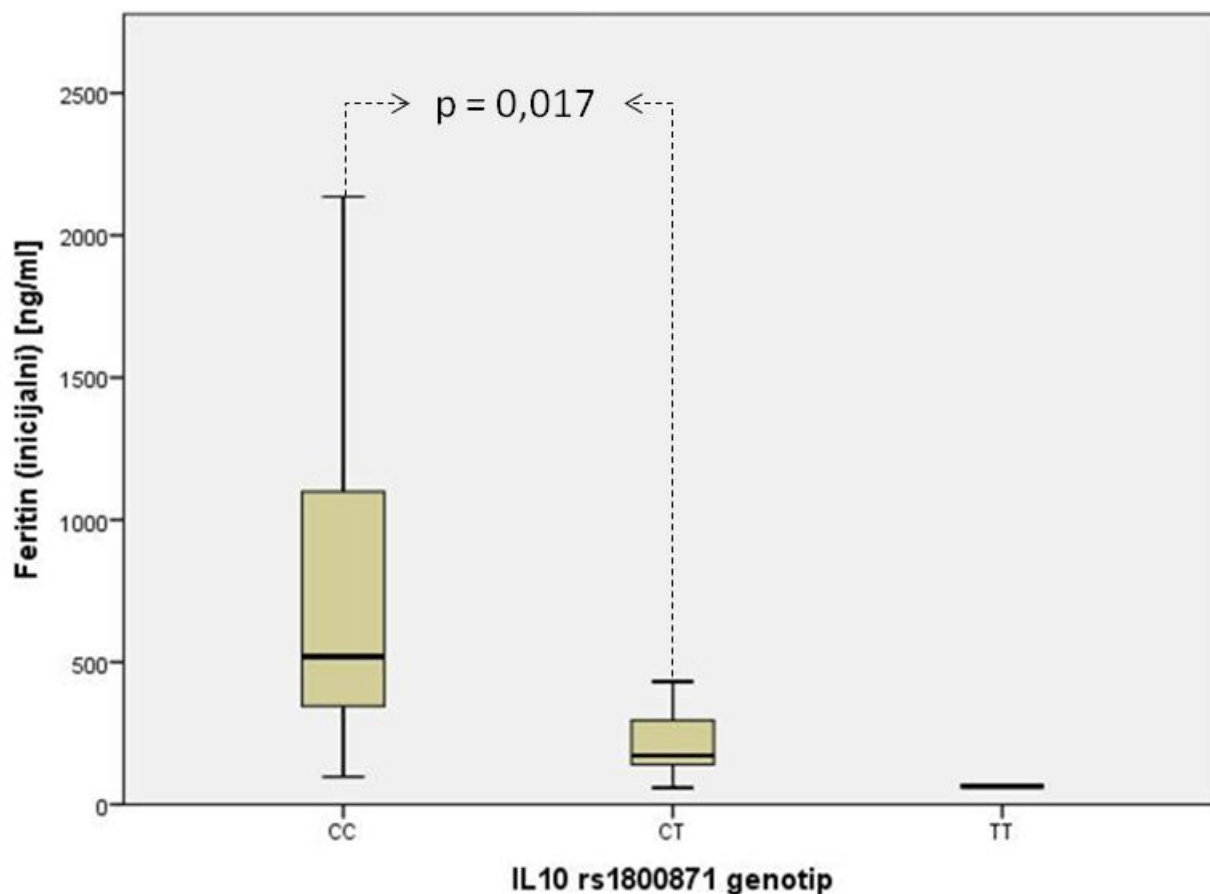
IL-10 rs1800871									
ZK	486	C	T	CC	CT	TT	Cc	Tc	uk.alela
n		722	250	270	182	34	452	216	972
f		0.743	0.257	0.556	0.374	0.070	0.930	0.444	
P	22	C	T	CC	CT	TT	Cc	Tc	uk.alela
n		33	11	12	9	1	21	10	44
f		0.750	0.250	0.545	0.409	0.045	0.955	0.455	
IL-10 rs1800896									
ZK	486	G	A	GG	GA	AA	Gc	Ac	uk.alela
n		409	563	91	227	168	318	395	972
f		0.421	0.579	0.187	0.467	0.346	0.654	0.813	
P	18	G	A	GG	GA	AA	Gc	Ac	uk.alela
n		16	20	4	8	6	12	14	36
f		0.444	0.556	0.222	0.444	0.333	0.667	0.778	
TNF rs1800629									
ZK	486	G	A	GG	GA	AA	Gc	Ac	uk.alela
n		842	130	362	118	6	480	124	972
f		0.866	0.134	0.745	0.243	0.012	0.988	0.255	
P	23	G	A	GG	GA	AA	Gc	Ac	uk.alela
n		40	6	17	6	0	23	6	46
f		0.870	0.130	0.739	0.261	0.000	1.000	0.261	
TNF rs361525									
ZK	486	G	A	GG	GA	AA	Gc	Ac	uk.alela
n		941	31	455	31	0	486	31	972
f		0.968	0.032	0.936	0.064	0.000	1.000	0.064	
P	23	G	A	GG	GA	AA	Gc	Ac	uk.alela
n		44	2	21	2	0	23	2	46
f		0.957	0.043	0.913	0.087	0.000	1.000	0.087	
IL-6 rs1800795									
ZK	250	G	C	GG	GC	CC	Gc	Cc	uk.alela
n		208	292	45	118	87	163	205	500
f		0.416	0.584	0.180	0.472	0.348	0.652	0.820	
P	23	G	C	GG	GC	CC	Gc	Cc	uk.alela
n		26	20	6	14	3	20	17	46
f		0.565	0.435	0.261	0.609	0.130	0.870	0.739	

Legenda: n=broj, f=učestalost, ZK=zdrave kontrole, P=pacijenti

Poređenjem učestalosti genotipova i alela između bolesnika i zdravih kontrolnih ispitanika, nije uočena statistički značajna razlika ni za jedan od navedenih polimorfizama citokinskih gena ($p > 0,05$).

Poređenjem učestalosti alela za polimorfizam *IL10* rs1800871 sa inicijalnom koncentracijom feritina, nađen je značajno veći stepen hiperferitinemije, kod nosilaca C alela, a posebno u grupi bolesnika koji su nosioci homozigotnog CC genotipa ($p < 0,01$) (Grafikon 3). Učestalosti alela za navedeni polimorfizam se nisu razlikovale u odnosu na pol, uzrast, SSI, dužinu trajanja terapije, prisustvo ili odsustvo slezine, aktivnost hitotriozidaze, inicijalnu koncentraciju feritina u serumu, niti u odnosu na prisustvo ili odsustvo monoklonskog proteina, klonskog rearanžmana IGH odnosno hipergamaglobulinemije ($p > 0,05$).

Grafikon 3. Distribucija inicijalne vrednosti feritina u odnosu na genotip polimorfizma *IL10* rs1800871



Poređenjem učestalosti alela za polimorfizam *IL10* rs1800896 u odnosu na pol, uzrast, SSI, dužinu trajanja terapije, prisustvo ili odsustvo slezine, aktivnost hitotriozidaze, inicijalnu koncentraciju feritina u serumu, u odnosu na prisustvo ili odsustvo monoklonskog proteina, klonskog rearanžmana IGH odnosno hipergamaglobulinemije, nije nađena značajna razlika ($p > 0,05$).

Poređenjem učestalosti alela za polimorfizam *TNF* rs1800629 u odnosu na pol, uzrast, SSI, dužinu trajanja terapije, prisustvo ili odsustvo slezine, aktivnost hitotriozidaze, inicijalnu koncentraciju feritina u serumu, u odnosu na prisustvo ili odsustvo monoklonskog proteina, klonskog rearanžmana IGH odnosno hipergamaglobulinemije, nije nađena značajna razlika ($p > 0,05$).

Poređenjem učestalosti alela za polimorfizam *TNF* rs361525 u odnosu na pol, uzrast, SSI, dužinu trajanja terapije, prisustvo ili odsustvo slezine, aktivnost hitotriozidaze, inicijalnu koncentraciju feritina u serumu, u odnosu na prisustvo ili odsustvo monoklonskog proteina, klonskog rearanžmana IGH odnosno hipergamaglobulinemije, nije nađena značajna razlika ($p>0,05$).

Poređenjem učestalosti alela za polimorfizam *IL6* rs1800795 u odnosu na pol, uzrast, SSI, dužinu trajanja terapije, prisustvo ili odsustvo slezine, aktivnost hitotriozidaze, inicijalnu koncentraciju feritina u serumu, u odnosu na prisustvo ili odsustvo monoklonskog proteina, klonskog rearanžmana IGH odnosno hipergamaglobulinemije, nije nađena značajna razlika ($p>0,05$).

5. DISKUSIJA

Moguća povezanost između Gošeove bolesti i maligniteta kod starijih bolesnika je predložena još 1982. godine, nakon *post mortem* analize 20 umrlih bolesnika od kojih je 19 imalo dokaz o postojanju maligniteta. Najčešća forma maligne bolesti među navedenim bolesnicima je bio multipli mijelom [182]. U kasnijoj retrospektivnoj studiji koja je obuhvatila 48 bolesnika iz Izraela, uočen je 14,7 puta veći rizik za razvoj hematoloških neoplazmi u odnosu na zdrave kontrolne ispitanike [183]. U studiji Zimrana i sar. nije nađeno povećanje rizika za oboljevanje od maligne bolesti osim u slučaju multiplog mijeloma, među 505 Aškenazi Jevreja obolelih od Gošeove bolesti [145]. Slično navedenoj studiji, analiza podataka za 2742 bolesnika registrovanih u Međunarodnom registru za Goševu bolest, nije otkrila povećanje rizika za oboljevanje od maligniteta, osim u slučaju multiplog mijeloma za koji je incidencija bila oko 6 puta veća [144]. Sa druge strane, u studiji Taddei-ja i saradnika, relativni rizik od pojave multiplog mijeloma kao primarne neoplazme u bolesnika sa Goševom bolešću je imao vrednost 25 (9,17 – 54,4), sa porastom na vrednost od 37,5 ukoliko se ne uzimaju u obzir samo prvonastale neoplazme [184]. Ipak, postoji verovatnoća da je incidencija ozbiljnih komorbiditeta i kancera znatno veća, obzirom da se podaci o praćenju bolesnika unose dobrovoljno i da upitnik ne traži direktnu informaciju o pojavi kancera među obolelim.

Studija koja je uključila 131 bolesnika sa tipom 1 bolesti, na teritoriji Zapadne Evrope, je ispitala incidenciju kancera i mortalitet usled kancera u poređenju sa zdravim kontrolama istog pola i uzrasta, sa periodom praćenja od 20 godina. Rezultat je pokazao povećanje rizika od 2,5 puta za sve forme kancera, a 12,7 puta za hematološke neoplazme. Incidencija multiplog mijeloma je bila posebno visoka, sa vrednošću standardizovanog unakrsnog odnosa od 51,1 [143].

Navedeni dokazi o višoj incidenciji multiplog mijeloma postavljaju pitanje o postojanju zajedničkih patofizioloških mehanizama između ove dve bolesti i o eventualnom povećanju verovatnoće za razvoj hematoloških maligniteta u zavisnosti od patogenetskih mehanizama same Gošeove bolesti.

Nekoliko manifestacija bolesti su zajedničke za Goševu bolest i multipli mijelom, primera radi citopenija, pojava makrofaga prepunjenih lipidima, amiloidoza, destrukcija kosti i razvoj difuzne osteoporoze [185]. Kao i mijelom, i Goševa bolest je udružena sa pojavom bi- i triklonalnih gamopatija, MGUS [99] i abnormalne produkcije citokina [133].

MGUS se smatra prekursorskom lezijom MM, koja prethodi u većini, ali ipak ne kod svih bolesnika sa MM [186]. Poreklo MGUS se verovatno povezuje sa antigenskom stimulacijom koja predstavlja i jedno od obeležja Goševе bolesti obzirom na stalno prisustvo nerazgrađenog lipidnog supstrata u ćelijama monocitno makrofagnog sistema. Studije su pokazale da ćelije MM eksprimiraju širok spektar TLR koji fiziološki pomažu B ćelijama u prepoznavanju infektivnih agenasa i molekularnih obrazaca strukture patogena [187]. Ligandi koji se specifično vezuju za TLR dovode do povećanja proliferativnog kapaciteta i preživljavanja mijelomskih ćelija. Pored toga, u poređenju sa normalnim ćelijama, plazma ćelije u MGUS prekomerno eksprimiraju CD126 (alfa lanac IL-6 receptora) [188]. Sledstveno, poremećaj ekspresije TLR i/ili prekomerna ekspresija IL-6 receptora na plazma ćelijama može dovesti do neadekvatno pojačanog odgovora na infektivne antigene, obezbeđujući i IL-6 zavisni, autokrini okidač za proliferaciju plazma ćelija [186]. Sličan mehanizam bi mogao biti prisutan i u Goševoj bolesti, obzirom na hroničnu antigensku stimulaciju. Prilikom progresije MGUS u multipli mijelom, mikrookolina koštane srži takođe trpi značajne promene, uključujući indukciju angiogeneze [189], supresiju ćelijski posredovanog imunskog odgovora [190] i uspostavljanje parakrinih petlji u kojima učestvuju citokini kao što su IL-6 i VEGF (faktor rasta vaskularnog endotela) [191]. Litičke lezije kosti koje su karakteristične za obolele od Goševе bolesti, u multiplom mijelomu su izazvane disbalansom između aktivnosti osteoblasta i osteoklasta. Ekspresija aktivatora receptora za ligand nuklearnog faktora κ B (RANKL) je povećana u osteoblastima, uz istovremeno smanjenje ekspresije njegovog receptora-mamca, osteoprotegerina (OPG) [192]. Ovo povećava RANKL/OPG odnos što aktivira osteoklaste i resorpciju kosti. Osim toga, povećana produkcija i oslobađanje makrofagnog inflamatornog proteina 1α (MIP- 1α), IL-3 i IL-6 u ćelijama strome koštane srži takođe doprinosi preteranoj aktivaciji osteoklasta [193]. Sličan mehanizam, takođe zavisian od IL-6, ali i od IL- 1β , TNF i IL-10 je predložen i u Goševoj bolesti [131]. Brojne imunološke

abnormalnosti koje se zbirno nazivaju disregulacija imunskog sistema, su pokazane kod bolesnika i na mišjem modelu bolesti. Boven i sar. su pokazali da Gošeove ćelije nisu inertne već liče na alternativno aktivisane makrofage koji stimulišu monocite da luče citokine u okruženje [73]. Takođe, na mišjem modelu kome je inaktivisan GBA gen je dokazan poremećaj maturacije T ćelija i pojačana antigenska prezentacija kao i aktivacija B ćelija, uz porast populacije NK(T) ćelija [194, 195]. S druge strane, prethodna studija u Srbiji je pokazala metodom protočne citometrije da je u bolesnika obolelih od GB značajno smanjen apsolutni broj T limfocita, CD4⁺ i CD8⁺ limfocita, kao i NK ćelija u poređenju sa zdravim kontrolnim ispitanicima, [196].

Pored imunske disregulacije, u poslednje vreme se proučava i potencijalni uticaj insulinske rezistencije na pojavu malignih tumora. Periferna rezistencija na insulin koja je dokazana u GB [38], ima takođe uticaja i na promociju neoplazije. Rezistencija je fiziološki praćena hiperinsulinemijom koja sama po sebi ne indukuje mutacije u somatskim ćelijama, ali njeni efekti na rast mogu pojačati rast i razvoj premalignih ćelija [197]. U jednoj meta-analizi koja je obradila povećan rizik od hepatocelularnog karcinoma u bolesnika sa dijabetesom, smatra se da postoji i patogenetski uticaj insulinske rezistencije i na lipidnu peroksidaciju [198].

Prevalencija MGUS u Gošeovoj bolesti koja se kreće od 0 – 35% [199] isto tako sugeriše moguću vezu između ove dve bolesti. Takođe, MGUS je povezana sa evolucijom bolesti u multipli mijelom među bolesnicima obolelim od Gošeove bolesti [200], a opisan je i slučaj bolesnika koji je nakon pojave MGUS razvio MM uz proteinuriju lakih lanaca imunoglobulina [141].

Incidencija MGUS u Gošeovoj bolesti izgleda da raste sa starijim uzrastom što je u konzistenciji sa sličnim trendom prisutnim i u opštoj populaciji [201]. Jedna studija je pokazala da su svi bolesnici sa MGUS bili stariji od 50 godina, dok su bolesnici sa poremećajem imunoglobulina imali manje od 50 godina [97]. Mlađi uzrast ipak ne isključuje poremećaje imunoglobulina. U retrospektivnoj studiji pedijatrijskih bolesnika sa tipom 1 Gošeove bolesti, 21 od 23 bolesne dece prosečnog uzrasta 8,5 godina je već imalo hipergamaglobulinemiju bilo sa jednostrukim ili multiplim izotipovima imunoglobulina

[202]. U dece, IgG, IgA i IgM gamapatije su bile redom oko 3, 4 i 5 puta učestalije u odnosu na adultne bolesnike i izgleda da su zavisile od težine bolesti [99].

U našoj studiji, monoklonski protein je detektovan u pet odraslih bolesnika (18,5%), uzrasta 34 – 66 godina (srednja vrednost 49 godina). Navedeni bolesnici se nisu razlikovali od ispitanika sa odsustvom monoklonskog proteina, u odnosu na uzrast, pol, težinu bolesti (SSI), prisustvo ili odsustvo enzimske supstitucije, nivo hitotriozidaze, feritina, niti prisustvo ili odsustvo slezine. Na osnovu našeg uzorka ispitanika, izgleda da prisustvo monoklonske gamapatije predstavlja fenomen nezavisan od težine bolesti i od primene supstitucione terapije. Struktura M-proteina u našoj seriji je bila veoma raznolika: dva bolesnika su imala IgG paraprotein, jedan bolesnika IgG λ , a jedan IgA κ protein, dok je jedan bolesnik imao kombinaciju klonskih IgA κ i IgG λ lanaca. Nije poznato da li specifična terapija za GB utiče na pojavu neoplazije. Međutim, dokazano je da supstituciona terapija snižava nivo patološki povišenih citokina i imunoglobulina [203]. Efekti EST na MGUS su kontroverzni [204]. Nakon što dođe do razvoja klonalne proliferacije B ćelija, verovatno je da se proces ne može zaustaviti specifičnom terapijom GB. U jednoj grupi bolesnika iz Holandije, nijedan bolesnik nije razvio MGUS tokom EST, dok su dva bolesnika na terapiji progredirali iz stanja MGUS u mulltipli mijelom [203]. Međutim, postoji verovatnoća da EST ili terapija redukcije supstrata mogu igrati ulogu u smanjenju incidencije neoplazije kod bolesnika obolelih od GB, putem amelioracije celularno-citokinskog okruženja koji pogoduje razvoju neoplastičnog procesa, ali i smanjenjem potrebe za splenektomijom kod ovih bolesnika.

