

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Miša M. Vreća

**EKSPRESIJE GENA MARKERA  
INFLAMACIJE I FIBROZE I GENA  
KANDIDATA ZA OPTIMIZOVANU  
ĆELIJSKU TERAPIJU KOD PACIJENATA  
SA SISTEMSKOM SKLEROZOM**

Doktorska disertacija

Beograd, 2018. godine

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF BIOLOGY

Misa M. Vreca

**EXPRESSION OF GENES ASSOCIATED  
WITH INFLAMMATION AND FIBROSIS  
AND CANDIDATE GENES FOR CELL  
THERAPY OPTIMIZATION IN PATIENTS  
WITH SYSTEMIC SCLEROSIS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018.

Mentori:

**dr Vesna Spasovski**, naučni saradnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

**dr Sonja Pavlović**, naučni savetnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

Komisija:

**dr Vesna Spasovski**, naučni saradnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

**dr Sonja Pavlović**, naučni savetnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

**dr Goran Brajušković**, redovni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

**dr Nemanja Damjanov**, redovni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

**dr Svetlana Radović**, redovni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: \_\_\_\_\_ godine

*Ovaj rad je realizovan u Laboratoriji za molekularnu biomedicinu na Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu.*

*Ovom prilikom bih se zahvalila od srca svim kolegama iz Laboratorije za molekularnu biomedicinu, mentorima i članovima komisije, dragim prijateljima i članovima porodice.*

*Mojoj majci*

## **Ekspresije gena markera inflamacije i fibroze i gena kandidata za optimizovanu ćelijsku terapiju kod pacijenata sa sistemskom sklerozom**

### **Rezime**

Sistemska skleroza (SSc) je retka, heterogena, multisistemska, autoimuna bolest nepoznate etiologije sa varijabilnim kliničkim manifestacijama i nepredvidivim i često letalnim ishodom. Osnovne karakteristike ove bolesti su poremećaji u imunom sistemu i inflamacija, vaskulopatija, preterana produkcija komponenti vanćelijskog matriksa i progresivna fibroza kože i unutrašnjih organa. Pronalaženje novih biomarkera, koji bi omogućili bolje razumevanje patogeneze same bolesti, bilo bi od presudne važnosti za ranije uspostavljanje dijagnoze, bolju klasifikaciju pacijenata i primenu adekvatnije terapije. Stoga je u okviru ove teze ispitana asocijacija odabranih genetičkih varijanti u genima *IRAK1* i *miRNK-146a* sa predispozicijom za razvoj SSc. Takođe, u cilju otkrivanja potencijalno novih i pouzdanih biomarkera praćena je ekspresija odabranih učesnika signalnih puteva JAK2/STAT3 i NF-κB, uključenih u proces inflamacije na sistemskom i proces fibroze na lokalnom nivou. Upotreba ćelijske terapije u lečenju oštećenja malih zglobova kod ovih pacijenata jedan je od potencijalno novih terapijskih pristupa. Uprkos rastućem znanju i upotrebi mezenhimskih matičnih ćelija izolovanih iz adipoznog tkiva (aMMĆ) u ćelijskoj terapiji, veoma malo se zna kako gajenje ovih ćelija u laboratorijskim uslovima utiče na njihovu sposobnost samoobnove i potencijal za diferencijaciju u hondrocite. U cilju ispitivanja uticaja dužine gajenja ćelija na njihovu sposobnost samoobnove i potencijala za hondrogenu diferencijaciju, praćena je ekspresija gena markera matičnosti i hondrogene diferencijacije tokom *in vitro* kultivacije ovih ćelija.

Studija asocijacije odabranih genetičkih varijanti, *IRAK1* rs3027898 C>A i *miRNK-146a* rs2910164 G>C izvedena je na grupi od 102 SSc pacijenata i 66 zdravih ispitanika, direktnim sekvenciranjem po Sangeru. Relativna kvantifikaciona analiza ekspresije gena *IL6*, *JAK2*, *STAT3*, *TLR7*, *TLR9*, *IRAK1* i *miRNK-146a* u mononuklearnim ćelijama periferne krvi (MNĆPK), izvršena je na podgrupi od 50 SSc pacijenata i 13 zdravih ispitanika, dok je ekspresiona analiza odabranih gena na lokalnom nivou izvedena na uzorcima tkiva kože, sa i bez fibrotičnih promena, poreklom iz 5 SSc pacijenata. Nakon fenotipske karakterizacije

matičnih ćelija poreklom iz masnog tkiva 4 pacijenta, za ispitivanje uticaja dugotrajne *in vitro* propagacije ovih ćelija u kulturi na njihove karakteristike, pratili su se, tokom ranog i kasnog pasaža, tokom hondrogene diferencijacije, ekspresioni nivoi gena matičnosti *OCT4* i *NANOG*, i gena *SOX5*, *SOX6*, *SOX9* i *COL1A1*, uključenih u najranije faze hondrogeneze. Sve ekspresione analize vršene su metodom RT-qPCR.