Povećana koncentracija neke od klasa imunoglobulina je nađena u devet bolesnika (33,3%). Poliklonalna hipergamaglobulinemija se javlja u oko 14 – 41% odraslih bolesnika sa GB već na u momentu postavljanja dijagnoze [205]. Naši bolesnici sa hipergamaglobulinemijom su imali značajno kraće trajanje terapije ($p < 0,05$) (Grafikon 2) i značajno višu inicijalnu vrednost feritina ($p < 0,01$) (Grafikon 1) u odnosu na bolesnike bez hipergamaglobulinemije. Nije bilo razlike između ove dve grupe bolesnika u odnosu na uzrast, pol, SSI, prisustvo ili odsustvo slezine ni aktivnost hitotriozidaze. Svih devet bolesnika su imali povišen IgG, dok je jedan od njih imao i povećanje koncentracije IgA u serumu. Bolesnici koji su bili kraće na specifičnoj terapiji ili nisu uopšte primali terapiju su

značajno češće imali hipergamaglobulinemiju u našoj seriji. To je u skladu sa podacima u literaturi gde se navodi da EST sprečava nastanak odnosno smanjuje postojeću hipergamaglobulinemiju što je dokazano i kod pedijatrijskih i kod adultnih bolesnika [99, 202]. Što se tiče izraženije hipergamaglobulinemije u bolesnika sa inicijalno višim vrednostima feritina, može se pretpostaviti da je težina manifestovane bolesti bila veća jer je feritin jedan od biomarkera ukupnog opterećenja bolešću. To jest, verovatno je da teža bolest izaziva veću stimulaciju imunskog sistema. Faktori koji imaju veze sa primarnim genskim defektom, a koji dovode do povećanog nakupljanja glukozil-ceramida ili povećane proteazomalne degradacije mutiranih varijanti glukocerebrozidaze, izgleda da imaju veze i sa neoplazijom i sa gore opisanom imunskom disregulacijom u GB [199], a još je i davnih 80-ih XX veka postavljena hipoteza da hronična stimulacija imunskog sistema dovodi do hipergamaglobulinemije [206].

Jedna atraktivna hipoteza uključuje bioaktivne lipide ceramid i sfingozin-1-fosfat (S1P), koji potiču iz glukozilceramida i glukozilsfingozina. Ceramid indukuje apoptozu, dok S1P utiče na razvoj, rast i preživljavanje ćelija, inflamaciju, angiogenezu i onkogenezu. Narušen odnos između ovih bioaktivnih lipida bi mogao da dovede do povećane incidencije disregulacije humoralnog imuniteta i pojave B ćelijskih neoplazmi kod GB [207, 208]. Takođe je dokazan uticaj sfingolipida na indukciju tipa II NK(T) ćelija što dovodi do stimulacije germinativnih B ćelija, hipergamaglobulinemije i pojave antisfingolipidnih antitela [209].

Kao što je već rečeno, patofiziologija neoplastične transformacije u GB nije dovoljno shvaćena. Barem dva tipa mehanizama mogu biti u igri, oba povezana sa deficitom glukocerebrozidaze i posledičnim defektom katabolizma tj. sa akumulacijom glukozilceramida i/ili njegovog deacilovanog proizvoda, glukozilsfingozina ili lizo-glukozilceramida (LGL1) [210]. Najčešća hipoteza, o čemu je već bilo reči, smatra da je izmenjena celularna i citokinska mikrookolina u GB odgovorna za tumorigenezu: povišen nivo nekih citokina i hemokina, aktivisani makrofagi, poremećen ćelijski odgovor T limfocita i redukcija NK ćelija [211, 212]. Druga hipoteza razmatra mogućnost da su inicijalni koraci prema defektu katabolizma potekli ne iz okoline, već iz same (buduće) maligne ćelije. Olakšavanje nastanka malignih tumora kod GB bi mogla da bude povezana

sa poremećajem metabolizma sfingolipida u malignim ćelijama, usled akumulacije glukozilceramida (ili glukozilsfingozina) ili smanjenja količine ceramida, čime nastaju pogubne promene u ravnoteži između proliferacije i antiproliferacije [210].

Nedavno je ispitan mišji model GB sa dugotrajnim razvojem tumora porekla B ćelija [213]. Zanimljivo je da su miševi sa velikim tumorima imali manji stepen akumulacije glukozilceramida i glukozilsfingozina u odnosu na miševe sa malim tumorima. U ovom modelu GB, monoklonski protein je nestao u miševa lečenih eliglustatom, a uočeno je i upadljivo smanjenje limfoproliferacije, bez pojave plazmocitoma ili limfoma [214]. U novijoj studiji o monoklonskoj gamapatiji u GB, pokazano je da je u 17 od 20 bolesnika sa GB i u svih šest obolelih miševa, klonalni imunoglobulin bio specifičan za glukozilsfingozin. Obzirom da mijelomske plazma ćelije pokazuju dokaz klonske selekcije vođene antigenom, ispitana je reaktivnost imunoglobulina na LGL1 i lizofosfatidilholin. U 33% sporadičnih monoklonskih gamapatija, klonalni imunoglobulin je bio specifičan za ova dva antigena. Stoga je moguće da produžena ekspozicija imunskog sistema visokim koncentracijama LGL1 i lizofosfatidilholina favorizuje razvoj gamapatije i multiplog mijeloma [215]. Ovo zapažanje sugerise da bi LGL1 mogao da bude relevantan prediktivni biomarker i da ga kao takvog još treba proučavati. Štaviše, terapija gore navedenih miševa eliglustatom je dovela do smanjenja klonalnih imunoglobulina. Glukozilsfingozin možda deluje kao posrednik u aktivaciji B ćelija u GB i zaista bi mogao da predstavlja antigenski okidač za razvoj monoklonske gamapatije udružene sa GB. Ovi novi podaci iz literature dodeljuju glukozilsfingozinu ključnu ulogu u razvoju mijeloma i limfoma u GB [215].

Genski lokusi za imunoglobuline (Ig) sadrže veliki broj različitih V (variable), D (diversity) i J (joining) genskih segmenata, koji su podložni procesu rearanžiranja tokom ranih faza limfoidne diferencijacije [216, 217]. V-D-J rearanžmani se odigravaju posredstvom enzimskog kompleksa rekombinaze u kojem ključnu ulogu imaju proteini RAG1 i RAG 2, prepoznajući i isecajući molekule DNK na određenim mestima koja se nazivaju rekombinacione signalne sekvence (RSS). Proces rearanžiranja obično započinje D-J rearanžmanom nakon čega sledi V-D-J preuređivanje genskih segmenata, i to u slučaju gena za teški lanac imunoglobulina (IgH), kao i za beta i delta subjedinice TCR. Drugačiji

redosled preuređivanja (direktan V-J rearanžman) se javlja u genima za lake lance Ig (Ig κ i Ig λ) kao i kod alfa i gama subjedinica TCR.

Genski rearanžmani Ig i TCR tokom rane limfoidne diferencijacije obično slede hijerarhijski redosled. Tokom B-ćelijske diferencijacije, prvo se rearanžiraju geni za IgH, zatim Ig κ , dovodeći do IgH/ κ ekspresije ili Ig λ ukoliko dođe do prethodne mono- ili bialelske delecije Ig κ gena, što rezultuje IgH/ λ fenotipom [158]. Tokom diferencijacije T-ćelija, prvo se rearanžiraju geni za delta subjedinicu TCR, potom za gama subjedinicu što dovodi do ekspresije TCR $\gamma\delta$ receptora, ili sledi dalji rearanžman beta subjedinice i delecije delta subjedinice sa posledičnim rearanžmanom alfa subjedinice, što kao krajnji rezultat ima ekspresiju TCR $\alpha\beta$ fenotipa. Šabloni rearanžiranja gena za Ig i TCR u limfoidnim malignitetima obično prate gore navedenu hijerarhijsku šemu, ali je moguć i neuobičajen redosled preuređivanja, posebno kod akutne limfoblastne leukemije [218].

Veliki broj različitih kombinacija V, D i J genskih segmenata čini tzv. kombinatorni repertoar koga čine oko 2.000.000 različitih Ig molekula, oko 3.000.000 TCR $\alpha\beta$ molekula i oko 5.000 TCR $\gamma\delta$ molekula. Delecijama i nasumičnim insercijama nukleotida na spojevima između V, D i J segmenata, još više se povećava ukupni repertoar Ig i TCR molekula, na više od 10^{12} molekularnih formi, značajno doprinoseći antigenskoj diversifikaciji [158]. Zreli B-limfociti još više proširuju svoj antigenski repertoar, po prepoznavanju antigena u germinativnim centrima limfoidnih organa, putem procesa somatske hipermutacije. Ovim procesom, u egzonomima gena za lake i teške lance Ig, nastaju nove mutacije pojedinačnih nukleotida. Zahvaljujući ovom procesu, somatski mutirani Ig geni se mogu detektovati u zrelih B-ćelijskim malignitetima porekla germinativnog centra ili posle germinativnog centra [219].

Funkcionalno rearanžirani Ig i TCR geni se iskazuju na membrani kao Ig, TCR $\alpha\beta$ i TCR $\gamma\delta$ molekuli. Na osnovu koncepta da je samo jedan tip Ig ili TCR molekula ekspimiran na jednom limfocitu ili jednom limfoidnom klonu, klonalno rearanžirani geni zrelih limfoidnih maligniteta bi se mogli otkriti na nivou proteina, nekom od antigen-antitelo reakcija npr. protočnom citometrijom [158]. Od molekularno genetskih metoda za detekciju rearanžmana, razvijene su starija, Southern blot metoda i novija metoda zasnovana na reakciji lančanog umnožavanja (PCR). PCR metoda za detekciju genskih

rearanžmana ima prednosti u odnosu na metode zasnovane na površinskoj ekspresiji proteina i u odnosu na Southern blot tehniku. Prednosti su: brzina, mala količina potrebne DNK i relativno dobra senzitivnost koja omogućava obradu uzoraka manjeg ili slabijeg kvaliteta kao što su biopsiji dobijeni iglenom biopsijom ili parafinski blokovi tkiva fiksirani formaldehidom.

Detekcija klonalnosti ne podrazumeva uvek prisustvo maligniteta. Neke klinički benigne proliferacije imaju klonalno poreklo, kao što su CD8⁺ (ređe CD4⁺) T-limfocitoza, benigne monoklonske gamapatije, inicijalna faza limfoproliferativnog poremećaja uzrokovanog Epstein-Barr virusom kod imunodeficientnih bolesnika i benigne kutane T-ćelijske limfoproliferacije kao što je limfomatoidna papuloza [158].

Važna uloga makrofaga u patogenezi Gošeeve bolesti i radovi u literaturi koji govore o disfunkciji B limfocita sugerišu da bi aktivacija imunskog sistema mogla da doprinese poremećajima limfoidnih ćelija. Povišene koncentracije proinflatornih citokina, posebno IL-6 u krvi pacijenata sa Gošeevom bolešću, bi mogle da korelišu sa klonalnom ekspanzijom B ćelija [220]. IL-6 je takođe jedan od najvažnijih citokina u procesima proliferacije i preživljavanja mijelomskih ćelija [221]. Biološko ponašanje ćelija mijeloma nije isključivo određeno njihovim genomom, već je i pod uticajem dvosmernih ćelijskih odnosa sa elementima koštane srži koja predstavlja pogodnu mikrookolinu za razvoj i preživljavanje ovih ćelija koje indukuju resorpciju kosti aktivacijom osteoklasta [221]. U Gošeevoj bolesti, lezije skeleta takođe predstavljaju odraz neravnoteže u ovom sistemu regulacije i integralni su deo samog toka bolesti. Dakle, povećana učestalost MM bi mogla da predstavlja odraz međupovezanosti prirodnog toka Gošeeve bolesti i još uvek nepoznatih genetskih faktora rizika koji dovode do razvoja gamapatije kod nekih bolesnika. Teškoća da se tačno odredi genetska i patogenetska veza među navedenim činiocima odražava kompleksnost ovog, naizgled jednostavnog autozomno recesivnog poremećaja.

U ispitivanoj grupi bolesnika, klonalni rearanžman IGH gena je otkriven u značajnom procentu ispitanika (8/27 – 29,6%), dok je pet od navedenih osam bolesnika imalo i detektabilan monoklonski protein u serumu. Time preostaju tri bolesnika sa IGH rearanžmanom kao jedinim markerom klonalne proliferacije limfocita. Takođe, među ranije navedenih devet bolesnika sa hipergamaglobulinemijom, dva bolesnika su imali i klonalni

rearanžman IGH, kod jednog sa, a kod jednog bez detektabilnog monoklonalnog proteina u serumu. Kod 17/27 bolesnika (63%) postojali su podaci o praćenju klonske proliferacije, sa prosečnim vremenom praćenja od 5 godina. Među njima je bilo pet bolesnika koji su imali prethodni klonalni rearanžman IGH gena. Klonalni rearanžman je ostao isti u četiri bolesnika, međutim, u jednog bolesnika je nestao, u toku perioda praćenja. U preostalim 12/17 bolesnika IGH rearanžman nije bio detektabilan ni u jednom momentu.

U prethodnoj studiji grupe naših ustanova, analizirali smo sedmoro dece i 20 odraslih bolesnika sa Goševom bolešću [222]. U 11/27 bolesnika (oko 40%) uočeno je prisustvo klonalnosti B ćelija posebno u bolesnicima više uzrasne grupe. Među njima, petoro je imalo rearanžman IGH gena kako jedini marker klonalnosti B limfocita. Ovo bi moglo da se objasni poznatom činjenicom da nisu svi rearanžmani IGH gena funkcionalni i ne dovode do produkcije imunoglobulinskih lanaca. Te smo tada kao mogući zaključak naveli da bi klonalnost B ćelija mogla potencijalno da bude bolji marker od monoklonskog proteina seruma, tokom praćenja bolesnika pod rizikom za razvoj MM. Osim toga, multipli mijelom može nastati i *de novo* bez prethodne pojave MGUS [223].

Većina malignih tumora zahteva prethodnu klonalnu ekspanziju, međutim nisu svi klonovi maligni [224]. Primeri klonalnih poremećaja koji nisu maligne neoplazme su mijelodisplastični sindromi, hronična oboljenja T i NK granularnih limfocita, mijelofibroza, monoklonske gamopatije, monoklonska B ćelijska limfocitoza, mastocitoza i paroksizmalna noćna hemoglobinurija. Neki od molekularnih i imunopatogenetskih mehanizama klonskih poremećaja mogu da se preklapaju sa poremećajim u malignoj neoplaziji, međutim nije jasno kako i u kom stepenu klonski poremećaj progredira u malignu neoplazmu, kada ta dva procesa formiraju jedinstveni patološki kontinuum. Poznato je da su neki od ovih klonova samoograničavajući, a neki progrediraju u patološka stanja kao što su neoplazme imunskih ćelija. Sa druge strane, postoji i veza između fiziološke i nefiziološke nemaligne stimulacije imunskog sistema koja formira osnovu za klonalnu selekciju i proliferaciju u stanjima i procesima kao što su stečena imunost, vakcinacija ili autoimunska oboljenja [224]. U našoj prethodnoj studiji, uočena je i visoka incidencija antinuklearnih i antikardiolipinskih antitela u bolesnika sa GB, bez kliničkih manifestacija, što je verovatno

ilustracija fenomena da hronična stimulacija antigenom (nerazgrađenim lipidnim supstratom) dovodi do nespecifične produkcije autoantitela [222].

Multipli mijelom se odlikuje genomskom nestabilnošću koja je predstavljena i strukturnim i numeričkim hromozomskim aberacijama [225]. Međutim, ne postoji jedinstvena patogena mutacija koja bi bila odgovorna za progresiju iz MGUS u MM koja se viđa sa učestalošću od 1% godišnje [223]. Analiza VH genske sekvence kod multiplog mijeloma je u skladu sa poreklom klona iz ćelija postgerminativnog centra bez postojanja dokaza o prisustvu hipersomatskih mutacija [226]. S druge strane, ćelije pacijenata sa MGUS su pokazivale i dalje prisustvo procesa somatske hipermutacije koji se očigledno gubi tokom progresije u MM. Poreklo MGUS u Gošeovoj bolesti je verovatno u vezi sa hroničnom stimulacijom antigenom koja uzrokovana produženom ekspozicijom nerazgrađenom glukocerebrozidu. Ćelije MM uz to, ekspimiraju čitav spektar „toll-like“ receptora koji omogućavaju prepoznavanje molekulskih obrazaca patogena [187]. Ligandi specifični za TLR indukuju proliferaciju i preživljavanje MM ćelija. Slično tome, plazma ćelije kod MGUS prekomerno ekspimiraju alfa lanac IL-6 receptora [188]. Stoga bi disregulisana ekspresija TLR i/ili prekomerna ekspresija IL-6 receptora na plazma ćelijama mogla da natera na preteranu reakciju na infektivne agense time omogućavajući IL-6 zavisne autokrine okidače za proliferaciju plazma ćelija [201]. Sličan mehanizam bi mogao biti prisutan i kod Gošeove bolesti obzirom na postojanje hronične stimulacije antigenom, a posebno u svetlu gore navedene, nedavno postavljene hipoteze o stimulaciji imunskog sistema i njenom dejstvu na B ćelije posredstvom glukozilsfingozina i njegovog derivata LGL1.

Daljom analizom klonalnosti u naših bolesnika sa pozitivnim klonalnim rearanžmanom IGH, pokazali smo da je klonalnost detektabilna samo u jednog bolesnika koji se prezentovao očiglednim biklonalnim rearanžmanom u prvoj rundi IGHV-IGHD-IGHJ analize. Detektovani rearanžman je dalje analiziran sekvenciranjem i nađeno je da je u pitanju nemutirani rearanžman, čiji je sastav IGHV1-2*04, IGHD3-3*02 i IGHJ4*02. Međutim kada je analiza ponovljena u istom uzorku, dobijen je drugačiji rearanžman (IGHV1-69*01, IGHD3-3*01, IGHJ4*02). Međutim, mutacioni status sekvenciranog rearanžmana treba uzeti sa rezervom jer su korišćeni FR1 prajmeri koji amplifikuju samo

deo rearanžmana. Takođe, korišćeni metod za rearanžman IGHV može da otkrije klonove kada je broj B limfocita jednog klona veći od $5 \times 10^9/L$ što je uobičajeno kod bolesnika sa hroničnom limfocitnom leukemijom prilikom prezentacije bolesti ili tokom razvoja recidiva, čime se dobija dovoljan broj ćelija za pouzdanu analizu mutacionog statusa. Moguće je da su svi ispitanici izuzev jednog imali niži broj klonalnih ćelija što je onemogućilo analizu mutacionog statusa iako smo koristili visoko senzitivni metod „nested PCR“. Nestanak klonalnog rearanžmana u jednog bolesnika nakon perioda praćenja kao i niska stopa detekcije klonalnosti se možda može objasniti činjenicom da klonovi i subklonovi u Gošeovoj bolesti dobijaju na veličini i brojnosti tokom hronične imunske stimulacije supstratom, ali verovatno mogu i da se smanje ili izgube prirodnim tokom bolesti ili pod dejstvom terapijske intervencije. Ukoliko ovi tranzitorni klonovi prežive i perzistiraju dovoljno dugo da bi mogli da proliferišu, mi bismo mogli da ih pratimo kroz vreme jer neki od njih možda predstavlja premaligni klon. Međutim, mora se naglasiti činjenica da nijedan od naših bolesnika nije razvio multipli mijelom tokom perioda praćenja. Može se zaključiti da uprkos relativno ranoj pojavi klonalne ekspanzije u toku bolesti, barem sudeći prema IGH rearanžmanu, detektovani klonovi možda predstavljaju tranzitorne klonove. Pažljivo kliničko praćenje ovih bolesnika je obavezno uključujući i monitoring limfoidnih neoplazmi, a posebno multiplog mijeloma.