Rezultati studije asocijacije na našoj grupi pacijenata ukazali su na to da varijanta *IRAK1* rs3027898 nije predisponirajući faktor za nastanak SSc. Analiza distribucije genotipa za varijantu *miRNK-146a* rs2910164 pokazala je da nosioci CC genotipa imaju 10 puta veću šansu za razvoj plućne fibroze i aktivnog oblika bolesti u odnosu na nosioce GG i GC genotipa.

Na sistemskom nivou, kod SSc pacijenata, detektovane su povišene ekspresije gena *IL6* i *TLR7*, kao i snižene ekspresije gena *TLR9*, *JAK2*, *IRAK1* i *miRNK-146a*. Ekspresije gena *JAK2*, *IRAK1* i *miRNK-146a* pokazale su se kao polno specifične. Izmenjene ekspresije gena *TLR7*, *IRAK1* i *miRNK-146a*, usled asociiranosti sa određenom kliničkim simptomom, predstavljaju potencijalne markere za bolju stratifikaciju SSc pacijenata. Preliminarna analiza relativnih ekspresija odabranih gena na lokalnom nivou, pokazala je snažan trend ka redukciji ekspresije svih ispitivanih gena u uzorcima tkiva kože sa fibrotičnim promenama u odnosu na tkivo bez promena poreklom iz istog pacijenta.

Merenjem ekspresije gena markera matičnosti, *OCT4* i *NANOG*, tokom *in vitro* propagacije aMMĆ u kulturi, dobija se uvid o razlikama u sposobnosti samoobnavljanja ovih ćelija poreklom iz različitih pacijenata, jer su rezultati dobijeni ispitivanjem ekspresije ovih gena u ranom i kasnom pasažu, pokazali različit trend kod analiziranih pacijenata. Kvantifikaciona analiza ekspresije odabranih gena, pre i nakon hondrogene difrencijacije u *in vitro* uslovima, pokazala je da geni *SOX5*, *SOX6* i *COL1A1* pokazuju isti trend povećanja ekspresije u difrenciranim u odnosu na nediferencirane ćelije, kako u ranom tako i u kasnom pasažu. Ovi rezultati pokazuju da ovi geni mogu biti potencijalno dobri prognostički markeri za praćenje potencijala aMMĆ za hondroenu diferencijaciju.

Rezultati ove studije pružili su nove uvide u složenu i nedovoljno istraženu genetičku osnovu SSc i ukazali da ispitivana genetička varijanta *miRINK-146a* rs2910164 predstavlja faktor rizika za razvoj plućne fibroze i aktivnog oblika bolesti kod obolelih od SSc. Takođe, rezultati kvantifikacionih analiza ukazuju na to da su izmenjena ekspresija analiziranih gena i njihove narušene međusobne interakcije uključene u mehanizam nastanka i održavanja procesa inflamacije u SSc na sistemskom nivou, i da mogu predstavljati potencijalno nove i pouzdane biomarkeri za SSc, ali i markere koji mogu doprineti boljoj klasifikaciji, praćenju toka bolesti i prognozi ishoda. Preliminarna analiza ekspresionih profila gena uključenih u proces fibroze na lokalnom nivou ukazala je na to da je izmenjena ekspresija odabranih gena uključena u patološki proces zarastanja rana i posledični nastanak fibroze. Osim toga, rezultati ove studije pružili su nove informacije o uticaju broja ćelijskih ciklusa pri propagaciji aMMĆ u ćelijskoj kulturi na održavanje matičnosti aMMĆ i njihovog potencijala za hondrovenu diferencijaciju. Ovakav pristup može doprineti dodatnoj optimizaciji ovog personalizovanog terapijskog pristupa. Razumevanje biologije matičnih ćelija će dovesti do saznanja o tome koji geni su ključni za uspeh terapije i njihova se ekspresija može koristiti kao biomarker za optimizaciju i individualizaciju lečenja artritisa malih zglobova kod SSc pacijenata.

**Ključne reči:** Sistemska skleroza, inflamacija, fibroza, biomarkeri, analiza ekspresije gena, signalni put JAK2/STAT3, signalni put NF- $\kappa$ B, mezenhimske matične ćelije izolovane iz adipoznog tkiva - aMMĆ, optimizacija ćelijske terapije

**Naučna oblast:** Molekularna biologija eukariota

**Uža naučna oblast:** Molekularna genetika

**UDK broj:** 575.117: [[616-002.17+611.018.5]+[616-002.17+611.018.7]](043.3)

## **Expression of genes associated with inflammation and fibrosis and candidate genes for cell therapy optimization in patients with systemic sclerosis**