Obzirom da je Gošeova bolest fenotipski veoma varijabilna, jasno je da korelacija između genotipa (tipa mutacije gena za glukocerebrozidazu) i fenotipske ekspresije nije savršen metod za objašnjavanje različitih kliničkih manifestacija i bioloških pojava bolesti. Bolesnici sa istim genotipom, pa čak i identični blizanci pokazuju ogromnu kliničku varijabilnost [127], te je stoga verovatno da epigenetski faktori utiču na manifestacije oboljenja. Nekoliko kliničkih fenomena u Gošeovoj bolesti još uvek nisu dovoljno rasvetljeni npr. pojava hipermetaboličkog stanja, gubitak u telesnoj težini [227], produkcija autoantitela [228] kao i pojava monoklonskih gamopatija i multiplog mijeloma o kojoj će biti reči kasnije. Mnogi od ovih fenomena se mogu pripisati dejstvu citokina porekla makrofaga. Iz navedenog razloga, istraživači su u nekolicini studija posvetili pažnju ispitivanju citokina u bolesnika sa Gošeovom bolešću.

U studiji iz 1997. godine, autori su opisali da su u krvi povišene koncentracije makrofagnog faktora stimulacije kolonija (M-CSF), IL-8 kao i solubilnog CD14 molekula koji predstavlja marker aktivacije makrofaga i monocita [133]. Štaviše, koncentracije navedenih citokina su korelisale sa težinom bolesti. Verovatno je da nagomilavanje nerazgrađenog lipidnog supstrata direktno aktivira makrofage koji zatim produkuju navedene citokine. Korelacija sa težinom kliničke slike bi se mogla objasniti činjenicom da teža klinička slika nastaje kao posledica veće akumulacije supstrata, što dovodi do jače aktivacije ili aktivacije većeg broja makrofaga i sledstveno veće produkcije makrofagnih citokina. sCD14 je prisutan i u drugim bolestima praćenim aktivacijom makrofaga kao što su sepsa, maligniteti i sarkoidoza [229]. I sCD14 i IL-8 su jače eksprimirani tokom intenzivne fagocitoze [230] te je moguće da upravo ekstremna fagocitna aktivnost makrofaga u Gošeovoj bolesti predstavlja stimulus za produkciju ovih citokina. Na osnovu podataka da M-CSF ubrzava resorpciju koštanog tkiva [231], postoji mogućnost da ovaj citokin doprinosi koštanim manifestacijama Gošeove bolesti, pre svega pojavi osteopenije i osteolize. S druge strane, IL-8 se značajno više proizvodi od strane mononuklearnih ćelija tokom aktivacije koagulacionog sistema [232], što je u skladu sa rezultatima studije o aktivaciji koagulacionog procesa opisanoj u Gošeovoj bolesti [56].

U studiji Alena i sar., autori su opisali povišenje koncentracija IL-6 i IL-10 u krvi bolesnika sa Gošeovom bolešću [220]. Kao što je već pomenuto, IL-6 predstavlja parakrini regulator rasta ćelija multiplog mijeloma, a koncentracija IL-6 je često povišena kod bolesnika sa MM [233]. Pored toga, IL-6 je potentan stimulator resorpcije kosti [234] i sinteze reaktanata akutne faze u jetri [235]. Sve ovo govori u prilog povezanosti ovog interleukina sa karakterističnim nalazima Gošeove bolesti: perzistencijom reaktanata akutne faze, poremećajima skeleta i imunoglobulina, kao i mogućim razvojem multiplog mijeloma. Nešto je manje jasna potencijalna uloga IL-10 u patogenezi Gošeove bolesti. Međutim, činjenica da IL-10 inhibira sekretornu aktivnost osteoblasta i mineralizaciju skeleta [236], može dovesti ovaj citokin u vezu sa skeletnim lezijama u ovih bolesnika.

U studiji Baraka i sar. iz 1999. godine opisano je povišenje serumske koncentracije IL-1 β , antagonista receptora za IL-1 (IL-1Ra), IL-6, TNF i solubilnog IL-2 receptora (sIL-2R) [132]. Autori ističu hipotezu da bi se navedeni citokini mogli dovesti u vezu sa

skeletnim manifestacijama, poremećajem hemotaksije neutrofila i hipergamaglobulinemijom u Gošeovoj bolesti.

Uvidom u rezultate navedenih studija, jasno je da kod pacijenata sa Gošeovom bolešću makrofagi aktivisani supstratom proizvode različite citokine. Neki od njih imaju proinflamatorno dejstvo (IL-6, IL-8, TNF- α), a neki antiinflamatorno (IL-1Ra, IL-10). Odnos navedenih citokina nije jasno definisan, ali je očigledno da favorizuje postojanje proinflamatornog stanja prisutnog u bolesnika, obzirom na hronično perzistiranje reaktanata akutne faze kod pacijenata sa Gošeovom bolešću.

Polimorfizmi pojedinačnih nukleotida (*single nucleotide polymorphisms* - SNP) unutar DNK sekvence mogu da imaju različite posledice: supstituciju aminokiselina u primarnoj strukturi proteina sa menjanjem njegove funkcije; izmenu strukture pojačivačkih sekvenci tokom „splajsinga“ [237]; uticaj na stabilnost informacione RNK [238, 239]; promenu mesta vezivanja transkripcionih faktora i tako menjaju efikasnost pojačivačkih ili represornih elemenata [240]; promenu strukture inicijacionih kodona što nishodno reguliše transkript [241].

Faktor tumorske nekroze (TNF) je citokin koji se proizvodi u okviru procesa odgovora organizma na infekciju. Ovaj citokin je uključen u mnogobrojne inflamatorne i imunske odgovore i igra važnu ulogu u patogenezi mnogih autoimunskih i infektivnih oboljenja.

TNF gen je lociran na hromozomu 6 (citogenetska lokacija 6p21.33) u regionu klase III glavnog kompleksa histokompatibilnosti (GHK) bočno se graničeći sa genima za limfotoksin a i b [242]. Regulacija *TNF* gena je strogo regulisana na nivou transkripcije [243]. Varijacije u DNK sekvenci u genima koji kodiraju citokinske molekule mogu da utiču na osetljivost organizma na infekcije i udružene su sa velikim brojem složenih oboljenja kod ljudi. Tako je i polimorfizam u 5' regulatornom regionu gena doveden u korelaciju sa mnogim infektivnim i inflamatornim bolestima [244-247].

Udruženost *TNF* polimorfizama rs1799964 i rs1800630 sa uznapredovalim stadijumom endometriozе je publikovana u studiji koja je potekla iz populacije u Koreji. Polimorfizam rs1800750 utiče na vezivanje molekula TF OCT-1 i time menja interakciju između DNK i proteina [248]. Polimorfizam rs361525 je doveden u vezu sa sindromom

insulinske rezistencije i gojaznošću [249], a rs1800629 sa raznim inflamatornim i autoimunskim bolestima [250-255]. Opisane su takođe i korelacije među polimorfizmima rs1799964, rs1799724, rs1800630 i imunski posredovanim bolestima kao što su reumatoidni artritis i Kronova bolest [256, 257]. Na osnovu ograničenih dokaza, smatra se da su varijante rs1800629 i rs361525 uključene u regulaciju produkcije drugih citokina [258]. Takođe, polimorfizam rs1799964 je udružen sa ekstraintestinalnim manifestacijama Kronove bolesti uključujući uveitis, eritema nodozum i artropatiju [259].

U studiji Altarescu i sar. iz 2005. godine, određivani su koncentracija TNF u serumu kao i genotip -308 G→A polimorfizma (rs1800629) u 17 bolesnika sa tipom I Gošeove bolesti [260]. U 8/17 bolesnika (47%) nađen je homozigotni fenotip (A/A) za koga je pokazana značajna povezanost sa težinom bolesti i produkcijom TNF. Naime, ovaj genotip je bio povezan sa nižom koncentracijom ovog proinflamatornog citokina i sa lakšom formom bolesti u ispitanika. Autori su zaključili da bi mogla da postoji veza između genetske varijabilnosti u ekspresiji TNF i fenotipske ekspresije GB, ali da su za tu tvrdnju potrebne veće studije. U našoj studiji nije nađena veza između navedenih polimorfizama za TNF u odnosu na pol, uzrast, SSI, dužinu trajanja terapije, prisustvo ili odsustvo slezine, aktivnost hitotriozidaze, inicijalnu koncentraciju feritina u serumu, u odnosu na prisustvo ili odsustvo monoklonskog proteina, klonskog rearanžmana IGH odnosno hipergamaglobulinemije.

Vieira i sar. su dokazali da postoji faktor koji inhibira sintezu citokina u ljudi koji je nazvan interleukin-10 (IL-10) [261]. Na osnovu proučavanja cDNK klonova koji kodiraju humani IL-10, otkriveno je da postoji značajna homologija između sekvence DNK i aminokiselina sa otvorenim okvirom čitanja Epštajn-Barovog virusa. Gen *IL10* se nalazi na hromozomu 1, na poziciji 1q32.1.

Poznato je da IL-10 blokira sekvencu događaja u aterosklerozi *in vitro* i *in vivo*, te da može da zaustavi hronični inflamatorni odgovor u već pokrenutom aterosklerotskom procesu [262, 263]. Esposito i sar. su testirali hipotezu da su snižene koncentracije IL-10 udružene sa metaboličkim sindromom kod gojaznih žena. U poređenju sa 50 kontrolnih žena koje nisu bile gojazne, prevalencija metaboličkog sindroma je bila viša u gojaznih ispitanica. Gojazne žene su imale više vrednosti IL-6, C-reaktivnog proteina i IL-10 u

cirkulaciji u poređenju sa negojaznim kontrolnim ispitanicama. I kod jednih i kod drugih, nivo IL-10 je bio značajno niži u osoba sa prisutnim metaboličkim sindromom. Rezultati studije su, dakle, pokazali da je koncentracija antiinflamatornog citokina IL-10 značajno viša u serumu gojaznih žena, a da je niska koncentracija ovog citokina udružena sa pojavom metaboličkog sindroma [264].

Ma i sar. su analizirali razvoj B-ćelija u 14 bolesnika sa X-vezanim limfoproliferativnim sindromom i otkrili su postojanje zastoja u diferencijaciji koji bi se poboljšao dodavanjem egzogenog IL-10. Zaključeno je da nedovoljna produkcija IL-10 može doprineti hipogamaglobulinemiji kod ovog poremećaja [265].

Porast koncentracije IL-10 je primećen u staklastom telu bolesnika sa primarnim intraokularnim limfomom [266]. Ova bolest ima lošu prognozu i često se prezentuje kao posteriorni uveitis. Postavljanje dijagnoze obično kasni nekoliko meseci ili godina po nastupu očnih simptoma. Utvrđeno je da merenje koncentracije IL10 u očnoj vodici dobijenoj paracentezom prednje očne komore predstavlja dobar skrining test koji može da značajno skрати kašnjenje u postavljanju dijagnoze [267].

Grove i sar. su ispitivali potencijalnu ulogu polimorfizma u genu *IL10* u patogenezi alkoholne bolesti jetre. Pedeset posto ispitanika sa alkoholnom bolešću jetre su imali A alel na poziciji -627, i poređenju sa 33% zdravih kontrolnih ispitanika ($p < 0,01$) i sa 34% alkoholičara bez alkoholne bolesti jetre ($p = 0.017$). Autori su zaključili da je alel -627A udružen sa povećanim rizikom pojave alkoholne bolesti jetre. Ovo je konzistentno sa drugim publikacijama u kojima je navedeno da je -627A alel udružen sa sniženjem ekspresije *IL10*, što samo po sebi favorizuje inflamatorne, imunski posredovane i profibrotičke mehanizme ozlede tkiva [268].

Visoka produkcija IL-10 je udružena sa autoimunskim oboljenjima kao što je reumatoidni artritis i sistemski eritemski lupus (SLE). Iako je proizvodnja IL10 konkordantna kod monozigotnih blizanaca [269], sam promotor *IL10* gena je polimorfan što može da se odrazi na razlike u produkciji ovog citokina. Gibson i sar. su otkrili sedam novih SNP u distalnom regionu promotora *IL10*, a određeni haplotipovi su značajno utiču na veću ili manju produkciju IL-10 i pokazuju značajnu udruženost sa pojavom SLE u afro-amerikanaca [270].

Osobe koje imaju alel -592A na 5' kraju promotora *IL10*, su pod većim rizikom od infekcije virusom HIV-1 i značajno brže progresije u AIDS, u poređenju sa homozigotima sa alternativnim genotipom -592C/C. Oko 25-30% ljudi sa čija je progresija HIV infekcije u AIDS dugo odložena (10 ili više godina) imaju -592C/C genotip u promotoru. Takođe, postoje studije koje su pokazale da je -592A alel povezan sa smanjenjem produkcije IL-10 i da bi progresija u AIDS najverovatnije mogla biti usporena imunoterapijskim strategijama koje oponašaju ili pojačavaju prirodnu inhibitornu ulogu IL-10 [271, 272].

Polimorfizmi *IL10* takođe igraju ulogu i u mnogim drugim imunopatogenetskim procesima u patogenezi oboljenja. SNP gena *IL10* kao i time definisana sposobnost produkcije citokina mogu doprineti razvoju skvamocelularnog karcinoma kože nakon transplantacije bubrega [273], mogu doprineti naslednoj komponenti osetljivosti individue na psorijazu [274], mogu ubrzati progresiju hronične infekcije hepatitis B virusom, posebno u smeru hepatocelularnog karcinoma [275]. Takođe, mogu doprineti sindromu nagle smrti odojčeta (najverovatnije mehanizmom zakasnele inicijacije proizvodnje protektivnih antitela ili sniženom sposobnošću inhibicije proizvodnje inflamatornih citokina) [276], razvoju strikturirajuće forme Kronove bolesti [277], te preosetljivosti individue na lepru, kao što je slučaj u populaciji Brazila [278] i Indije [279].

IL-10 je moćan supresor inflamatornih citokina kao što su IL-1, IL-6, IL-12, TNF i IFN- γ i inhibira kostimulatornu aktivnost makrofaga prilikom aktivacije T ćelija i NK ćelija. Jedan od ispitivanih polimorfizama u našoj seriji (*IL10* rs1800896) je doveden u vezu sa egzacerbacijama alergijskih manifestacija i astme, nakon ekspozicije grinjama [280]. Homozigotni genotip jednog alela u navedenom polimorfizmu i u još dva polimorfizma gena *IL10* je bio udružen sa većim rizikom od pojave alergije i astme, 3 – 39 puta. Takođe je prisustvo A alela istog ovog polimorfizma dovedeno u vezu sa većim rizikom od razvoja karcinoma prostate u 258 bolesnika [281]. Navedeni genotip smanjuje produkciju, a samim tim i antiinflamatornu aktivnost IL-10. Drugi polimorfizam ispitivan u našoj studiji, *IL10* rs1800871 je doveden u vezu sa smanjenim rizikom od pojave endometrioze za oko dva puta, među bolesnicama koje su nosile C alel u poređenju sa uobičajenim TT genotipom [282], među ukupno 196 pacijentkinja u Kini. Veza sa pedijatrijskom formom Kronove bolesti je takođe nađena kod nosilaca C/T genotipa ovog

polimorfizma, u smislu lokacije i ekstenzivnosti bolesti, kao i toka bolesti [283]. U još jednoj studiji, koja je analizirala oko 500 trudnoća, nađena je tri puta veća stopa spontanog prekida trudnoće u pacijentkinja koje su nosile T alel [284]. Takođe je nađena veza između ovog polimorfizma i obolelih od Behčetove bolesti, to jest T haplotip je bio prisutan u više opisanih grupa bolesnika u odnosu na zdrave kontrole [285].

U našoj studiji je prvi put analizirana veza između *IL10* polimorfizama i fenotipa Gošeoove bolesti. Nije nađena veza između polimorfizma *IL10* rs1800896 sa ispitivanim karakteristikama bolesnika: pol, uzrast, SSI, dužinu trajanja terapije, prisustvo ili odsustvo slezine, aktivnost hitotriozidaze, inicijalnu koncentraciju feritina u serumu, u odnosu na prisustvo ili odsustvo monoklonskog proteina, klonskog rearanžmana IGH odnosno hipergamaglobulinemije. Sa druge strane, među bolesnicima sa C alelom u polimorfizmu *IL10* rs1800871, nađena je statistički značajna veća vrednost inicijalne feritinemije u odnosu na bolesnike nosioce T alela. Moguće je da navedeni haplotip utiče na koncentraciju IL-10, te time direktno snižava njegovu antiinflamatornu aktivnost ili indirektno, putem uticaja ovog citokina na proinflamatorne citokine, pre svega na IL-1, IL-6, IL-12 i TNF. Međutim, u našoj grupi bolesnika, navedeni uticaj nije bio uočen na druge parametre bolesti kao što su SSI, vrednost hitotriozidaze, kao ni na druge ispitivane varijable.

Patofiziologija hiperferitinemije u Gošeovoj bolesti još uvek nije u potpunosti rasvetljena, a predloženi su različiti mehanizmi [286]. Među navedenim mehanizmima dominiraju lizozomalna disfunkcija koja dovodi do povećanja slobodnog gvožđa i reaktivnih kiseoničkih vrsta čime se povećava eksportovanje feritina putem nezavisnim od ferroportina, sa jedne strane i hronična aktivacija Gošeoovih ćelija (M1 makrofaga) sa druge strane, što dovodi do povećane proizvodnje IL-1, IL2, IL-6, IL-8, TNF i IFN- γ , a koji putem IRP1 i IRP2 proteina dovode do hiperferitinemije. Obzirom da većina navedenih citokina stoji pod regulatornim uticajem IL10, može se shvatiti potencijalna uloga polimorfizama ovog citokina na stepen izraženosti feritinemije u bolesnika sa Gošeoovom bolešću.

IL-6 je imunoregulatorni citokin koji na površini ćelije aktivira signalni put koji se sastoji od IL-6, interleukin-6 receptora alfa (IL-6RA) i zajedničkog signalnog receptora

gp130 (interleukin-6 signalni transdjuser – IL-6ST) [287]. Indukcija sinteze IL-6 od strane IL-1 i TNF sugerije da bi IL-6 mogao imati ulogu autokrinog medijatora nekih efekata IL-1 i TNF u procesu inflamacije i reakciji akutne faze, kao i u regulaciji proliferacije ćelija [288]. Kawano i sar. su izneli dokaze da bi konstitutivna ekspresija IL-6 ili njegovog receptora mogla biti odgovorna za nastanak mijeloma [289]. Aberantna produkcija IL-6 od strane neoplastičnih ćelija se pominje kao snažan doprinoseći faktor za rast multiplog mijeloma i drugih B-ćelijskih diskrazija, T-ćelijskog limfoma, karcinoma bubrega i jajnika, kao i Kapoši sarkoma. Promotor gena *IL6* je pod represijom tumor supresorskih gena *RBI* i *TP53* [290].

Padžetova bolest kosti pokazuje povećanje osteoklasta u broju i veličini, sa većim brojem jedara po ćeliji, u odnosu na normalne osteoklaste. Supernatanti ćelijskih kultura koštane srži bolesnika sa Padžetovom bolešću stimulišu nastanak multinuklearnih ćelija nalik osteoklastima u kulturama dobijenim iz normalne koštane srži [291]. Ova aktivnost se barem delimično može pripisati IL-6. Za razliku od normalne koštane srži i krvnog seruma u kome skoro uopšte nema IL-6, uzorci koštane srži i seruma bolesnika sa Padžetovom bolešću sadrže visoke koncentracije ovog citokina.

Studija koja je proučavala uticaj IL-6 u serumu na osteoporozi posle menopauze, je pokazala da je IL-6 prediktor gubitka koštane mase među ženama u postmenopauzi i to najrelevantnije tokom prve decenije posle menopauze [292].

U studiji koja je evaluirala osovину hormon rasta / insulinu sličan faktor rasta (IGF)-1, zajedno sa koncentracijama IGF vezujućih proteina (IGFBP), glukoze, insulina i citokina u krvi 27 dece sa teškim septičkim šokom kao posledicom meningokokne sepse, uočene su značajne razlike u koncentracijama IGF-1, IL-6 i TNF između preživelih bolesnika i bolesnika koji su umrli. Skor rizika od mortaliteta je bio u značajnoj korelaciji sa aktivnošću IGFBP1, IL-6 i TNF. Kod pacijenata koji su preminuli, koncentracije ukupnog i slobodnog IGF-1 su bili značajno sniženi, dok su citokini IL-6 i TNF bili prisutni u visokim koncentracijama [293].

IL-6 se takođe pominje kao ključni mehanizam u imunološkom starenju kod dugotrajne izloženosti ljudi hroničnim stresorima, čime se povećava rizik od prevremene pojave oboljenja vezanih za staro doba [294]. Ovaj citokin je, takođe, važan faktor za

progresiju neeksudativne senilne makularne distrofije [295], neophodan je i dovoljan za indukciju sinteze hepcidina tokom inflamacije dovodeći do tzv. sideropenije u inflamaciji [296], kao i do deficita cinka tokom reakcije odgovora akutne faze usled zapaljenja ili infekcije [297]. Sa druge strane, tzv. mediteranska dijeta smanjuje koncentraciju IL-6 i samim tim smanjuje inflamaciju, što je važan mehanizam u smanjenju rizika od kardiovaskularnih bolesti [298].

IL-6 igra ključnu ulogu u metabolizmu kosti i utiče na mineralnu gustinu skeleta što je utvrđeno analizom vezanih gena za osteopeniju i osteoporozu [299]. Ota i sar. su izložili dodatne dokaze da i varijacija u *IL6* genu može imati veze sa osteoporozom. U 470 isitanika u Japanu, analizom varijanse je pronađena korelacija između prisustva G alela C/G polimorfizma na poziciji -634 i smanjenja mineralne gustine kosti [300]. Kasnije je opisana i jedna varijanta u regionu promotora *IL6* koja pokazuje pozitivnu korelaciju sa vrednostima mineralne gustine kosti, kod žena u premenopauzi [301].

Polimorfizam rs1800795 je prvi put pomenut u literaturi 1998. godine, kada je pokazano da C alel produkuje manje IL-6 u poređenju sa G alelom čime je podržana hipoteza da C alel nosi protektivni genotip protiv sistemske forme juvenilnog idiopatskog artritisa. I zaista, do sada je opisan mali broj bolesnika obolelih od ove bolesti koji su nosioci C alela [302]. Studije ovog polimorfizma otkrivaju i potencijalne povezanosti sa oboljenjima srca, Kapošijevim sarkomom, dijabetesom tip 2, cerebrovaskularnim insultom, gojaznošću, Hočkinovim limfomom, sindromom nagle smrti odojčeta, kao i karcinomima, hipertenzijom, periodontitisom i komplikacijama nakon transplantacije organa. Povezanosti se ne manifestuju samo većim rizikom od pojave bolesti već i načinom progresije bolesti kao i odgovorom na različite terapijske modalitete [303].

Ovo je prva studija ispitivanja polimorfizma gena *IL6* u bolesnika sa Gošeovom bolešću. Nije nađena veza između polimorfizma *IL6* rs1800795 sa ispitivanim karakteristikama bolesnika: pol, uzrast, SSI, dužinu trajanja terapije, prisustvo ili odsustvo slezine, aktivnost hitotriozidaze, inicijalnu koncentraciju feritina u serumu, u odnosu na prisustvo ili odsustvo monoklonskog proteina, klonskog rearanžmana IGH odnosno hipergamaglobulinemije.

Poređenjem učestalosti genotipova i alela između bolesnika i zdravih kontrolnih ispitanika populacije u našoj zemlji, nije uočena statistički značajna razlika ni za jedan od navedenih polimorfizama citokinskih gena.

6. ZAKLJUČCI

1. Klonalnost B limfocita je otkrivena u značajnom procentu ispitanika (29,6%) tj. u 8/27 bolesnika. U tri od navedenih osam bolesnika, klonalnost je otkrivena samo na nivou *IGH* rearanžmana tj. bez pratećeg serumskog monoklonskog proteina, a u dva je otkrivena i hipergamaglobulinemija.
2. Među 17/27 (63%) bolesnika, za koje su postojali podaci o praćenju, u 4 bolesnika je rearanžman i dalje bio detektabilan, dok se u jednog bolesnika rearanžman izgubio nakon perioda praćenja.
3. Svim bolesnicima kojima je *IGH* klonalnost detektovana, urađena je i analiza *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžmana. Ovom analizom, klonalnost je detektovana kod jednog bolesnika koji je tokom perioda praćenja uvek imao detektabilan biklonalni *IGH* rearanžman. Detektovani rearanžman je dodatno analiziran sekvenciranjem, a interpretacija sekvence je pokazala da se radi o dva različita nemutirana *IGH* rearanžmana.
4. Bolesnici sa prisustvom klonskog rearanžmana *IGH* se nisu značajno razlikovali od bolesnika sa negativnim nalazom u odnosu na uzrast, pol, SSI, dužinu trajanja terapije, prisustvo ili odsustvo slezine, aktivnost hitotriozidaze niti inicijalnu koncentraciju feritina u serumu.
5. Bolesnici sa prisustvom monoklonskog proteina se nisu značajno razlikovali od bolesnika sa negativnim nalazom u odnosu na uzrast, pol, SSI, dužinu trajanja terapije, prisustvo ili odsustvo slezine, aktivnost hitotriozidaze niti inicijalnu koncentraciju feritina u serumu.
6. Bolesnici sa hipergamaglobulinemijom su imali značajno kraće trajanje terapije i značajno višu inicijalnu vrednost feritina u odnosu na bolesnike bez hipergamaglobulinemije. Nije bilo razlike između ove dve grupe bolesnika u odnosu na uzrast, pol, SSI, prisustvo ili odsustvo slezine ni aktivnost hitotriozidaze.
7. Uprkos pojavi klonalne ekspanzije u toku bolesti, barem sudeći prema *IGH* rearanžmanu, detektovani klonovi su možda tranzitorni. Pažljivo kliničko praćenje

ovih bolesnika je obavezno uključujući i monitoring limfoidnih neoplazmi, a posebno multiplog mijeloma.

8. Naša studija predstavlja prvo ispitivanje klonalne proliferacije B limfocita među obolelim od Gošeoove bolesti metodom ispitivanja rearanžmana *IGH* gena.
9. Poređenjem učestalosti genotipova i alela između bolesnika i zdravih kontrolnih ispitanika izabranih iz populacije u Srbiji, nije uočena značajna razlika ni za jedan od navedenih polimorfizama citokinskih gena. Ovo je prva studija u kojoj određena učestalost alela za navedene polimorfizme citokinskih gena u bolesnika sa Gošeoovom bolešću u Srbiji.
10. Poređenjem učestalosti alela za polimorfizam *IL10* rs1800871 sa inicijalnom koncentracijom feritina, nađen je značajno veći stepen hiperferitinemije, kod nosilaca C alela, a posebno u grupi bolesnika koji su nosioci homozigotnog CC genotipa. Učestalosti alela za navedeni polimorfizam se nisu razlikovale u odnosu na pol, uzrast, SSI, dužinu trajanja terapije, prisustvo ili odsustvo slezine, aktivnost hitotriozidaze, inicijalnu koncentraciju feritina u serumu, niti u odnosu na prisustvo ili odsustvo monoklonskog proteina, klonskog rearanžmana IGH odnosno hipergamaglobulinemije
11. Poređenjem učestalosti alela za polimorfizme *IL10* rs1800896, *TNF* rs1800629, *TNF* rs361525 i *IL6* rs1800795 u odnosu na pol, uzrast, SSI, dužinu trajanja terapije, prisustvo ili odsustvo slezine, aktivnost hitotriozidaze, inicijalnu koncentraciju feritina u serumu, u odnosu na prisustvo ili odsustvo monoklonskog proteina, klonskog rearanžmana IGH odnosno hipergamaglobulinemije, nije nađena značajna razlika.

7. LITERATURA

1. Gaucher PCE, 1882. **De l'épithélioma primitif de la rate.** *These de Paris.*
2. Aghion H, 1934. **La maladie de Gaucher dans l'enfance.** *These de Paris.*
3. Kattlove HE, Williams JC, Gaynor E, Spivack M, Bradley RM, Brady RO, 1969. **Gaucher cells in chronic myelocytic leukemia: an acquired abnormality.** *Blood* 33, 379-390. [[PubMed](#)]
4. Beutler E, Grabowski, G.A.: **Gaucher disease:** McGraw-Hill; 2003.
5. Pinto R, Caseiro C, Lemos M, Lopes L, Fontes A, Ribeiro H, Pinto E, Silva E, Rocha S, Marcao A *et al*, 2004. **Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal.** *Eur J Hum Genet* 12, 87-92. [[PubMed](#)]
6. Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF, 1999. **Prevalence of lysosomal storage disorders.** *JAMA* 281, 249-254. [[PubMed](#)]
7. Dionisi-Vici C, Rizzo C, Burlina AB, Caruso U, Sabetta G, Uziel G, Abeni D, 2002. **Inborn errors of metabolism in the Italian pediatric population: a national retrospective survey.** *J Pediatr* 140, 321-327. [[PubMed](#)]
8. Poorthuis BJ, Wevers RA, Kleijer WJ, Groener JE, de Jong JG, van Weely S, Niezen-Koning KE, van Diggelen OP, 1999. **The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands.** *Human genetics* 105, 151-156. [[PubMed](#)]
9. Grabowski GA, 2008. **Phenotype, diagnosis, and treatment of Gaucher's disease.** *Lancet* 372, 1263-1271. [[PubMed](#)]
10. Stirnemann J, Vigan M, Hamroun D, Heraoui D, Rossi-Semerano L, Berger MG, Rose C, Camou F, de Roux-Serratrice C, Grosbois B *et al*, 2012. **The French Gaucher's disease registry: clinical characteristics, complications and treatment of 562 patients.** *Orphanet journal of rare diseases* 7, 77. [[PubMed](#)]
11. Svennerholm L, Erikson A, Groth CG, Ringden O, Mansson JE, 1991. **Norrbotnian type of Gaucher disease--clinical, biochemical and molecular biology aspects: successful treatment with bone marrow transplantation.** *Dev Neurosci* 13, 345-351. [[PubMed](#)]
12. Brady RO, Kanfer JN, Bradley RM, Shapiro D, 1966. **Demonstration of a deficiency of glucocerebrosidase in Gaucher's disease.** *The Journal of clinical investigation* 45, 1112-1115. [[PubMed](#)]
13. Schnabel D, Schroder M, Sandhoff K, 1991. **Mutation in the sphingolipid activator protein 2 in a patient with a variant of Gaucher disease.** *FEBS Lett* 284, 57-59. [[PubMed](#)]
14. Barneveld RA, Keijzer W, Tegelaers FP, Ginns EI, Geurts van Kessel A, Brady RO, Barranger JA, Tager JM, Galjaard H, Westerveld A *et al*, 1983. **Assignment of the gene coding for human beta-glucocerebrosidase to the region q21-q31 of chromosome 1 using monoclonal antibodies.** *Human genetics* 64, 227-231. [[PubMed](#)]
15. Sorge J, West C, Westwood B, Beutler E, 1985. **Molecular cloning and nucleotide sequence of human glucocerebrosidase cDNA.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82, 7289-7293. [[PubMed](#)]

16. Hruska KS, LaMarca ME, Scott CR, Sidransky E, 2008. **Gaucher disease: mutation and polymorphism spectrum in the glucocerebrosidase gene (GBA).** *Hum Mutat* 29, 567-583. [[PubMed](#)]
17. Tsuji S, Choudary PV, Martin BM, Stubblefield BK, Mayor JA, Barranger JA, Ginns EI, 1987. **A mutation in the human glucocerebrosidase gene in neuronopathic Gaucher's disease.** *The New England journal of medicine* 316, 570-575. [[PubMed](#)]
18. Tsuji S, Martin BM, Barranger JA, Stubblefield BK, LaMarca ME, Ginns EI, 1988. **Genetic heterogeneity in type 1 Gaucher disease: multiple genotypes in Ashkenazic and non-Ashkenazic individuals.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 2349-2352. [[PubMed](#)]
19. Beutler E, Gelbart T, West C, 1993. **Identification of six new Gaucher disease mutations.** *Genomics* 15, 203-205. [[PubMed](#)]
20. Beutler E, Grabowski, G.A.: **Gaucher disease.** In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*. 8th edn. Edited by Scriver CR, Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. New York: McGraw-Hill; 2001: 3635.
21. Beutler E, Gelbart T, Demina A, Zimran A, LeCoutre P, 1995. **Five new Gaucher disease mutations.** *Blood cells, molecules & diseases* 21, 20-24. [[PubMed](#)]
22. Sidransky E, 2012. **Gaucher disease: insights from a rare Mendelian disorder.** *Discovery medicine* 14, 273-281. [[PubMed](#)]
23. Cox TM, Schofield JP, 1997. **Gaucher's disease: clinical features and natural history.** *Baillieres Clin Haematol* 10, 657-689. [[PubMed](#)]
24. Grabowski GA, Saal HM, Wenstrup RJ, Barton NW, 1996. **Gaucher disease: a prototype for molecular medicine.** *Crit Rev Oncol Hematol* 23, 25-55. [[PubMed](#)]
25. Sidransky E, 2004. **Gaucher disease: complexity in a "simple" disorder.** *Molecular genetics and metabolism* 83, 6-15. [[PubMed](#)]
26. Elstein D, Abrahamov A, Hadas-Halpern I, Zimran A, 2001. **Gaucher's disease.** *Lancet* 358, 324-327. [[PubMed](#)]
27. Neudorfer O, Hadas-Halpern I, Elstein D, Abrahamov A, Zimran A, 1997. **Abdominal ultrasound findings mimicking hematological malignancies in a study of 218 Gaucher patients.** *American journal of hematology* 55, 28-34. [[PubMed](#)]
28. Charrow J, Andersson HC, Kaplan P, Kolodny EH, Mistry P, Pastores G, Rosenbloom BE, Scott CR, Wappner RS, Weinreb NJ *et al*, 2000. **The Gaucher registry: demographics and disease characteristics of 1698 patients with Gaucher disease.** *Arch Intern Med* 160, 2835-2843. [[PubMed](#)]
29. Dawson A, Elias DJ, Rubenson D, Bartz SH, Garver PR, Kay AC, Bloor CM, Beutler E, 1996. **Pulmonary hypertension developing after alglucerase therapy in two patients with type 1 Gaucher disease complicated by the hepatopulmonary syndrome.** *Ann Intern Med* 125, 901-904. [[PubMed](#)]
30. Bembi B, Ciana G, Mengel E, Terk MR, Martini C, Wenstrup RJ, 2002. **Bone complications in children with Gaucher disease.** *Br J Radiol* 75 Suppl 1, A37-44. [[PubMed](#)]