### Abstract

Systemic sclerosis (SSc) is a rare heterogeneous, multisystem, autoimmune disease with unknown etiology, characterized with variable clinical manifestations, and unpredictable and often lethal outcome. The basic mechanism of the disease appears to involve aberrant immune activation and inflammation, vasculopathy, overproduction of extracellular matrix proteins and progressive fibrosis of skin and internal organs. The identification of novel biomarkers will not only enable a better understanding of the disease pathogenesis, but also contribute to earlier establishment of diagnosis, better classification of patients, and the application of more appropriate therapy. Therefore, within this thesis, it was examined the association of selected genetic variants in the *IRAK1* and *miRNA-146a* genes with the predisposition for development of SSc. In order to discover potentially novel and reliable biomarkers, the expression of selected participants of JAK2/STAT3 and NF- $\kappa$ B signal pathways, involved in the process of inflammation at the systemic and process of fibrosis at the local level, was examined. Stem cell therapy, is one of the potential new therapeutic approaches in the treatment of small-joint damage in SSc patients. Despite growing knowledge and utilization of adipose tissue-derived mesenchymal stem cell (aMSC) in therapy, very little known about how prolonged cultivation of these cells in laboratory conditions affects their ability for self-renewal and their potential for differentiation into functional chondrocytes. In order to investigate the influence of the long-term *ex vivo* cultivation on their potency and potential for chondrogenic differentiation, the expression of genes, markers of stemness, as well as markers for chondrogenic differentiation, during prolonged *in vitro* aMSC cultivation, was investigated.

The association study between selected genetic variants, *IRAK1* rs3027898 C> A and *miRNA-146a* rs2910164 G> C, and susceptibility to SSc was performed on a group of 102 SSc patients and 66 healthy subjects, by Sanger sequencing. Relative quantification analysis of the *IL6*, *JAK2*, *STAT3*, *TLR7*, *TLR9*, *IRAK1* and *miRNA-146a* gene expressions in peripheral blood mononuclear cells, were performed on a subgroup of 50 SSc patients and



13 healthy subjects, while the expression analyzes of selected genes at the local level were performed on skin tissue samples, with and without fibrotic changes, originating from 5 SSc patients. After phenotypic characterization of MSC derived from adipose tissue of 4 patients, for examining the effect of long-term *in vitro* propagation of these cells in culture on their characteristics, the expression levels of stemness genes, *OCT4* and *NANOG*, and genes involved in the earliest stages of chondrogenesis, *SOX5*, *SOX6*, *SOX9*, and *COL1A1*, were determined during early and late passage, during the course of chondrogenic differentiation. All expression analyzes were performed using the RT-qPCR method.

The results of the association study on our patient group indicated that the *IRAK1* rs3027898 variant is not a predisposing factor for the development of SSc. The analysis of the genotype distribution for the *miRNA-146a* rs2910164 variant showed that carriers of the CC genotype have a 10 times greater chance for developing pulmonary fibrosis and the active form of the disease.

At systemic level, the elevation of *IL6* and *TLR7*, and reduction of *TLR9*, *JAK2*, *IRAK1* and *miRNA-146a* gene expression was detected in SSc patients . The expression of the *JAK2*, *IRAK1* and *miRNA-146a* genes was shown to be gender specific. The altered expression of the *TLR7*, *IRAK1* and *miRNA-146a* genes, due to its association with a particular clinical symptoms, might present a potential markers for better stratification of SSc patients. Preliminary analysis of relative expression of the selected genes at the local level, showed a strong trend towards reducing the expression of all examined genes in skin tissue samples with fibrotic changes in comparison with the tissue without changes, originating from the same patient.

By measuring the expression levels of the stemness genes, *OCT4* and *NANOG*, during *in vitro* propagation of aMSC in culture, we got an insight into the differences in the self-renewal ability of these cells between patients. The results obtained by monitoring the expression of these genes in early and late passage, showed a different trend of expression changes in analyzed patients. The quantification analysis of the expression of selected genes, during the course of chondrogenic differentiation in *in vitro* conditions, showed that the genes

*SOX5*, *SOX6*, and *COL1A1* exhibit the same trend towards increasing their expression in differentiated compared to undifferentiated cells, both in the early and late passage. These results show that these genes may be potentially good prognostic markers for monitoring the potential of aMSC for chondrogenic differentiation.

The results from this study provided new insights into the complex and insufficiently investigated genetic basis of SSc and indicated that the investigated *miRNA-146a* rs2910164 genetic variant, represents a risk factor for the development of pulmonary fibrosis and active form of disease in SSc patients. The results of the quantification analyzes indicated that changed expression of the analyzed genes and their altered interactions are involved in the mechanism for appearance and maintenance of the inflammation process at the systemic level in SSc, and that they can represent potentially novel and reliable biomarkers for SSc, but also markers that can contribute to better classification, disease monitoring and outcome prediction. Preliminary analysis of gene expression profiles involved in the process of fibrosis at the local level, indicated that altered expression of selected genes was involved in the pathological process of wound healing and consequent fibrosis. In addition, the results of this study provided new information on the impact of the number of cell cycles on maintaining the aMSC self-renewal ability and potential for chondrogenic differentiation. This approach can contribute to the additional optimization of this personalized therapeutic approach. The understanding of the stem cell biology can provide knowledge about crucial genes for the therapy success and their expression levels can be used as biomarkers for the optimization and individualization of treatment of small joint arthritis in SSc patients.