31. Clarke LA, Hollak CE, 2015. **The clinical spectrum and pathophysiology of skeletal complications in lysosomal storage disorders.** *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism* 29, 219-235. [[PubMed](#)]
32. Marcucci G, Zimran A, Bembi B, Kanis J, Reginster JY, Rizzoli R, Cooper C, Brandi ML, 2014. **Gaucher disease and bone manifestations.** *Calcified tissue international* 95, 477-494. [[PubMed](#)]
33. Kerem E, Elstein D, Abrahamov A, Bar Ziv Y, Hadas-Halpern I, Melzer E, Cahan C, Branski D, Zimran A, 1996. **Pulmonary function abnormalities in type I Gaucher disease.** *Eur Respir J* 9, 340-345. [[PubMed](#)]
34. Mistry PK, Sirrs S, Chan A, Pritzker MR, Duffy TP, Grace ME, Meeker DP, Goldman ME, 2002. **Pulmonary hypertension in type 1 Gaucher's disease: genetic and epigenetic determinants of phenotype and response to therapy.** *Molecular genetics and metabolism* 77, 91-98. [[PubMed](#)]
35. Becker-Cohen R, Elstein D, Abrahamov A, Algur N, Rudensky B, Hadas-Halpern I, Zimran A, Frishberg Y, 2005. **A comprehensive assessment of renal function in patients with Gaucher disease.** *Am J Kidney Dis* 46, 837-844. [[PubMed](#)]
36. Bruscolini A, Pirraglia MP, Restivo L, Spinucci G, Abbouda A, 2012. **A branch retinal artery occlusion in a patient with Gaucher disease.** *Graefes's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 250, 441-444. [[PubMed](#)]
37. Roghi A, Poggiali E, Cassinerio E, Pedrotti P, Giuditta M, Milazzo A, Quattrocchi G, Cappellini MD, 2017. **The role of cardiac magnetic resonance in assessing the cardiac involvement in Gaucher type 1 patients: morphological and functional evaluations.** *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* 18, 244-248. [[PubMed](#)]
38. Langeveld M, de Fost M, Aerts JM, Sauerwein HP, Hollak CE, 2008. **Overweight, insulin resistance and type II diabetes in type I Gaucher disease patients in relation to enzyme replacement therapy.** *Blood cells, molecules & diseases* 40, 428-432. [[PubMed](#)]
39. Elstein D, Rosenmann E, Reinus C, Paz J, Altarescu G, Zimran A, 2003. **Amyloidosis and gastric bleeding in a patient with Gaucher disease.** *Journal of clinical gastroenterology* 37, 234-237. [[PubMed](#)]
40. Alcalay RN, Dinur T, Quinn T, Sakanaka K, Levy O, Waters C, Fahn S, Dorovski T, Chung WK, Pauciulo M *et al*, 2014. **Comparison of Parkinson risk in Ashkenazi Jewish patients with Gaucher disease and GBA heterozygotes.** *JAMA neurology* 71, 752-757. [[PubMed](#)]
41. Biegstraaten M, Mengel E, Marodi L, Petakov M, Niederau C, Giraldo P, Hughes D, Mrcic M, Mehta A, Hollak CE *et al*, 2010. **Peripheral neuropathy in adult type 1 Gaucher disease: a 2-year prospective observational study.** *Brain : a journal of neurology* 133, 2909-2919. [[PubMed](#)]
42. Zimran A, Sorge J, Gross E, Kubitz M, West C, Beutler E, 1989. **Prediction of severity of Gaucher's disease by identification of mutations at DNA level.** *Lancet* 2, 349-352. [[PubMed](#)]
43. Zimran A, Kay A, Gelbart T, Garver P, Thurston D, Saven A, Beutler E, 1992. **Gaucher disease. Clinical, laboratory, radiologic, and genetic features of 53 patients.** *Medicine (Baltimore)* 71, 337-353. [[PubMed](#)]

44. Maaswinkel-Mooij P, Hollak C, van Eysden-Plaisier M, Prins M, Aerts H, Poll R, 2000. **The natural course of Gaucher disease in The Netherlands: implications for monitoring of disease manifestations.** *Journal of inherited metabolic disease* 23, 77-82. [[PubMed](#)]
45. Deegan PB, Moran MT, McFarlane I, Schofield JP, Boot RG, Aerts JM, Cox TM, 2005. **Clinical evaluation of chemokine and enzymatic biomarkers of Gaucher disease.** *Blood cells, molecules & diseases* 35, 259-267. [[PubMed](#)]
46. Zimran A, Altarescu G, Rudensky B, Abrahamov A, Elstein D, 2005. **Survey of hematological aspects of Gaucher disease.** *Hematology* 10, 151-156. [[PubMed](#)]
47. Thomas AS, Mehta A, Hughes DA, 2014. **Gaucher disease: haematological presentations and complications.** *Br J Haematol* 165, 427-440. [[PubMed](#)]
48. Gielchinsky Y, Elstein D, Green R, Miller JW, Elstein Y, Algur N, Lahad A, Shinar E, Abrahamov A, Zimran A, 2001. **High prevalence of low serum vitamin B12 in a multi-ethnic Israeli population.** *Br J Haematol* 115, 707-709. [[PubMed](#)]
49. Haratz D, Manny N, Raz I, 1990. **Autoimmune hemolytic anemia in Gaucher's disease.** *Klin Wochenschr* 68, 94-95. [[PubMed](#)]
50. Zimran A, Elstein D, Abrahamov A, Dale GL, Aker M, Matzner Y, 1994. **Significance of abnormal neutrophil chemotaxis in Gaucher's disease.** *Blood* 84, 2374-2375. [[PubMed](#)]
51. Liel Y, Rudich A, Nagauker-Shriker O, Yermiyahu T, Levy R, 1994. **Monocyte dysfunction in patients with Gaucher disease: evidence for interference of glucocerebroside with superoxide generation.** *Blood* 83, 2646-2653. [[PubMed](#)]
52. Marodi L, Kaposzta R, Toth J, Laszlo A, 1995. **Impaired microbicidal capacity of mononuclear phagocytes from patients with type I Gaucher disease: partial correction by enzyme replacement therapy.** *Blood* 86, 4645-4649. [[PubMed](#)]
53. Berger LA, Warwick R, Mehta A, 2001. **Isolated Candida infection of the pterygoid muscles in a patient with Gaucher's disease.** *AJR Am J Roentgenol* 176, 1332-1333. [[PubMed](#)]
54. Finkelstein R, Nachum Z, Reissman P, Reiss ND, Besser M, Trajber I, Melamed Y, 1992. **Anaerobic osteomyelitis in patients with Gaucher's disease.** *Clin Infect Dis* 15, 771-773. [[PubMed](#)]
55. Rodić P, Popadić D, Vuković NS, Ramić Z, Stojković MM, Janić D, 2014. **Flow Cytometric Assay of Respiratory Burst Capacity in Peripheral Blood Monocytes of Gaucher Type 1 Patients.** *Journal of Medical Biochemistry* 33, 265-270. [[PubMed](#)]
56. Hollak CE, Levi M, Berends F, Aerts JM, van Oers MH, 1997. **Coagulation abnormalities in type 1 Gaucher disease are due to low-grade activation and can be partly restored by enzyme supplementation therapy.** *Br J Haematol* 96, 470-476. [[PubMed](#)]
57. Givol N, Goldstein G, Peleg O, Shenkman B, Zimran A, Elstein D, Kenet G, 2012. **Thrombocytopenia and bleeding in dental procedures of patients with Gaucher disease.** *Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia* 18, 117-121. [[PubMed](#)]

58. Granovsky-Grisaru S, Belmatoug N, vom Dahl S, Mengel E, Morris E, Zimran A, 2011. **The management of pregnancy in Gaucher disease.** *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* 156, 3-8. [[PubMed](#)]
59. Spectre G, Roth B, Ronen G, Rosengarten D, Elstein D, Zimran A, Varon D, Revel-Vilk S, 2011. **Platelet adhesion defect in type I Gaucher Disease is associated with a risk of mucosal bleeding.** *Br J Haematol* 153, 372-378. [[PubMed](#)]
60. Gillis S, Hyam E, Abrahamov A, Elstein D, Zimran A, 1999. **Platelet function abnormalities in Gaucher disease patients.** *American journal of hematology* 61, 103-106. [[PubMed](#)]
61. Sidransky E, Tayebi N, Stubblefield BK, Eliason W, Klineburgess A, Pizzolato GP, Cox JN, Porta J, Bottani A, DeLozier-Blanchet CD, 1996. **The clinical, molecular, and pathological characterisation of a family with two cases of lethal perinatal type 2 Gaucher disease.** *Journal of medical genetics* 33, 132-136. [[PubMed](#)]
62. Goker-Alpan O, Schiffmann R, Park JK, Stubblefield BK, Tayebi N, Sidransky E, 2003. **Phenotypic continuum in neuronopathic Gaucher disease: an intermediate phenotype between type 2 and type 3.** *J Pediatr* 143, 273-276. [[PubMed](#)]
63. Lui K, Commens C, Choong R, Jaworski R, 1988. **Collodion babies with Gaucher's disease.** *Arch Dis Child* 63, 854-856. [[PubMed](#)]
64. Soma H, Yamada K, Osawa H, Hata T, Oguro T, Kudo M, 2000. **Identification of Gaucher cells in the chorionic villi associated with recurrent hydrops fetalis.** *Placenta* 21, 412-416. [[PubMed](#)]
65. Vellodi A, Bembi B, de Villemeur TB, Collin-Histed T, Erikson A, Mengel E, Rolfs A, Tylki-Szymanska A, 2001. **Management of neuronopathic Gaucher disease: a European consensus.** *Journal of inherited metabolic disease* 24, 319-327. [[PubMed](#)]
66. Patterson MC, Horowitz M, Abel RB, Currie JN, Yu KT, Kaneski C, Higgins JJ, O'Neill RR, Fedio P, Pikus A *et al*, 1993. **Isolated horizontal supranuclear gaze palsy as a marker of severe systemic involvement in Gaucher's disease.** *Neurology* 43, 1993-1997. [[PubMed](#)]
67. Altarescu G, Hill S, Wiggs E, Jeffries N, Kreps C, Parker CC, Brady RO, Barton NW, Schiffmann R, 2001. **The efficacy of enzyme replacement therapy in patients with chronic neuronopathic Gaucher's disease.** *J Pediatr* 138, 539-547. [[PubMed](#)]
68. Erikson A, 1986. **Gaucher disease--Norrbottnian type (III). Neuropaediatric and neurobiological aspects of clinical patterns and treatment.** *Acta Paediatr Scand Suppl* 326, 1-42. [[PubMed](#)]
69. Beutler E, Kuhl W, 1970. **The diagnosis of the adult type of Gaucher's disease and its carrier state by demonstration of deficiency of beta-glucosidase activity in peripheral blood leukocytes.** *J Lab Clin Med* 76, 747-755. [[PubMed](#)]
70. Busche G, Majewski H, Schlue J, Delventhal S, Baer-Henney S, Vykoupil KF, Georgii A, 1997. **Frequency of pseudo-Gaucher cells in diagnostic bone marrow biopsies from patients with Ph-positive chronic myeloid leukaemia.** *Virchows Arch* 430, 139-148. [[PubMed](#)]

71. Wenger DA, Roth S, 1982. **Homozygote and heterozygote identification.** *Prog Clin Biol Res* 95, 551-572. [[PubMed](#)]
72. Zimran A, Elstein D, Abrahamov A, Kuhl W, Brown KH, Beutler E, 1995. **Prenatal molecular diagnosis of Gaucher disease.** *Prenat Diagn* 15, 1185-1188. [[PubMed](#)]
73. Boven LA, van Meurs M, Boot RG, Mehta A, Boon L, Aerts JM, Laman JD, 2004. **Gaucher cells demonstrate a distinct macrophage phenotype and resemble alternatively activated macrophages.** *Am J Clin Pathol* 122, 359-369. [[PubMed](#)]
74. Tuchman LR, Suna H, Carr JJ, 1956. **Elevation of serum acid phosphatase in Gaucher's disease.** *J Mt Sinai Hosp N Y* 23, 227-229. [[PubMed](#)]
75. Ockerman PA, Kohlin P, 1969. **Acid hydrolases in plasma in Gaucher's disease.** *Clinical chemistry* 15, 61-64. [[PubMed](#)]
76. Lieberman J, Beutler E, 1976. **Elevation of serum angiotensin-converting enzyme in Gaucher's disease.** *The New England journal of medicine* 294, 1442-1444. [[PubMed](#)]
77. Silverstein E, Friedland J, 1977. **Elevated serum and spleen angiotensin converting enzyme and serum lysozyme in Gaucher's disease.** *Clin Chim Acta* 74, 21-25. [[PubMed](#)]
78. Aerts JM, Kallemeijn WW, Wegdam W, Joao Ferraz M, van Breemen MJ, Dekker N, Kramer G, Poorthuis BJ, Groener JE, Cox-Brinkman J *et al*, 2011. **Biomarkers in the diagnosis of lysosomal storage disorders: proteins, lipids, and inhibitors.** *Journal of inherited metabolic disease* 34, 605-619. [[PubMed](#)]
79. Hollak CE, van Weely S, van Oers MH, Aerts JM, 1994. **Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease.** *The Journal of clinical investigation* 93, 1288-1292. [[PubMed](#)]
80. van Eijk M, van Roomen CP, Renkema GH, Bussink AP, Andrews L, Blommaert EF, Sugar A, Verhoeven AJ, Boot RG, Aerts JM, 2005. **Characterization of human phagocyte-derived chitotriosidase, a component of innate immunity.** *Int Immunol* 17, 1505-1512. [[PubMed](#)]
81. van Dussen L, Hendriks EJ, Groener JE, Boot RG, Hollak CE, Aerts JM, 2014. **Value of plasma chitotriosidase to assess non-neuronopathic Gaucher disease severity and progression in the era of enzyme replacement therapy.** *Journal of inherited metabolic disease* 37, 991-1001. [[PubMed](#)]
82. Boot RG, Renkema GH, Verhoek M, Strijland A, Bliiek J, de Meulemeester TM, Mannens MM, Aerts JM, 1998. **The human chitotriosidase gene. Nature of inherited enzyme deficiency.** *The Journal of biological chemistry* 273, 25680-25685. [[PubMed](#)]
83. Bussink AP, Verhoek M, Vreede J, Ghauharali-van der Vlugt K, Donker-Koopman WE, Sprenger RR, Hollak CE, Aerts JM, Boot RG, 2009. **Common G102S polymorphism in chitotriosidase differentially affects activity towards 4-methylumbelliferyl substrates.** *The FEBS journal* 276, 5678-5688. [[PubMed](#)]
84. Bargagli E, Bennett D, Maggiorelli C, Di Sipio P, Margollicci M, Bianchi N, Rottoli P, 2013. **Human chitotriosidase: a sensitive biomarker of sarcoidosis.** *Journal of clinical immunology* 33, 264-270. [[PubMed](#)]

85. Aguilera B, Ghauharali-van der Vlugt K, Helmond MT, Out JM, Donker-Koopman WE, Groener JE, Boot RG, Renkema GH, van der Marel GA, van Boom JH *et al*, 2003. **Transglycosidase activity of chitotriosidase: improved enzymatic assay for the human macrophage chitinase.** *The Journal of biological chemistry* 278, 40911-40916. [[PubMed](#)]
86. Boot RG, Verhoek M, de Fost M, Hollak CE, Maas M, Bleijlevens B, van Breemen MJ, van Meurs M, Boven LA, Laman JD *et al*, 2004. **Marked elevation of the chemokine CCL18/PARC in Gaucher disease: a novel surrogate marker for assessing therapeutic intervention.** *Blood* 103, 33-39. [[PubMed](#)]
87. Gordon S, 2003. **Alternative activation of macrophages.** *Nature reviews Immunology* 3, 23-35. [[PubMed](#)]
88. Islam SA, Ling MF, Leung J, Shreffler WG, Luster AD, 2013. **Identification of human CCR8 as a CCL18 receptor.** *The Journal of experimental medicine* 210, 1889-1898. [[PubMed](#)]
89. Rolfs A, Giese A-K, Grittner U, Mascher D, Elstein D, Zimran A, Böttcher T, Lukas J, Hübner R, Gölnitz U, 2013. **Glucosylsphingosine is a highly sensitive and specific biomarker for primary diagnostic and follow-up monitoring in Gaucher disease in a non-Jewish, Caucasian cohort of Gaucher disease patients.** *PloS one* 8, e79732. [[PubMed](#)]
90. Murugesan V, Chuang WL, Liu J, Lischuk A, Kacena K, Lin H, Pastores GM, Yang R, Keutzer J, Zhang K, 2016. **Glucosylsphingosine is a key biomarker of Gaucher disease.** *American journal of hematology* 91, 1082-1089. [[PubMed](#)]
91. Morgan MA, Hoffbrand AV, Laulicht M, Luck W, Knowles S, 1983. **Serum ferritin concentration in Gaucher's disease.** *Br Med J (Clin Res Ed)* 286, 1864. [[PubMed](#)]
92. Lambotte O, Cacoub P, Costedoat N, Le Moel G, Amoura Z, Piette JC, 2003. **High ferritin and low glycosylated ferritin may also be a marker of excessive macrophage activation.** *J Rheumatol* 30, 1027-1028. [[PubMed](#)]
93. Poll LW, Koch JA, Willers R, Aerts H, Scherer A, Haussinger D, Modder U, vom Dahl S, 2002. **Correlation of bone marrow response with hematological, biochemical, and visceral responses to enzyme replacement therapy of nonneuronopathic (type 1) Gaucher disease in 30 adult patients.** *Blood cells, molecules & diseases* 28, 209-220. [[PubMed](#)]
94. Mekinian A, Stirnemann J, Belmatoug N, Heraoui D, Fantin B, Fain O, Charpentier A, Rose C, 2012. **Ferritinemia during type 1 Gaucher disease: mechanisms and progression under treatment.** *Blood cells, molecules & diseases* 49, 53-57. [[PubMed](#)]
95. Stirnemann J, Belmatoug N, Vincent C, Fain O, Fantin B, Mentré F, 2010. **Bone events and evolution of biologic markers in Gaucher disease before and during treatment.** *Arthritis research & therapy* 12, R156. [[PubMed](#)]
96. Goldfarb AR, Atlas DH, Gaberman P, 1950. **Electrophoretic studies in Gaucher's disease.** *Am J Clin Pathol* 20, 963-965. [[PubMed](#)]
97. Pratt PW, Kochwa S, Estren S, 1968. **Immunoglobulin abnormalities in Gaucher's disease. Report of 16 cases.** *Blood* 31, 633-640. [[PubMed](#)]