**Keywords:** Systemic sclerosis, inflammation, fibrosis, gene expression analyzes, biomarkers, signal pathway JAK2/STAT3, signal pathway NF-kB, adipose tissue-derived MSC, optimization of cell therapy

**Research area:** Molecular Biology of Eukaryotes

**Area of special interest:** Molecular Genetics

**UDC number:** 575.117: [[616-002.17+611.018.5]+[616-002.17+611.018.7]](043.3)

## Lista skraćenica:

SSc- sistemska skleroza	PAMP- molekularni paterni asocirani sa patogenima
AB- autoimune bolesti	DAMP- molekuli koji se oslobađaju oštećenjem ćelijskih struktura
ACR- Američki koledž za reumatologiju	ICAM1- intracelularni adhezivni molekul 1
EULAR- Evropska liga za borbu protiv reumatizma	VCAM1- vaskularni ćelijski adhezivni molekul 1
mRSS- modifikovani Rodnanov kožni indeks	MCP1- monocitni hemotaksični protein 1
VC- vitalni kapacitet pluća	DĆ- dendritične ćelije
DLCO- difuzni kapacitet pluća za ugljen-monoksid	miRNK- mikro RNK molekuli
HRCT- kompjuterizovana tomografija grudnog koša visoke rezolucije	pre-miRNK- prekursorska miRNK molekula
dSSc-difuzni oblik SSc	3'-UTR- 3'- netranslatirajući region
ISSc- limitirani/ograničeni oblik SSc	SNV- zamena jednog nukleotida
ATA- anti-topoizomerazna antitela	PCR- reakcija lančanog umnožavanja
ACA - anti-centromerna antitela	qPCR- PCR u realnom vremenu
PAH- plućna arteriska hipertenzija	RT-qPCR- PCR u realnom vremenu kome predhodi reverzna transkripcija
IPF- idiopatska plućna fibroza	VĆM- vanćelijski matriks
SLE- sistemska eritemski lupus	MMĆ- mezenhimske matične ćelije
RA- reumatoidni artritis	aMMĆ- MMĆ poreklom iz masnog tkiva
MS- multipla skleroza	$\alpha$ SMA- $\alpha$ -aktinina glatkih mišićnih ćelija
IBD- inflamatorne bolesti creva	HWE- Hardy-Vajnbergova ravnoteža
SS- Sjögrenov sindrom	OR- količnik verovatnoće
PsA- psorijatični artritis	CI- 95% interval poverenja
MNĆPK- mononuklearne ćelija periferne krvi	ROC- mera kvaliteta prediktivnog modela
NK- nukleinska kiselina	
IK- imuno kompleksi	

## Sadržaj:

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
1. 1. Sistemska skleroza .....	2
1.2. Inflamacija.....	4
1.2.1. IL6 .....	5
1.2.2. Signalni put JAK2/STAT3 .....	6
1.2.3. Intracelularni receptori TLR7 i TLR9 .....	8
1.2.4. IRAK1 .....	10
1.2.5. MiRNK-146a.....	13
1.2.6. Značaj tačkastih varijanti u genima <i>IRAK1</i> i <i>miRNK-146a</i> .....	14
1.3. Fibroza.....	15
1.3.1. Signalni putevi uključeni u nastanak fibroze.....	19
1.4. Degenerativne promene u koštano-zglobnom sistemu SSc pacijenata .....	21
1.4.1. Humane adultne mezenhimske matične ćelije poreklom iz masnog tkiva .....	23
<b>2. CILJEVI.....</b>	<b>25</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE .....</b>	<b>28</b>
3.1. Ispitanici.....	29
3.2. Izolacija DNK iz periferne krvi.....	33
3.3. Izolacija mononuklearnih ćelija iz periferne krvi.....	34
3. 4. Izolacija RNK iz mononuklearnih ćelija .....	34
3. 5. Izolacija RNK iz uzoraka bioptiranog tkiva kože .....	35
3. 6. Reakcija lančanog umnožavanja DNK.....	37
3. 7. Analiza DNK fragmenata elektroforezom na agaroznom gelu .....	37
3. 8. Reverzna transkripcija.....	37
3.9. Provera kvaliteta sintetisane cDNK .....	38
3. 10. Praćenje ekspresije gena pomoću metode PCR u realnom vremenu (qPCR) .....	39
3. 11. Relativna kvantifikacija.....	41
3. 11. 1. Određivanje relativne ekspresije gena <i>IL6</i> , <i>JAK2</i> , <i>STAT3</i> , <i>TLR7</i> , <i>TLR9</i> i <i>IRAK1</i> .....	42
3. 11. 2. Određivanje relativne ekspresije miRNK-146a.....	44
3. 12. Metoda sekvenciranja po Sangeru.....	45