98. Marti GE, Ryan ET, Papadopoulos NM, Filling-Katz M, Barton N, Fleischer TA, Rick M, Gralnick HR, 1988. **Polyclonal B-cell lymphocytosis and hypergammaglobulinemia in patients with Gaucher disease.** *American journal of hematology* 29, 189-194. [[PubMed](#)]
99. Brautbar A, Elstein D, Pines G, Abrahamov A, Zimran A, 2004. **Effect of enzyme replacement therapy on gammopathies in Gaucher disease.** *Blood cells, molecules & diseases* 32, 214-217. [[PubMed](#)]
100. Shiloni E, Bitran D, Rachmilewitz E, Durst AL, 1983. **The role of splenectomy in Gaucher's disease.** *Arch Surg* 118, 929-932. [[PubMed](#)]
101. Kristinsson SY, Gridley G, Hoover RN, Check D, Landgren O, 2013. **Long-term risks after splenectomy among 8,149 cancer-free US veterans: a cohort study with up to 27 years follow-up.** *Haematologica*, haematol. 2013.092460. [[PubMed](#)]
102. Cox TM, Aerts JM, Belmatoug N, Cappellini MD, vom Dahl S, Goldblatt J, Grabowski GA, Hollak CE, Hwu P, Maas M *et al*, 2008. **Management of non-neuronopathic Gaucher disease with special reference to pregnancy, splenectomy, bisphosphonate therapy, use of biomarkers and bone disease monitoring.** *Journal of inherited metabolic disease* 31, 319-336. [[PubMed](#)]
103. Amstutz HC, 1973. **The hip in Gaucher's disease.** *Clin Orthop Relat Res*, 83-89. [[PubMed](#)]
104. Schein AJ, Arkin AM, 1973. **The classic: hip-joint involvement in Gaucher's disease.** *Clin Orthop Relat Res*, 4-10. [[PubMed](#)]
105. Smanik EJ, Tavill AS, Jacobs GH, Schafer IA, Farquhar L, Weber FL, Jr., Mayes JT, Schulak JA, Petrelli M, Zirzow GC *et al*, 1993. **Orthotopic liver transplantation in two adults with Niemann-Pick and Gaucher's diseases: implications for the treatment of inherited metabolic disease.** *Hepatology* 17, 42-49. [[PubMed](#)]
106. Barton NW, Brady RO, Dambrosia JM, Di Bisceglie AM, Doppelt SH, Hill SC, Mankin HJ, Murray GJ, Parker RI, Argoff CE *et al*, 1991. **Replacement therapy for inherited enzyme deficiency--macrophage-targeted glucocerebrosidase for Gaucher's disease.** *The New England journal of medicine* 324, 1464-1470. [[PubMed](#)]
107. Grabowski GA, Barton NW, Pastores G, Dambrosia JM, Banerjee TK, McKee MA, Parker C, Schiffmann R, Hill SC, Brady RO, 1995. **Enzyme therapy in type 1 Gaucher disease: comparative efficacy of mannose-terminated glucocerebrosidase from natural and recombinant sources.** *Ann Intern Med* 122, 33-39. [[PubMed](#)]
108. Beutler E, Kay A, Saven A, Garver P, Thurston D, Dawson A, Rosenbloom B, 1991. **Enzyme replacement therapy for Gaucher disease.** *Blood* 78, 1183-1189. [[PubMed](#)]
109. Elstein D, Hadas-Halpern I, Itzchaki M, Lahad A, Abrahamov A, Zimran A, 1996. **Effect of low-dose enzyme replacement therapy on bones in Gaucher disease patients with severe skeletal involvement.** *Blood cells, molecules & diseases* 22, 104-111; discussion 112-104. [[PubMed](#)]
110. Charrow J, Andersson HC, Kaplan P, Kolodny EH, Mistry P, Pastores G, Prakash-Cheng A, Rosenbloom BE, Scott CR, Wappner RS *et al*, 2004. **Enzyme**

- replacement therapy and monitoring for children with type 1 Gaucher disease: consensus recommendations. *J Pediatr* 144, 112-120. [[PubMed](#)]
111. 1996. **Gaucher disease. Current issues in diagnosis and treatment.** NIH Technology Assessment Panel on Gaucher Disease. *JAMA* 275, 548-553. [[PubMed](#)]
 112. Platt FM, Cox, T.M.: **Substrate reduction treatment.** In: *Gaucher disease.* edn. Edited by Futerman AH, Zimran, A.: Taylor and Francis; 2007: 368.
 113. Sawkar AR, Cheng WC, Beutler E, Wong CH, Balch WE, Kelly JW, 2002. **Chemical chaperones increase the cellular activity of N370S beta -glucosidase: a therapeutic strategy for Gaucher disease.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 15428-15433. [[PubMed](#)]
 114. Vunnam RR, Radin NS, 1980. **Analogs of ceramide that inhibit glucocerebroside synthetase in mouse brain.** *Chem Phys Lipids* 26, 265-278. [[PubMed](#)]
 115. Yamashita T, Wada R, Sasaki T, Deng C, Bierfreund U, Sandhoff K, Proia RL, 1999. **A vital role for glycosphingolipid synthesis during development and differentiation.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 9142-9147. [[PubMed](#)]
 116. Sandhoff K, Kolter T, 2003. **Biosynthesis and degradation of mammalian glycosphingolipids.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358, 847-861. [[PubMed](#)]
 117. Trinchera M, Fabbri M, Ghidoni R, 1991. **Topography of glycosyltransferases involved in the initial glycosylations of gangliosides.** *The Journal of biological chemistry* 266, 20907-20912. [[PubMed](#)]
 118. Aerts JM, Hollak CE, Boot RG, Groener JE, Maas M, 2006. **Substrate reduction therapy of glycosphingolipid storage disorders.** *Journal of inherited metabolic disease* 29, 449-456. [[PubMed](#)]
 119. Belmatoug N, Di Rocco M, Fraga C, Giraldo P, Hughes D, Lukina E, Maison-Blanche P, Merkel M, Niederau C, Plöckinger U, 2017. **Management and monitoring recommendations for the use of eliglustat in adults with type 1 Gaucher disease in Europe.** *European journal of internal medicine* 37, 25-32. [[PubMed](#)]
 120. Cohen FE, Kelly JW, 2003. **Therapeutic approaches to protein-misfolding diseases.** *Nature* 426, 905-909. [[PubMed](#)]
 121. Alfonso P, Pampin S, Estrada J, Rodriguez-Rey JC, Giraldo P, Sancho J, Pocovi M, 2005. **Miglustat (NB-DNJ) works as a chaperone for mutated acid beta-glucosidase in cells transfected with several Gaucher disease mutations.** *Blood cells, molecules & diseases* 35, 268-276. [[PubMed](#)]
 122. Lin H, Sugimoto Y, Ohsaki Y, Ninomiya H, Oka A, Taniguchi M, Ida H, Eto Y, Ogawa S, Matsuzaki Y *et al*, 2004. **N-octyl-beta-valienamine up-regulates activity of F213I mutant beta-glucosidase in cultured cells: a potential chemical chaperone therapy for Gaucher disease.** *Biochimica et biophysica acta* 1689, 219-228. [[PubMed](#)]
 123. McNeill A, Magalhaes J, Shen C, Chau KY, Hughes D, Mehta A, Foltynie T, Cooper JM, Abramov AY, Gegg M *et al*, 2014. **Ambroxol improves lysosomal biochemistry in glucocerebroside mutation-linked Parkinson disease cells.** *Brain : a journal of neurology* 137, 1481-1495. [[PubMed](#)]

124. Sabatini DD, Adesnik, M.B.: **The biogenesis of membranes and organelles.** In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases.* edn. Edited by Scriver CR. New York: McGraw-Hill; 2001: 475.
125. Aerts JM, Hollak C, Boot R, Groener A, 2003. **Biochemistry of glycosphingolipid storage disorders: implications for therapeutic intervention.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358, 905-914. [[PubMed](#)]
126. Meivar-Levy I, Horowitz M, Futerman AH, 1994. **Analysis of glucocerebrosidase activity using N-(1-[14C]hexanoyl)-D-erythroglucosylsphingosine demonstrates a correlation between levels of residual enzyme activity and the type of Gaucher disease.** *Biochem J* 303 (Pt 2), 377-382. [[PubMed](#)]
127. Lachmann RH, Grant IR, Halsall D, Cox TM, 2004. **Twin pairs showing discordance of phenotype in adult Gaucher's disease.** *QJM* 97, 199-204. [[PubMed](#)]
128. Pennelli N, Scaravilli F, Zacchello F, 1969. **The morphogenesis of Gaucher cells investigated by electron microscopy.** *Blood* 34, 331-347. [[PubMed](#)]
129. Parkin JL, Brunning RD, 1982. **Pathology of the Gaucher cell.** *Prog Clin Biol Res* 95, 151-175. [[PubMed](#)]
130. Zimran A: **Gaucher's Disease.** Cambridge: Balliere Tindall; 1997.
131. Jmoudiak M, Futerman AH, 2005. **Gaucher disease: pathological mechanisms and modern management.** *Br J Haematol* 129, 178-188. [[PubMed](#)]
132. Barak V, Acker M, Nisman B, Kalickman I, Abrahamov A, Zimran A, Yatziv S, 1999. **Cytokines in Gaucher's disease.** *Eur Cytokine Netw* 10, 205-210. [[PubMed](#)]
133. Hollak CE, Evers L, Aerts JM, van Oers MH, 1997. **Elevated levels of M-CSF, sCD14 and IL8 in type 1 Gaucher disease.** *Blood cells, molecules & diseases* 23, 201-212. [[PubMed](#)]
134. van Breemen MJ, de Fost M, Voerman JS, Laman JD, Boot RG, Maas M, Hollak CE, Aerts JM, Rezaee F, 2007. **Increased plasma macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha and MIP-1beta levels in type 1 Gaucher disease.** *Biochimica et biophysica acta* 1772, 788-796. [[PubMed](#)]
135. George ED, Sadovsky R, 1999. **Multiple myeloma: recognition and management.** *Am Fam Physician* 59, 1885-1894. [[PubMed](#)]
136. Black RJ, Bray F, Ferlay J, Parkin DM, 1997. **Cancer incidence and mortality in the European Union: cancer registry data and estimates of national incidence for 1990.** *Eur J Cancer* 33, 1075-1107. [[PubMed](#)]
137. Brody JD, Advani R, Shin LK, Bingham DB, Rosenberg SA, 2006. **Splenic diffuse large B-cell lymphoma in a patient with type 1 Gaucher disease: Diagnostic and therapeutic challenges.** *Ann Hematol* 85, 817-820. [[PubMed](#)]
138. Sharer LR, Barondess JA, Silver RT, Gray GF, 1974. **Association of Hodgkin disease and Gaucher disease.** *Arch Pathol* 98, 376-378. [[PubMed](#)]
139. Castelli R, Cassinerio E, Iurlo A, Zanella A, Gianelli U, Cappellini MD, 2006. **Unusual severe development of common B lymphoblastic leukemia in Gaucher disease type I.** *American journal of hematology* 81, 383-384. [[PubMed](#)]
140. Chang-Lo M, Yam LT, Rubenstone AI, Schwartz SO, 1975. **Gaucher's disease associated with chronic lymphocytic leukaemia, gout and carcinoma.** *J Pathol* 116, 203-207. [[PubMed](#)]

141. Harder H, Eucker J, Zang C, Possinger K, Muller-Hocker J, Beutler E, Petrides PE, 2000. **Coincidence of Gaucher's disease due to a 1226G/1448C mutation and of an immunoglobulin G lambda multiple myeloma with Bence-Jones proteinuria.** *Ann Hematol* 79, 640-643. [[PubMed](#)]
142. Pinkhas J, Djaldetti M, Yaron M, 1965. **Coincidence of multiple myeloma with Gaucher's disease.** *Isr J Med Sci* 1, 537-540. [[PubMed](#)]
143. de Fost M, Vom Dahl S, Weverling GJ, Brill N, Brett S, Haussinger D, Hollak CE, 2006. **Increased incidence of cancer in adult Gaucher disease in Western Europe.** *Blood cells, molecules & diseases* 36, 53-58. [[PubMed](#)]
144. Rosenbloom BE, Weinreb NJ, Zimran A, Kacena KA, Charrow J, Ward E, 2005. **Gaucher disease and cancer incidence: a study from the Gaucher Registry.** *Blood* 105, 4569-4572. [[PubMed](#)]
145. Zimran A, Liphshitz I, Barchana M, Abrahamov A, Elstein D, 2005. **Incidence of malignancies among patients with type I Gaucher disease from a single referral clinic.** *Blood cells, molecules & diseases* 34, 197-200. [[PubMed](#)]
146. Rajkumar SV, 2005. **MGUS and smoldering multiple myeloma: update on pathogenesis, natural history, and management.** *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 340-345. [[PubMed](#)]
147. **Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group.** 2003. *Br J Haematol* 121, 749-757. [[PubMed](#)]
148. Hallek M, Bergsagel PL, Anderson KC, 1998. **Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process.** *Blood* 91, 3-21. [[PubMed](#)]
149. Fonseca R, Barlogie B, Bataille R, Bastard C, Bergsagel PL, Chesi M, Davies FE, Drach J, Greipp PR, Kirsch IR *et al*, 2004. **Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: a workshop report.** *Cancer Res* 64, 1546-1558. [[PubMed](#)]
150. Lust JA, 1996. **Molecular genetics and lymphoproliferative disorders.** *J Clin Lab Anal* 10, 359-367. [[PubMed](#)]
151. Tricot G, 2000. **New insights into role of microenvironment in multiple myeloma.** *Lancet* 355, 248-250. [[PubMed](#)]
152. Bommert K, Bargou RC, Stuhmer T, 2006. **Signalling and survival pathways in multiple myeloma.** *Eur J Cancer* 42, 1574-1580. [[PubMed](#)]
153. Ladetto M, Vallet S, Trojan A, Dell'Aquila M, Monitillo L, Rosato R, Santo L, Drandi D, Bertola A, Falco P *et al*, 2005. **Cyclooxygenase-2 (COX-2) is frequently expressed in multiple myeloma and is an independent predictor of poor outcome.** *Blood* 105, 4784-4791. [[PubMed](#)]
154. Zdzisinska B, Walter-Croneck A, Dmoszynska A, Kandefers-Szerszen M, 2006. **Matrix metalloproteinase and cytokine production by bone marrow adherent cells from multiple myeloma patients.** *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 54, 289-296. [[PubMed](#)]
155. Gado K, Domjan G, Hegyesi H, Falus A, 2000. **Role of INTERLEUKIN-6 in the pathogenesis of multiple myeloma.** *Cell Biol Int* 24, 195-209. [[PubMed](#)]
156. Lust JA, Donovan KA, 1998. **Biology of the Transition of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance (MGUS) to Multiple Myeloma.** *Cancer Control* 5, 209-217. [[PubMed](#)]

157. Lefranc MP, 2001. **Nomenclature of the human immunoglobulin genes.** *Current protocols in immunology / edited by John E Coligan [et al]* Appendix 1, Appendix 1P. [[PubMed](#)]
158. van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, Delabesse E, Davi F, Schuurin E, Garcia-Sanz R *et al*, 2003. **Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936.** *Leukemia* 17, 2257-2317. [[PubMed](#)]
159. Hozumi N, Tonegawa S, 1976. **Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73, 3628-3632. [[PubMed](#)]
160. Schatz DG, Spanopoulou E, 2005. **Biochemistry of V(D)J recombination.** *Current topics in microbiology and immunology* 290, 49-85. [[PubMed](#)]
161. Jung D, Giallourakis C, Mostoslavsky R, Alt FW, 2006. **Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus.** *Annual review of immunology* 24, 541-570. [[PubMed](#)]
162. McHeyzer-Williams LJ, McHeyzer-Williams MG, 2005. **Antigen-specific memory B cell development.** *Annual review of immunology* 23, 487-513. [[PubMed](#)]
163. Besmer E, Gourzi P, Papavasiliou FN, 2004. **The regulation of somatic hypermutation.** *Current opinion in immunology* 16, 241-245. [[PubMed](#)]
164. Meffre E, Casellas R, Nussenzweig MC, 2000. **Antibody regulation of B cell development.** *Nature immunology* 1, 379-385. [[PubMed](#)]
165. Klein U, Goossens T, Fischer M, Kanzler H, Braeuninger A, Rajewsky K, Kuppers R, 1998. **Somatic hypermutation in normal and transformed human B cells.** *Immunological reviews* 162, 261-280. [[PubMed](#)]
166. Peled JU, Kuang FL, Iglesias-Ussel MD, Roa S, Kalis SL, Goodman MF, Scharff MD, 2008. **The biochemistry of somatic hypermutation.** *Annual review of immunology* 26, 481-511. [[PubMed](#)]
167. Dorner T, Foster SJ, Brezinschek HP, Lipsky PE, 1998. **Analysis of the targeting of the hypermutational machinery and the impact of subsequent selection on the distribution of nucleotide changes in human VHDJH rearrangements.** *Immunological reviews* 162, 161-171. [[PubMed](#)]
168. Di Noia JM, Neuberger MS, 2007. **Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation.** *Annual review of biochemistry* 76, 1-22. [[PubMed](#)]
169. Wilson PC, de Bouteiller O, Liu YJ, Potter K, Banchereau J, Capra JD, Pascual V, 1998. **Somatic hypermutation introduces insertions and deletions into immunoglobulin V genes.** *The Journal of experimental medicine* 187, 59-70. [[PubMed](#)]
170. Guttmacher AE, Collins FS, 2002. **Genomic medicine--a primer.** *The New England journal of medicine* 347, 1512-1520. [[PubMed](#)]
171. Chomczynski P, Sacchi N, 1987. **Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.** *Analytical biochemistry* 162, 156-159. [[PubMed](#)]

172. Ghia P, Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, Stilgenbauer S, Stevenson F, Davi F, Rosenquist R, 2007. **ERIC recommendations on IGHV gene mutational status analysis in chronic lymphocytic leukemia.** *Leukemia* 21, 1-3. [[PubMed](#)]
173. Lazic J, Dokmanovic L, Krstovski N, Predojevic J, Tosic N, Pavlovic S, Janic D, 2009. **[Immunoglobulin genes and T-cell receptors as molecular markers in children with acute lymphoblastic leukaemia].** *Srpski arhiv za celokupno lekarstvo* 137, 384-390. [[PubMed](#)]
174. Sambrook J, Russell DW, 2006. **Agarose gel electrophoresis.** *CSH protocols* 2006. [[PubMed](#)]
175. Radojkovic D, Kusic J, 2000. **Silver staining of denaturing gradient gel electrophoresis gels.** *Clinical chemistry* 46, 883-884. [[PubMed](#)]
176. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR, 1977. **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 5463-5467. [[PubMed](#)]
177. Lefranc MP, 2003. **IMGT, the international ImMunoGeneTics database.** *Nucleic acids research* 31, 307-310. [[PubMed](#)]
178. Lefranc MP, 2005. **IMGT, the international ImMunoGeneTics information system: a standardized approach for immunogenetics and immunoinformatics.** *Immunome research* 1, 3. [[PubMed](#)]
179. Giudicelli V, Chaume D, Lefranc MP, 2004. **IMGT/V-QUEST, an integrated software program for immunoglobulin and T cell receptor V-J and V-D-J rearrangement analysis.** *Nucleic acids research* 32, W435-440. [[PubMed](#)]
180. Hawkins RE, Zhu D, Ovecká M, Winter G, Hamblin TJ, Long A, Stevenson FK, 1994. **Idiotypic vaccination against human B-cell lymphoma. Rescue of variable region gene sequences from biopsy material for assembly as single-chain Fv personal vaccines.** *Blood* 83, 3279-3288. [[PubMed](#)]
181. Hermann G, Goldblatt J, Levy RN, Goldsmith SJ, Desnick RJ, Grabowski GA, 1986. **Gaucher's disease type 1: assessment of bone involvement by CT and scintigraphy.** *AJR Am J Roentgenol* 147, 943-948. [[PubMed](#)]
182. Lee RE, 1982. **The pathology of Gaucher disease.** *Prog Clin Biol Res* 95, 177-217. [[PubMed](#)]
183. Shiran A, Brenner B, Laor A, Tatarsky I, 1993. **Increased risk of cancer in patients with Gaucher disease.** *Cancer* 72, 219-224. [[PubMed](#)]
184. Taddei TH, Kacena KA, Yang M, Yang R, Malhotra A, Boxer M, Aleck KA, Rennert G, Pastores GM, Mistry PK, 2009. **The underrecognized progressive nature of N370S Gaucher disease and assessment of cancer risk in 403 patients.** *American journal of hematology* 84, 208-214. [[PubMed](#)]
185. Costello R, O'Callaghan T, Sebahoun G, 2006. **Gaucher disease and multiple myeloma.** *Leuk Lymphoma* 47, 1365-1368. [[PubMed](#)]
186. Rajkumar SV, 2009. **Multiple myeloma.** *Curr Probl Cancer* 33, 7-64. [[PubMed](#)]
187. Jego G, Bataille R, Geffroy-Luseau A, Descamps G, Pellat-Deceunynck C, 2006. **Pathogen-associated molecular patterns are growth and survival factors for human myeloma cells through Toll-like receptors.** *Leukemia* 20, 1130-1137. [[PubMed](#)]