3.12.1. Identifikacija varijanti u genima <i>IRAK1</i> i <i>miRNK-146a</i> .....	46
3.13. Mezenhimske matične ćelije poreklom iz masnog tkiva.....	48
3.13.1. Priprema autolognog seruma.....	49
3.13.2. Izolacija mezenhimskih matičnih ćelija iz masnog tkiva .....	49
3.13.3. Gajenje i propagacija ćelija u kulturi.....	51
3.14. Fenotipska karakterizacija aMMĆ .....	52
3.14.1. Karakterizacija aMMĆ protočnom citofluorimetrijom .....	52
3.14.2. Osteogena diferencijacija <i>in vitro</i> i detekcija depozita Ca <sup>2+</sup> specifičnim bojenjem.....	53
3.14.3. Hondrogena diferencijacija <i>in vitro</i> i detekcija komponenti VCM hrskavice specifičnim bojenjem.....	54
3.15. Određivanje relativne ekspresije gena <i>OCT4</i> , <i>NANOG</i> , <i>SOX5</i> , <i>SOX6</i> , <i>SOX9</i> i <i>COL1A1</i> ....	55
3.16. Statistička obrada podataka .....	57
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>59</b>
4.1. Kvantifikacija ekspresije gena uključenih u proces inflamacije kod SSc pacijenata .....	60
4.1.1. Analiza relativne ekspresije gena <i>IL6</i> u MNČPK SSc pacijenata i kontrolnih ispitanika 60	
4.1.2. Analiza relativne ekspresije gena <i>JAK2</i> u MNČPK SSc pacijenata i kontrolnih ispitanika .....	61
4.1.3. Analiza relativne ekspresije gena <i>STAT3</i> u MNČPK SSc pacijenata i kontrolnih ispitanika .....	63
4.1.4. Analiza relativne ekspresije gena <i>TLR7</i> u MNČPK SSc pacijenata i kontrolnih ispitanika .....	64
4.1.5. Analiza relativne ekspresije gena <i>TLR9</i> u MNČPK SSc pacijenata i kontrolnih ispitanika .....	65
4.1.6. Analiza relativne ekspresije gena <i>IRAK1</i> u MNČPK SSc pacijenata i kontrolnih ispitanika .....	66
4.1.7. Analiza relativne ekspresije <i>miRNK-146a</i> u MNČPK SSc pacijenata i kontrolnih ispitanika .....	68
4.1.8. Korelacione analize parova ispitivanih gena na sistemskom nivou u grupi SSc pacijenata i kontrolnoj grupi.....	69
4.2. Ispitivanje uticaja genetičkih varijanti u genima <i>IRAK1</i> i <i>miRNK-146a</i> na rizik za nastanak i progresiju SSc .....	71
4.2.1. Asocijacija genetičke varijante rs3027898 C>A sa rizikom za nastanak SSc.....	71
4.2.2. Asocijacija genetičke varijante rs2910164 C>G sa rizikom za nastanak SSc.....	73

4.2.3. Uticaj genetičkih varijanti u genima <i>IRAK1</i> i <i>miRNK-146a</i> na njihove ekspresione profile .....	75
4.3. Preliminarna analiza ekspresije gena uključenih u proces fibroze kod SSc pacijenata.....	76
4.3.1. Analiza relativne ekspresije gena <i>JAK2</i> u uzorcima biopsije kože SSc pacijenata.....	76
4.3.2. Analiza relativne ekspresije gena <i>TLR7</i> u uzorcima biopsije kože SSc pacijenata.....	77
4.3.3. Analiza relativne ekspresije gena <i>TLR9</i> u uzorcima biopsije kože SSc pacijenata.....	77
4.3.4. Analiza relativne ekspresije gena <i>IRAK1</i> u uzorcima biopsije kože SSc pacijenata.....	78
4.3.5. Analiza relativne ekspresije <i>miRNK-146a</i> u uzorcima biopsije kože SSc pacijenata.....	79
4.3.6. Korelacione analize parova ispitivanih gena na lokalnom nivou, u uzorcima kože SSc pacijenata.....	79
4.4. Izolacija i fenotipska karakterizacija <i>MMĆ</i> izolovanih iz masnog tkiva pacijenata.....	81
4.4.1. Vizuelizacija fenotipa <i>aMMĆ</i> .....	81
4.4.2. Detekcija specifičnih površinskih markera protočnom citofluorimetrijom.....	82
4.4.3. Potencijal <i>aMMĆ</i> za diferencijaciju.....	82
4.4.3.1. Osteogena diferencijacija <i>aMMĆ</i> .....	83
4.4.3.2. Hondrogena diferencijacija <i>aMMĆ</i> .....	84
4.5. Utvrđivanje ekspresionih profila gena matičnosti i gena uključenih u hondrogenezu tokom dugotrajne <i>in vitro</i> propagacije <i>aMMĆ</i> .....	85
4.5.1. Utvrđivanje ekspresionih profila gena matičnosti <i>OCT4</i> i <i>NANOG</i> .....	85
4.5.2. Utvrđivanje ekspresionih profila gena uključenih u hondrogenu diferencijaciju i sintezu komponenti <i>VČM</i> hrskavice pre i nakon diferencijacije <i>aMMĆ</i> u hondrocite .....	86
<b>5. DISKUSIJA.....</b>	<b>89</b>
5.1. Uloga signalnog puta <i>JAK2/STAT3</i> u SSc i značaj analize ekspresionog profila gena <i>IL6</i> , <i>JAK2</i> i <i>STAT3</i> na sistemskom nivou .....	91
5.1.1. Ekspresioni profil gena <i>IL6</i> na sistemskom nivou .....	91
5.1.2. Ekspresioni profil gena <i>JAK2</i> na sistemskom nivou .....	92
5.1.3. Ekspresioni profil gena <i>STAT3</i> na sistemskom nivou .....	94
5.2. Uloga signalnog puta <i>NF-kB</i> u SSc i značaj analize ekspresionog profila gena <i>TLR7</i> ,.....	94
<i>TLR9</i> i <i>IRAK1</i> i <i>miRNK-146a</i> na sistemskom nivou .....	94
5.2.1. Ekspresioni profil gena <i>TLR7</i> na sistemskom nivou .....	95
5.2.2. Ekspresioni profil gena <i>TLR9</i> na sistemskom nivou .....	97
5.2.3. Ekspresioni profil gena <i>IRAK1</i> na sistemskom nivou .....	98
5.2.4. Ekspresioni profil <i>miRNK-146a</i> na sistemskom nivou.....	99

5.2.5. Korelacione analize parova ispitivanih gena na sistemskom nivou .....	100
5.3. Studija asocijacije genetičkih varijanti u genima <i>IRAK1</i> i <i>miRNK-146a</i> sa rizikom za nastanak i progresiju SSc .....	101
5.3.1. Asocijacija genetičke varijante rs3027898 C>A sa rizikom za nastanak SSc.....	101
5.3.2. Asocijacija genetičke varijante rs2910164 C>G sa rizikom za nastanak SSc.....	102
5.3.3. Uticaj odabranih genetičkih varijanti u genima <i>IRAK1</i> i <i>miRNK-146a</i> na njihove ekspresione profile .....	102
5.4. Ekspresioni profili gena <i>JAK2</i> , <i>TLR7</i> , <i>TLR9</i> , <i>IRAK1</i> i <i>miRNK-146a</i> na lokalnom nivou ...	103
5.5. Mezenhimske matične ćelije poreklom iz masnog tkiva.....	108
5.5.1. Fenotipska karakterizacije MMC poreklom iz masnog tkiva.....	108
5.5.2. Uticaj dužine gajenja aMMC u kulturi na njihovu potentnost i sposobnost hondrogene diferencijacije .....	109
5.5.2.1. Ekspresioni profil gena <i>OCT4</i> i <i>NANOG</i> tokom <i>in vitro</i> propagacije aMMC .....	110
5.5.2.2. Ekspresioni profil gena <i>SOX5</i> , <i>SOX6</i> , <i>SOX9</i> i <i>COL1A1</i> tokom <i>in vitro</i> diferencijacije aMMC u hondrocite .....	111
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>114</b>
<b>7. SPISAK LITERATURE .....</b>	<b>119</b>

# **1. UVOD**



## 1. 1. Sistemska skleroza

Sistemska skleroza (SSc) je heterogena, multisistemska, autoimuna bolest nepoznate etiologije, sa varijabilnim kliničkim manifestacijama i nepredvidivim i često letalnim ishodom (Affandi i sar., 2015; Varga i Abraham, 2007). Osnovne karakteristike ove bolesti su poremećaji u imunom sistemu, inflamacija, mikroangiopatija, preterana produkcija komponenti vanćelijskog matriksa i progresivna intersticijalna i perivaskularna fibroza kože i unutrašnjih organa (Makino i Jinnin, 2016; Varga i Abraham, 2007). Upravo progresivna fibroza unutrašnjih organa, prvenstveno pluća, bubrega i srca, predstavlja glavni faktor rizika za teško zdravstveno stanje i prevremenu smrt kod SSc pacijenata (Iudici i sar., 2015).

Prijavljena stopa prevalencije za SSc je u proseku 1 slučaj na 1000 stanovnika, dok je stopa incidence procenjena na 0,6-19 novih slučajeva obolelih na milion stanovnika godišnje za evropsko stanovništvo (Denton i Black, 2005; Kanecki i sar., 2017). Kao i većina autoimunih bolesti (AB), SSc predstavlja primer imunološkog poremećaja koji se pretežno ispoljava kod osoba ženskog pola, gde na 4-9 obolelih osoba ženskog pola dolazi 1 obolela osoba muškog pola. SSc se veoma retko javlja u mlađem životnom dobu, a maksimalna incidenca je obično između 45 i 64 godine starosti sa nešto ranijom pojavom bolesti kod osoba ženskog pola (Chiffot i sar., 2008; Meier i sar., 2012; Whitacre, 2001).