188. Perez-Andres M, Almeida J, Martin-Ayuso M, Moro MJ, Martin-Nunez G, Galende J, Borrego D, Rodriguez MJ, Ortega F, Hernandez J *et al*, 2005. **Clonal plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma and plasma cell leukemia show different expression profiles of molecules involved in the interaction with the immunological bone marrow microenvironment.** *Leukemia* 19, 449-455. [[PubMed](#)]
189. Rajkumar SV, Mesa RA, Fonseca R, Schroeder G, Plevak MF, Dispenzieri A, Lacy MQ, Lust JA, Witzig TE, Gertz MA *et al*, 2002. **Bone marrow angiogenesis in 400 patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma, and primary amyloidosis.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 8, 2210-2216. [[PubMed](#)]
190. Galea HR, Cogne M, 2002. **GM-CSF and IL-12 production by malignant plasma cells promotes cell-mediated immune responses against monoclonal Ig determinants in a light chain myeloma model.** *Clinical and experimental immunology* 129, 247-253. [[PubMed](#)]
191. Vacca A, Ria R, Ribatti D, Semeraro F, Djonov V, Di Raimondo F, Dammacco F, 2003. **A paracrine loop in the vascular endothelial growth factor pathway triggers tumor angiogenesis and growth in multiple myeloma.** *Haematologica* 88, 176-185. [[PubMed](#)]
192. Roodman GD, 2002. **Role of the bone marrow microenvironment in multiple myeloma.** *J Bone Miner Res* 17, 1921-1925. [[PubMed](#)]
193. Tian E, Zhan F, Walker R, Rasmussen E, Ma Y, Barlogie B, Shaughnessy JD, Jr., 2003. **The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma.** *The New England journal of medicine* 349, 2483-2494. [[PubMed](#)]
194. Liu J, Halene S, Yang M, Iqbal J, Yang R, Mehal WZ, Chuang WL, Jain D, Yuen T, Sun L *et al*, 2012. **Gaucher disease gene GBA functions in immune regulation.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 10018-10023. [[PubMed](#)]
195. Mistry PK, Liu J, Yang M, Nottoli T, McGrath J, Jain D, Zhang K, Keutzer J, Chuang WL, Mehal WZ *et al*, 2010. **Glucocerebrosidase gene-deficient mouse recapitulates Gaucher disease displaying cellular and molecular dysregulation beyond the macrophage.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 19473-19478. [[PubMed](#)]
196. Rodic P, Kraguljac Kurtovic N, Suvajdzic Vukovic N, Djordjevic M, Mitrovic M, Sumarac Z, Janic D, 2014. **Flow cytometric assessment of lymphocyte subsets in Gaucher type 1 patients.** *Blood cells, molecules & diseases* 53, 169-170. [[PubMed](#)]
197. Godsland IF, 2010. **Insulin resistance and hyperinsulinaemia in the development and progression of cancer.** *Clinical Science* 118, 315-332.
198. Wang P, Kang D, Cao W, Wang Y, Liu Z, 2012. **Diabetes mellitus and risk of hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis.** *Diabetes/metabolism research and reviews* 28, 109-122. [[PubMed](#)]

199. Arends M, van Dussen L, Biegstraaten M, Hollak CE, 2013. **Malignancies and monoclonal gammopathy in Gaucher disease; a systematic review of the literature.** *Br J Haematol* 161, 832-842. [[PubMed](#)]
200. Brady K, Corash L, Bhargava V, 1997. **Multiple myeloma arising from monoclonal gammopathy of undetermined significance in a patient with Gaucher's disease.** *Arch Pathol Lab Med* 121, 1108-1111. [[PubMed](#)]
201. Kyle RA, Rajkumar SV, 2006. **Monoclonal gammopathy of undetermined significance.** *Br J Haematol* 134, 573-589. [[PubMed](#)]
202. Wine E, Yaniv I, Cohen IJ, 2007. **Hyperimmunoglobulinemia in pediatric-onset type 1 Gaucher disease and effects of enzyme replacement therapy.** *J Pediatr Hematol Oncol* 29, 451-457. [[PubMed](#)]
203. de Fost M, Out TA, de Wilde FA, Tjin EP, Pals ST, van Oers MH, Boot RG, Aerts JF, Maas M, Vom Dahl S *et al*, 2008. **Immunoglobulin and free light chain abnormalities in Gaucher disease type I: data from an adult cohort of 63 patients and review of the literature.** *Ann Hematol* 87, 439-449. [[PubMed](#)]
204. Grosbois B, Rose C, Noel E, Serratrice Cde R, Dobbelaere D, Gressin V, Cherin P, Hartmann A, Javier RM, Clerson P *et al*, 2009. **Gaucher disease and monoclonal gammopathy: a report of 17 cases and impact of therapy.** *Blood cells, molecules & diseases* 43, 138-139. [[PubMed](#)]
205. Linari S, Castaman G, 2016. **Hematological manifestations and complications of Gaucher disease.** *Expert Rev Hematol* 9, 51-58. [[PubMed](#)]
206. Shoenfeld Y, Gallant LA, Shaklai M, Livni E, Djaldetti M, Pinkhas J, 1982. **Gaucher's disease: a disease with chronic stimulation of the immune system.** *Arch Pathol Lab Med* 106, 388-391. [[PubMed](#)]
207. Barth BM, Shanmugavelandy SS, Tancelosky DM, Kester M, Morad SA, Cabot MC, 2013. **Gaucher's disease and cancer: a sphingolipid perspective.** *Critical reviews in oncogenesis* 18, 221-234. [[PubMed](#)]
208. Hannun YA, Obeid LM, 2008. **Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids.** *Nature reviews Molecular cell biology* 9, 139-150. [[PubMed](#)]
209. Nair S, Boddupalli CS, Verma R, Liu J, Yang R, Pastores GM, Mistry PK, Dhodapkar MV, 2015. **Type II NKT-TFH cells against Gaucher lipids regulate B-cell immunity and inflammation.** *Blood* 125, 1256-1271. [[PubMed](#)]
210. Astudillo L, Therville N, Colacios C, Segui B, Andrieu-Abadie N, Levade T, 2016. **Glucosylceramidases and malignancies in mammals.** *Biochimie* 125, 267-280. [[PubMed](#)]
211. Braudeau C, Graveleau J, Rimbert M, Neel A, Hamidou M, Grosbois B, Besancon A, Giraudet S, Terrien C, Josien R *et al*, 2013. **Altered innate function of plasmacytoid dendritic cells restored by enzyme replacement therapy in Gaucher disease.** *Blood cells, molecules & diseases* 50, 281-288. [[PubMed](#)]
212. Burstein Y, Zakuth V, Rechavi G, Spiner Z, 1987. **Abnormalities of cellular immunity and natural killer cells in Gaucher's disease.** *J Clin Lab Immunol* 23, 149-151. [[PubMed](#)]
213. Pavlova EV, Wang SZ, Archer J, Dekker N, Aerts JM, Karlsson S, Cox TM, 2013. **B cell lymphoma and myeloma in murine Gaucher's disease.** *J Pathol* 231, 88-97. [[PubMed](#)]

214. Pavlova EV, Archer J, Wang S, Dekker N, Aerts JM, Karlsson S, Cox TM, 2015. **Inhibition of UDP-glucosylceramide synthase in mice prevents Gaucher disease-associated B-cell malignancy.** *J Pathol* 235, 113-124. [[PubMed](#)]
215. Nair S, Branagan AR, Liu J, Boddupalli CS, Mistry PK, Dhodapkar MV, 2016. **Clonal Immunoglobulin against Lysolipids in the Origin of Myeloma.** *The New England journal of medicine* 374, 555-561. [[PubMed](#)]
216. Davis MM, Bjorkman PJ, 1988. **T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition.** *Nature* 334, 395-402. [[PubMed](#)]
217. Tonegawa S, 1983. **Somatic generation of antibody diversity.** *Nature* 302, 575-581. [[PubMed](#)]
218. Szczepanski T, Pongers-Willemsse MJ, Langerak AW, Harts WA, Wijkhuijs AJ, van Wering ER, van Dongen JJ, 1999. **Ig heavy chain gene rearrangements in T-cell acute lymphoblastic leukemia exhibit predominant DH6-19 and DH7-27 gene usage, can result in complete V-D-J rearrangements, and are rare in T-cell receptor alpha beta lineage.** *Blood* 93, 4079-4085. [[PubMed](#)]
219. Kuppers R, Klein U, Hansmann ML, Rajewsky K, 1999. **Cellular origin of human B-cell lymphomas.** *The New England journal of medicine* 341, 1520-1529. [[PubMed](#)]
220. Allen MJ, Myer BJ, Khokher AM, Rushton N, Cox TM, 1997. **Pro-inflammatory cytokines and the pathogenesis of Gaucher's disease: increased release of interleukin-6 and interleukin-10.** *QJM* 90, 19-25. [[PubMed](#)]
221. Hideshima T, Bergsagel PL, Kuehl WM, Anderson KC, 2004. **Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications.** *Blood* 104, 607-618. [[PubMed](#)]
222. Rodic P, Pavlovic S, Kostic T, Suvajdzic Vukovic N, Djordjevic M, Sumarac Z, Dajak M, Bonaci Nikolic B, Janic D, 2013. **Gammopathy and B lymphocyte clonality in patients with Gaucher type I disease.** *Blood cells, molecules & diseases* 50, 222-225. [[PubMed](#)]
223. Landgren O, Gridley G, Turesson I, Caporaso NE, Goldin LR, Baris D, Fears TR, Hoover RN, Linet MS, 2006. **Risk of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and subsequent multiple myeloma among African American and white veterans in the United States.** *Blood* 107, 904-906. [[PubMed](#)]
224. Risitano AM, Selleri C, 2014. **Clonal non-malignant hematological disorders: unraveling molecular pathogenic mechanisms to develop novel targeted therapeutics.** *Translational medicine @ UniSa* 8, 1-3. [[PubMed](#)]
225. Neri P, Bahlis NJ, 2013. **Genomic instability in multiple myeloma: mechanisms and therapeutic implications.** *Expert Opin Biol Ther* 13 Suppl 1, S69-82. [[PubMed](#)]
226. Sahota SS, Leo R, Hamblin TJ, Stevenson FK, 1996. **Ig VH gene mutational patterns indicate different tumor cell status in human myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance.** *Blood* 87, 746-755. [[PubMed](#)]
227. Corssmit EP, Hollak CE, Endert E, van Oers MH, Sauerwein HP, Romijn JA, 1995. **Increased basal glucose production in type 1 Gaucher's disease.** *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 80, 2653-2657. [[PubMed](#)]

228. Shoenfeld Y, Beresovski A, Zharhary D, Tomer Y, Swissa M, Sela E, Zimran A, Zevin S, Gilburd B, Blank M, 1995. **Natural autoantibodies in sera of patients with Gaucher's disease.** *Journal of clinical immunology* 15, 363-372. [[PubMed](#)]
229. Landmann R, Zimmerli W, Sansano S, Link S, Hahn A, Glauser MP, Calandra T, 1995. **Increased circulating soluble CD14 is associated with high mortality in gram-negative septic shock.** *The Journal of infectious diseases* 171, 639-644. [[PubMed](#)]
230. Friedland JS, 1995. **Chemokines and human infection.** *Clin Sci (Lond)* 88, 393-400. [[PubMed](#)]
231. Corboz VA, Cecchini MG, Felix R, Fleisch H, van der Pluijm G, Lowik CW, 1992. **Effect of macrophage colony-stimulating factor on in vitro osteoclast generation and bone resorption.** *Endocrinology* 130, 437-442. [[PubMed](#)]
232. Johnson K, Aarden L, Choi Y, De Groot E, Creasey A, 1996. **The proinflammatory cytokine response to coagulation and endotoxin in whole blood.** *Blood* 87, 5051-5060. [[PubMed](#)]
233. Sipe JD, 1995. **Acute-phase proteins in osteoarthritis.** *Semin Arthritis Rheum* 25, 75-86. [[PubMed](#)]
234. Hughes FJ, Howells GL, 1993. **Interleukin-6 inhibits bone formation in vitro.** *Bone Miner* 21, 21-28. [[PubMed](#)]
235. Lowik CW, van der Pluijm G, Bloys H, Hoekman K, Bijvoet OL, Aarden LA, Papapoulos SE, 1989. **Parathyroid hormone (PTH) and PTH-like protein (PLP) stimulate interleukin-6 production by osteogenic cells: a possible role of interleukin-6 in osteoclastogenesis.** *Biochem Biophys Res Commun* 162, 1546-1552. [[PubMed](#)]
236. Owens J, Chambers, T.J. , 1996. **P16. Differential regulation of osteoclast formation: interleukin-10 (cytokine synthesis inhibitory factor) suppresses formation of osteoclasts but not macrophages in murine bone marrow cultures.** *Bone* 19, 691. [[PubMed](#)]
237. Lamba V, Lamba J, Yasuda K, Strom S, Davila J, Hancock ML, Fackenthal JD, Rogan PK, Ring B, Wrighton SA *et al*, 2003. **Hepatic CYP2B6 expression: gender and ethnic differences and relationship to CYP2B6 genotype and CAR (constitutive androstane receptor) expression.** *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 307, 906-922. [[PubMed](#)]
238. Tierney MJ, Medcalf RL, 2001. **Plasminogen activator inhibitor type 2 contains mRNA instability elements within exon 4 of the coding region. Sequence homology to coding region instability determinants in other mRNAs.** *The Journal of biological chemistry* 276, 13675-13684. [[PubMed](#)]
239. Duan J, Wainwright MS, Comeron JM, Saitou N, Sanders AR, Gelernter J, Gejman PV, 2003. **Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor.** *Human molecular genetics* 12, 205-216. [[PubMed](#)]
240. Thomas KH, Meyn P, Suttorp N, 2006. **Single nucleotide polymorphism in 5'-flanking region reduces transcription of surfactant protein B gene in H441 cells.** *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 291, L386-390. [[PubMed](#)]

241. Zysow BR, Lindahl GE, Wade DP, Knight BL, Lawn RM, 1995. **C/T polymorphism in the 5' untranslated region of the apolipoprotein(a) gene introduces an upstream ATG and reduces in vitro translation.** *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 15, 58-64. [[PubMed](#)]
242. Nedwin GE, Naylor SL, Sakaguchi AY, Smith D, Jarrett-Nedwin J, Pennica D, Goeddel DV, Gray PW, 1985. **Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization.** *Nucleic acids research* 13, 6361-6373. [[PubMed](#)]
243. Tsytsykova AV, Goldfeld AE, 2002. **Inducer-specific enhanceosome formation controls tumor necrosis factor alpha gene expression in T lymphocytes.** *Molecular and cellular biology* 22, 2620-2631. [[PubMed](#)]
244. Ding C, Ji X, Chen X, Xu Y, Zhong L, 2014. **TNF-alpha gene promoter polymorphisms contribute to periodontitis susceptibility: evidence from 46 studies.** *Journal of clinical periodontology* 41, 748-759. [[PubMed](#)]
245. Guo XF, Wang J, Yu SJ, Song J, Ji MY, Cao Z, Zhang JX, Dong WG, 2013. **TNF-alpha-308 polymorphism and risk of digestive system cancers: a meta-analysis.** *World journal of gastroenterology* 19, 9461-9471. [[PubMed](#)]
246. van Heel DA, Udalova IA, De Silva AP, McGovern DP, Kinouchi Y, Hull J, Lench NJ, Cardon LR, Carey AH, Jewell DP *et al*, 2002. **Inflammatory bowel disease is associated with a TNF polymorphism that affects an interaction between the OCT1 and NF(-kappa)B transcription factors.** *Human molecular genetics* 11, 1281-1289. [[PubMed](#)]
247. Asghar T, Yoshida S, Kennedy S, Negoro K, Zhuo W, Hamana S, Motoyama S, Nakago S, Barlow D, Maruo T, 2004. **The tumor necrosis factor-alpha promoter -1031C polymorphism is associated with decreased risk of endometriosis in a Japanese population.** *Hum Reprod* 19, 2509-2514. [[PubMed](#)]
248. Bayley JP, Ottenhoff TH, Verweij CL, 2004. **Is there a future for TNF promoter polymorphisms?** *Genes and immunity* 5, 315-329. [[PubMed](#)]
249. Rasmussen SK, Urhammer SA, Jensen JN, Hansen T, Borch-Johnsen K, Pedersen O, 2000. **The -238 and -308 G-->A polymorphisms of the tumor necrosis factor alpha gene promoter are not associated with features of the insulin resistance syndrome or altered birth weight in Danish Caucasians.** *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 85, 1731-1734. [[PubMed](#)]
250. Cabrera M, Shaw MA, Sharples C, Williams H, Castes M, Convit J, Blackwell JM, 1995. **Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis.** *The Journal of experimental medicine* 182, 1259-1264. [[PubMed](#)]
251. Fong KY, Howe HS, Tin SK, Boey ML, Feng PH, 1996. **Polymorphism of the regulatory region of tumour necrosis factor alpha gene in patients with systemic lupus erythematosus.** *Annals of the Academy of Medicine, Singapore* 25, 90-93. [[PubMed](#)]
252. Mizuki N, Ohno S, Sato T, Ishihara M, Miyata S, Nakamura S, Naruse T, Mizuki H, Tsuji K, Inoko H, 1995. **Microsatellite polymorphism between the tumor necrosis factor and HLA-B genes in Behcet's disease.** *Hum Immunol* 43, 129-135. [[PubMed](#)]