Prva objektivna promena koja se ispoljava kod više od 95% bolesnika je Raynaudov fenomen koji predstavlja povremene epizodne pojave bledih i modrih prstiju ruku i stopala, usled vazospazma, pri izlaganju hladnoći i/ili pri emocionalnom stresu, praćene sa osećajem boli, pečenja ili pak gubitkom osećaja dodira i otokom, a u ekstremnim slučajevima može rezultovati neugodnim ulceracijama (čirevima) na koži. Najčešće privremeno prolaze zagrevanjem tih delova tela. Osim prstiju šaka i stopala, može se ispoljiti i na ostalim isturenim delovima tela. Raynaudov fenomen uglavnom predhodi ostalim kliničkim znakovima SSc, tako da se može javiti i godinama pre ispoljavanja prvog sledećeg SSc simptoma (Generini i sar., 1996). Ono što sledi nakon Raynaudovog fenomena su uglavnom bezbolni otok i osećaj zatezanja prstiju ruku ili čitavih šaka. Kako koža postaje sve više zategnuta, zadebljala i tvrda, ona postepeno gubi fine nabore i gubi elastičnost, i pojavljuju

se polja hiper ili hipopigmentacije. Lice gubi finu mimiku usled uznaredovale fibroze kože, usni otvor se smanjuje, a oko usana se formiraju brazde, nos postaje sve više vizuelno izdužen, a oči sitnije- što podseća na "ptičiji izgled" (Crincoli i sar., 2016).

Kako je zadebljala i zategnuta koža glavna klinička karakteristika SSc ona predstavlja i osnovu za uspostavljanje dijagnoze prema važećim klasifikacionim kriterijumima uspostavljenim 2013. godine od strane Američkog koledža za reumatologiju (ACR) i Evropske lige za borbu protiv reumatizma (EULAR). Pacijenti sa SSc obično se klasifikuju u dve dobro poznate kliničke podgrupe na osnovu obrasca i stepena zahvaćenosti kože, ali i unutrašnjih organa, fibrotičnim promenama (LeRoy i Medsger, 2001; van den Hoogen i sar., 2013). Ova klasifikacija delimično odslikava težinu bolesti, kao i asocijaciju bolesti sa prisustvom specifičnih autoantitela, koja su prisutna u više od 90% SSc pacijenata. Difuzni oblik SSc (dSSc), karakteriše se brzom i progresivnom fibrozom kože podlaktica, ruku, lica, trupa i donjih ekstremiteta, ali i pluća i drugih unutrašnjih organa. Ovaj oblik tipično je asociiran sa prisustvom anti-topoizomeraznih (ATA), anti-topoizomeraznih I (Scl-70) i anti-RNK polimeraznih antitela. DSSc odlikuje raniji i dramatičniji početak i lošija prognoza, i često je povezan sa razvojem intersticijalne bolesti pluća kao i poremećajima u koštano-mišićnom sistemu. Nasuprot njemu, limitirani ili ograničeni oblik SSc (lSSc) karakteriše se sporom i ograničenom fibrozom kože lica, donjih distalnih ekstremiteta, prstiju i šaka, koja se u retkim slušajevima javlja i u unutrašnjim organima, kada može rezultirati izolovanom plućnom hipertenzijom. Ovaj oblik asociiran je sa boljom prognozom i sa prisustvom anti-centromernih antitela (ACA) (Affandi i sar., 2015; Hachulla i Launay, 2011; Hamaguchi, 2010; Steen, 2008). Iako je napravljen veliki napredak u smislu boljeg upravljanja komplikacijama kod pacijenata, SSc se i dalje smatra neizlečivom. Ukupna stopa preživljavanja kod SSc pacijenata izuzetno je varijabilna i zavisi od vrste i težine zahvaćenosti organskih sistema sklerodermijom. U grupi bolesti vezivnih tkiva, dSSc nosi najveći rizik od prerane smrti, kako za period praćenja od 10 godina preživljava 55% pacijenata (Mayes i sar., 2003).

Kako ova bolest spada u retke bolesti, tako i zbog velike varijabilnosti njenih kliničkih manifestacija, uspostavljanje precizne dijagnoze veoma je zahtevno usled nedostatka jasnih i preciznih kliničkih parametara. Naime, klinička evaluacija pacijenata