253. Nadel S, Newport MJ, Booy R, Levin M, 1996. **Variation in the tumor necrosis factor-alpha gene promoter region may be associated with death from meningococcal disease.** *The Journal of infectious diseases* 174, 878-880. [[PubMed](#)]
254. Verjans GM, Brinkman BM, Van Doornik CE, Kijlstra A, Verweij CL, 1994. **Polymorphism of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) at position -308 in relation to ankylosing spondylitis.** *Clinical and experimental immunology* 97, 45-47. [[PubMed](#)]
255. Wilson AG, Clay FE, Crane AM, Cork MJ, Duff GW, 1995. **Comparative genetic association of human leukocyte antigen class II and tumor necrosis factor-alpha with dermatitis herpetiformis.** *The Journal of investigative dermatology* 104, 856-858. [[PubMed](#)]
256. Negoro K, Kinouchi Y, Hiwatashi N, Takahashi S, Takagi S, Satoh J, Shimosegawa T, Toyota T, 1999. **Crohn's disease is associated with novel polymorphisms in the 5'-flanking region of the tumor necrosis factor gene.** *Gastroenterology* 117, 1062-1068. [[PubMed](#)]
257. Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AI, Duff GW, 1992. **Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product.** *Human molecular genetics* 1, 353. [[PubMed](#)]
258. Koch M, Rett K, Volk A, Maerker E, Haist K, Weisser M, Rettig A, Renn W, Haring HU, 2000. **The tumour necrosis factor alpha -238 G --> A and -308 G --> A promoter polymorphisms are not associated with insulin sensitivity and insulin secretion in young healthy relatives of Type II diabetic patients.** *Diabetologia* 43, 181-184. [[PubMed](#)]
259. Orchard TR, Chua CN, Ahmad T, Cheng H, Welsh KI, Jewell DP, 2002. **Uveitis and erythema nodosum in inflammatory bowel disease: clinical features and the role of HLA genes.** *Gastroenterology* 123, 714-718. [[PubMed](#)]
260. Altarescu G, Zimran A, Michelakakis H, Elstein D, 2005. **TNF- α levels and TNF- α gene polymorphism in type I Gaucher disease.** *Cytokine* 31, 149-152. [[PubMed](#)]
261. Vieira P, de Waal-Malefyt R, Dang MN, Johnson KE, Kastelein R, Fiorentino DF, deVries JE, Roncarolo MG, Mosmann TR, Moore KW, 1991. **Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor cDNA clones: homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRF1.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 1172-1176. [[PubMed](#)]
262. Pinderski Oslund LJ, Hedrick CC, Olvera T, Hagenbaugh A, Territo M, Berliner JA, Fyfe AI, 1999. **Interleukin-10 blocks atherosclerotic events in vitro and in vivo.** *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 19, 2847-2853. [[PubMed](#)]
263. Terkeltaub RA, 1999. **IL-10: An "immunologic scalpel" for atherosclerosis?** *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 19, 2823-2825. [[PubMed](#)]
264. Esposito K, Pontillo A, Giugliano F, Giugliano G, Marfella R, Nicoletti G, Giugliano D, 2003. **Association of low interleukin-10 levels with the metabolic syndrome in obese women.** *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 88, 1055-1058. [[PubMed](#)]

265. Ma CS, Hare NJ, Nichols KE, Dupre L, Andolfi G, Roncarolo MG, Adelstein S, Hodgkin PD, Tangye SG, 2005. **Impaired humoral immunity in X-linked lymphoproliferative disease is associated with defective IL-10 production by CD4+ T cells.** *The Journal of clinical investigation* 115, 1049-1059. [[PubMed](#)]
266. Chan CC, Whitcup SM, Solomon D, Nussenblatt RB, 1995. **Interleukin-10 in the vitreous of patients with primary intraocular lymphoma.** *American journal of ophthalmology* 120, 671-673. [[PubMed](#)]
267. Cassoux N, Giron A, Bodaghi B, Tran TH, Baudet S, Davy F, Chan CC, Lehoang P, Merle-Beral H, 2007. **IL-10 measurement in aqueous humor for screening patients with suspicion of primary intraocular lymphoma.** *Investigative ophthalmology & visual science* 48, 3253-3259. [[PubMed](#)]
268. Grove J, Daly AK, Bassendine MF, Gilvarry E, Day CP, 2000. **Interleukin 10 promoter region polymorphisms and susceptibility to advanced alcoholic liver disease.** *Gut* 46, 540-545. [[PubMed](#)]
269. Westendorp RG, Langermans JA, Huizinga TW, Elouali AH, Verweij CL, Boomsma DI, Vandenbroucke JP, 1997. **Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease.** *Lancet* 349, 170-173. [[PubMed](#)]
270. Gibson AW, Edberg JC, Wu J, Westendorp RG, Huizinga TW, Kimberly RP, 2001. **Novel single nucleotide polymorphisms in the distal IL-10 promoter affect IL-10 production and enhance the risk of systemic lupus erythematosus.** *J Immunol* 166, 3915-3922. [[PubMed](#)]
271. Shin HD, Winkler C, Stephens JC, Bream J, Young H, Goedert JJ, O'Brien TR, Vlahov D, Buchbinder S, Giorgi J *et al*, 2000. **Genetic restriction of HIV-1 pathogenesis to AIDS by promoter alleles of IL10.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 14467-14472. [[PubMed](#)]
272. Rosenwasser LJ, Borish L, 1997. **Genetics of atopy and asthma: the rationale behind promoter-based candidate gene studies (IL-4 and IL-10).** *American journal of respiratory and critical care medicine* 156, S152-155. [[PubMed](#)]
273. Alamartine E, Berthoux P, Mariat C, Cambazard F, Berthoux F, 2003. **Interleukin-10 promoter polymorphisms and susceptibility to skin squamous cell carcinoma after renal transplantation.** *The Journal of investigative dermatology* 120, 99-103. [[PubMed](#)]
274. Asadullah K, Eskdale J, Wiese A, Gallagher G, Friedrich M, Sterry W, 2001. **Interleukin-10 promoter polymorphism in psoriasis.** *The Journal of investigative dermatology* 116, 975-978. [[PubMed](#)]
275. Shin HD, Park BL, Kim LH, Jung JH, Kim JY, Yoon JH, Kim YJ, Lee HS, 2003. **Interleukin 10 haplotype associated with increased risk of hepatocellular carcinoma.** *Human molecular genetics* 12, 901-906. [[PubMed](#)]
276. Summers AM, Summers CW, Drucker DB, Hajeer AH, Barson A, Hutchinson IV, 2000. **Association of IL-10 genotype with sudden infant death syndrome.** *Hum Immunol* 61, 1270-1273. [[PubMed](#)]
277. Fowler EV, Eri R, Hume G, Johnstone S, Pandeya N, Lincoln D, Templeton D, Radford-Smith GL, 2005. **TNFalpha and IL10 SNPs act together to predict disease behaviour in Crohn's disease.** *Journal of medical genetics* 42, 523-528. [[PubMed](#)]

278. Moraes MO, Pacheco AG, Schonkeren JJ, Vanderborcht PR, Nery JA, Santos AR, Moraes ME, Moraes JR, Ottenhoff TH, Sampaio EP *et al*, 2004. **Interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms as markers for disease susceptibility and disease severity in leprosy.** *Genes and immunity* 5, 592-595. [[PubMed](#)]
279. Malhotra D, Darvishi K, Sood S, Sharma S, Grover C, Relhan V, Reddy BS, Bamezai RN, 2005. **IL-10 promoter single nucleotide polymorphisms are significantly associated with resistance to leprosy.** *Human genetics* 118, 295-300. [[PubMed](#)]
280. Hunninghake GM, Soto-Quiros ME, Lasky-Su J, Avila L, Ly NP, Liang C, Klanderman BJ, Raby BA, Gold DR, Weiss ST *et al*, 2008. **Dust mite exposure modifies the effect of functional IL10 polymorphisms on allergy and asthma exacerbations.** *The Journal of allergy and clinical immunology* 122, 93-98, 98 e91-95. [[PubMed](#)]
281. Wang MH, Helzlsouer KJ, Smith MW, Hoffman-Bolton JA, Clipp SL, Grinberg V, De Marzo AM, Isaacs WB, Drake CG, Shugart YY *et al*, 2009. **Association of IL10 and other immune response- and obesity-related genes with prostate cancer in CLUE II.** *Prostate* 69, 874-885. [[PubMed](#)]
282. Juo SH, Wu R, Lin CS, Wu MT, Lee JN, Tsai EM, 2009. **A functional promoter polymorphism in interleukin-10 gene influences susceptibility to endometriosis.** *Fertil Steril* 92, 1228-1233. [[PubMed](#)]
283. Amre D, Mack D, Morgan K, Israel D, Lambrette P, Costea I, Krupoves A, Fegury H, Dong J, Grimard G, 2009. **Interleukin 10 (IL-10) gene variants and susceptibility for paediatric onset Crohn's disease.** *Alimentary pharmacology & therapeutics* 29, 1025-1031. [[PubMed](#)]
284. Cochery-Nouvellon E, Nguyen P, Attaoua R, Cornillet-Lefebvre P, Mercier E, Vitry F, Gris JC, 2009. **Interleukin 10 gene promoter polymorphisms in women with pregnancy loss: preferential association with embryonic wastage.** *Biol Reprod* 80, 1115-1120. [[PubMed](#)]
285. Wallace GR, Kondeatis E, Vaughan RW, Verity DH, Chen Y, Fortune F, Madanat W, Kanawati CA, Graham EM, Stanford MR, 2007. **IL-10 genotype analysis in patients with Behçet's disease.** *Hum Immunol* 68, 122-127. [[PubMed](#)]
286. Lorenz F, Pawlowicz E, Klimkowska M, Beshara S, Bulanda Brustad A, Skotnicki AB, Wahlin A, Machaczka M, 2018. **Ferritinemia and serum inflammatory cytokines in Swedish adults with Gaucher disease type 1.** *Blood cells, molecules & diseases* 68, 35-42. [[PubMed](#)]
287. Boulanger MJ, Chow DC, Brevnova EE, Garcia KC, 2003. **Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex.** *Science* 300, 2101-2104. [[PubMed](#)]
288. Zilberstein A, Ruggieri R, Korn JH, Revel M, 1986. **Structure and expression of cDNA and genes for human interferon-beta-2, a distinct species inducible by growth-stimulatory cytokines.** *The EMBO journal* 5, 2529-2537. [[PubMed](#)]
289. Kawano M, Hirano T, Matsuda T, Taga T, Horii Y, Iwato K, Asaoku H, Tang B, Tanabe O, Tanaka H *et al*, 1988. **Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas.** *Nature* 332, 83-85. [[PubMed](#)]

290. Santhanam U, Ray A, Sehgal PB, 1991. **Repression of the interleukin 6 gene promoter by p53 and the retinoblastoma susceptibility gene product.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 7605-7609. [[PubMed](#)]
291. Roodman GD, Kurihara N, Ohsaki Y, Kukita A, Hosking D, Demulder A, Smith JF, Singer FR, 1992. **Interleukin 6. A potential autocrine/paracrine factor in Paget's disease of bone.** *The Journal of clinical investigation* 89, 46-52. [[PubMed](#)]
292. Scheidt-Nave C, Bismar H, Leidig-Bruckner G, Woitge H, Seibel MJ, Ziegler R, Pfeilschifter J, 2001. **Serum interleukin 6 is a major predictor of bone loss in women specific to the first decade past menopause.** *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 86, 2032-2042. [[PubMed](#)]
293. de Groof F, Joosten KF, Janssen JA, de Kleijn ED, Hazelzet JA, Hop WC, Uitterlinden P, van Doorn J, Hokken-Koelega AC, 2002. **Acute stress response in children with meningococcal sepsis: important differences in the growth hormone/insulin-like growth factor I axis between nonsurvivors and survivors.** *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 87, 3118-3124. [[PubMed](#)]
294. Kiecolt-Glaser JK, Preacher KJ, MacCallum RC, Atkinson C, Malarkey WB, Glaser R, 2003. **Chronic stress and age-related increases in the proinflammatory cytokine IL-6.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 9090-9095. [[PubMed](#)]
295. Seddon JM, George S, Rosner B, Rifai N, 2005. **Progression of age-related macular degeneration: prospective assessment of C-reactive protein, interleukin 6, and other cardiovascular biomarkers.** *Arch Ophthalmol* 123, 774-782. [[PubMed](#)]
296. Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, Ganz T, 2004. **IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin.** *The Journal of clinical investigation* 113, 1271-1276. [[PubMed](#)]
297. Liuzzi JP, Lichten LA, Rivera S, Blanchard RK, Aydemir TB, Knutson MD, Ganz T, Cousins RJ, 2005. **Interleukin-6 regulates the zinc transporter Zip14 in liver and contributes to the hypozincemia of the acute-phase response.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 6843-6848. [[PubMed](#)]
298. Dai J, Miller AH, Bremner JD, Goldberg J, Jones L, Shallenberger L, Buckham R, Murrah NV, Veledar E, Wilson PW *et al*, 2008. **Adherence to the mediterranean diet is inversely associated with circulating interleukin-6 among middle-aged men: a twin study.** *Circulation* 117, 169-175. [[PubMed](#)]
299. Ota N, Hunt SC, Nakajima T, Suzuki T, Hosoi T, Orimo H, Shirai Y, Emi M, 1999. **Linkage of interleukin 6 locus to human osteopenia by sibling pair analysis.** *Human genetics* 105, 253-257. [[PubMed](#)]
300. Ota N, Nakajima T, Nakazawa I, Suzuki T, Hosoi T, Orimo H, Inoue S, Shirai Y, Emi M, 2001. **A nucleotide variant in the promoter region of the interleukin-6 gene associated with decreased bone mineral density.** *Journal of human genetics* 46, 267-272. [[PubMed](#)]

301. Chung HW, Seo JS, Hur SE, Kim HL, Kim JY, Jung JH, Kim LH, Park BL, Shin HD, 2003. **Association of interleukin-6 promoter variant with bone mineral density in pre-menopausal women.** *Journal of human genetics* 48, 243-248. [[PubMed](#)]
302. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P, 1998. **The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis.** *The Journal of clinical investigation* 102, 1369-1376. [[PubMed](#)]
303. **rs1800795** [<https://www.snpedia.com/index.php/Rs1800795>]

BIOGRAFIJA AUTORA

Predrag Rodić je rođen 14. marta 1976. godine u Šapcu. Osnovnu školu i gimnaziju u Šapcu je završio sa odličnim uspehom.

Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu je upisao 1995. godine i diplomirao 2002. godine sa prosečnom ocenom 9,37.

Tokom studija, godinu dana je radio kao demonstrator na katedri Anatomije, školske 1996/97. godine.

Dobitnik je stipendije Norveške kraljevske ambasade za odličan uspeh, tokom studija medicine.

Od maja 2004. godine, volontirao je na Univerzitetškoj dečjoj klinici u Beogradu u Službi za hematologiju i onkologiju, a od jula 2006. godine je zaposlen za stalno u gore navedenoj ustanovi.

Poslediplomske studije, Magisterijum iz hematologije upisao je 2004. godine. Zvanje Magistra medicinskih nauka iz oblasti hematologija stekao je 21. juna 2010. god. odbranivši magistarsku tezu pod nazivom “Procena funkcije monocita i limfocita kod Gaucher-ove bolesti – korelacija sa težinom bolesti”, mentor prof. dr Dragana Janić. Specijalizaciju iz oblasti Pedijatrija započeo je oktobra 2008. godine, a specijalistički ispit položio je sa odličnim uspehom 21.01.2013. godine.

Izabran je u zvanje kliničkog asistenta na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, početkom školske 2014/2015. godine.

Učestvovao je na Seminaru o dijagnostičkim metodama u dečjim reumatskim bolestima, u Beogradu, 2007. godine. Naredne godine je, kao dobitnik stipendije Reach the World Award, učestvovao na sastanku Međunarodnog udruženja o trombozi i hemostazi u Beču. Imao je aktivno učešće, kao predavač na 15. međunarodnom sastanku Dunavske lige za trombozu i hemoragijske poremećaje u Beogradu, 2009. godine, kao i na seminaru o komunikaciji i empatiji za medicinsko osoblje sa dečjih hemato-onkoloških odeljenja. Iste godine je pohađao kurs obuke za lekare o Gošeovoj bolesti u Amsterdamu. Oktobra 2010. godine bio je predavač na Prvom kongresu pedijatarata Srbije sa međunarodnim učešćem u Beogradu, kao i predavač na stručnom sastanku Pedijatrijske sekcije Srpskog lekarskog

društva „Nove dijagnostičke metode u pedijatriji“ u Beogradu. 2011. godine je učestvovao na 16. međunarodnom sastanku Dunavske lige za trombozu i hemoragijske poremećaje u Temišvaru, a 2012. na naprednom kursu o trombozi i hemostatskim poremećajima, u organizaciji Međunarodnog udruženja za trombozu i hemostazu (ISTH) u Beogradu. Takođe je uzeo učešća i na 17. međunarodnom sastanku Dunavske lige za trombozu i hemoragijske poremećaje, u gradu Hradec Kralove, 2013. godine. Iste godine je održao i predavanje na Oktobarskim danima Univerzitetske dečje klinike u Beogradu. 2014. godine je učestvovao na ekspertskom sastanku o Gošeovoj bolesti u Frankfurtu, kao i na Drugom Kongresu pedijataru Srbije, Kongresu transfuziologa Srbije i na Pedijatrijskim sekcijama Srpskog lekarskog društva, kao i Oktobarskim danima Dečje klinike. U narednoj, 2015. godini, je bio predavač na Oktobarskim danima Dečje klinike, a uzeo je učešća i na skupu Udruženja za hemostazu i trombozu Srbije. U protekloj, 2016. godini je bio predavač na domaćem kursu 1. kategorije o lečenju i nezi dece sa hematološkim oboljenjima i kao predavač na Pedijatrijskim danima Srbije u Nišu.

Učesnik je brojnih drugih međunarodnih i domaćih kongresa i simpozijuma na kojima je prezentovao radove.

Aktivno govori engleski i nemački jezik i pasivno se služi francuskim, italijanskim, ruskim i finskim jezikom. Živi u Beogradu i otac je dvoje dece.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Predrag Rodić
broj upisa _____

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

UTICAJ KLONALNOSTI B LIMFOCITA I POLIMORFIZAMA GENA ZA CITOKINE
NA TEŽINU KLINIČKE SLIKE I POJAVU MONOKLONSKE GAMAPATIJE U
BOLESNIKA SA GOŠEOVOM BOLEŠĆU

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 23.4.2018. godine

Predrag Rodić

Prilog 2.

**Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije
doktorskog rada**

Ime i prezime autora Predrag Rodić

Broj upisa _____

Studijski program _____

Naslov rada UTICAJ KLONALNOSTI B LIMFOCITA I POLIMORFIZAMA GENA

ZA CITOKINE NA TEŽINU KLINIČKE SLIKE I POJAVU MONOKLONSKE

GAMAPATIJE U BOLESNIKA SA GOŠEOVOM BOLEŠĆU

Mentor Prof. dr Dragana Janić

Potpisani Predrag Rodić

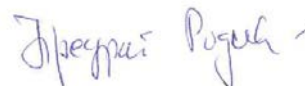
izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 23.4.2018. godine



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo

2. Autorstvo - nekomercijalno

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima

5. Autorstvo – bez prerade

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 23.4.2018. godine