uglavnom se oslanja na nekvantitativne metode ili zahteva invanzivne procedure, dok pouzdani markeri koji bi omogućili predviđanje toka bolesti ili odgovor na terapiju još uvek nedostaju. Štaviše, kako je etiologija ove bolesti u velikoj meri nepoznata i stoga još uvek nedostaje efikasan medicinski tretman za SSc (Murdaca i sar., 2014). Iako je u poslednjih nekoliko godina napravljen veliki napor da se razjasne brojni procesi u osnovi nastanka i razvoja SSc, još uvek ne postoji jedinstvena hipoteza koja bi objasnila sve aspekte ove bolesti. Ipak većina istraživanja podržava hipotezu da je aktivacija imunog sistema rani i ključni događaj u nastanku SSc (Lafyatis i York, 2009; Prescott i sar., 1992). Tokom proteklih godina postalo je jasno da proizvodnja autoantitela kao i hronična i uporna inflamacija imaju ključnu ulogu u posredovanju patofizioloških procesa koji se nalaze u osnovi SSc, pogotovo u njenim ranim fazama (Abraham i Varga, 2005; Barnes i sar., 2011). U osnovi, smatra se da autoimunost i inflamacija sa izmenjenim signalnim putevima i regulatornim kaskadama, predhode fibrozi i vaskulopatiji (Raja i Denton, 2015).

Iako precizni molekularni mehanizam SSc još uvek nije jasan, smatra se da genetičke aberacije ne mogu samostalno i u potpunosti objasniti varijabilnost i heterogenost SSc (Makino i Jinnin, 2016). Stoga, epidemiološki podaci sugerišu da kompleksne interakcije između genetičkih, epigenetičkih činilaca i faktora životne sredine, kao što su virusne infekcije, na prvom mestu sa citomegalovirusom, psihoaktivna sredstva, izloženost organskim rastvaračima, vinil hloridu, silicijum dioksidu (Nietert i Silver, 2000; Pandey i LeRoy, 1998), su te koje mogu doprineti predispoziciji za nastanak i progresiju ove bolesti (Chen i sar., 2003; Jimenez i Derk, 2004; Nikpour i sar., 2010).

## **1.2. Inflamacija**

Brojni podaci podržavaju hipotezu da je aktivacija imunog sistema rani i ključan događaj u nastanku SSc (Lafyatis i York, 2009; Prescott i sar., 1992). Tokom proteklih godina postalo je jasno da proizvodnja antitela kao i hronična i uporna inflamacija, pod kojom podrazumevamo infiltraciju mononuklearnih ćelija na prvom mestu T-limfocita i makrofaga, u zahvaćeni deo tkiva, kao i disregulaciju u proizvodnji citokina i faktora rasta (Jimenez i

Derk, 2004), imaju ključne uloge u posredovanju patofizioloških procesa u osnovi SSc, naročito u početnim fazama bolesti (Abraham i Varga, 2005; Barnes i sar., 2011). Zapravo, smatra se da autoimunost i inflamacija sa međusobnim preplitanjem komponenti različitih regulatornih kaskada, predhode vaskulopatiji i fibrozi (Raja i Denton, 2015).

### 1.2.1. IL6

Interleukin 6 (IL6) je pleiotrofni citokin sa važnom ulogom regulaciji odgovora imunog sistema, inflamaciji i hematopoezi (Tanaka i sar., 2014). Svoj efekat, IL6 na hepatocyte, monocite, B ćelije, neke vrste T ćelija i neutrofile, ostvaruje „klasičnom“ signalizacijom, odnosno direktnim vezivanjem za svoj receptor (IL6R ili gp80) na površini ovih ćelija (Scheller i Rose-John, 2006). Kako endotelijalne ćelije i fibroblasti ne ekspimiraju ovaj receptor na svojoj površini, one odgovaraju na IL6 „trans“ signalizacijom putem solubilnog receptora (sIL6R) (Romano i sar., 1997). Ovaj receptor može nastati na dva različita načina, bilo proteolitičkim isecanjem sa površine neutrofila, bilo sekrecijom varijante nastale alternativnim iskrajanjem iz neutrofila ili monocita (Horiuchi i sar., 1994; Mullberg i sar., 1993). IL6, bilo da je direktno vezan za IL6R, bilo da je u kompleksu sa sIL6R, interaguje sa homodimernim membranskim receptorom gp130, ekspimiranim na svim tipovima ćelija, započinjući složenu transdukciju signala koja uključuje nekoliko signalnih puteva kao što su, JAK/STAT i MAP kinazne puteve (eng. *Mitogen-Activated Protein Kinases*, MAPK) na prvom mestu, ostvarujući na taj način svoju višestruku ulogu u regulaciji različitih procesa (Heinrich i sar., 2003).

Kod pacijenata sa SSc pored mononuklearnih ćelija periferne krvi (MNČPK) i endotelijalne ćelije predstavljaju izvor IL6. Naime, aktivacija endotelijalnih ćelija trans-signalizacijom povećava ekspresiju gena za sintezu IL6, ali i intracelularnog adhezivnog molekula (ICAM1), vaskularnog ćelijskog adhezivnog molekula (VCAM1), IL8 i monocitnog hemotaksičnog proteina 1 (MCP1) (Jones i sar., 2005). Povećan nivo IL6 u serumu je povezan sa težom kliničkom slikom i lošijom prognozom kod pacijenta sa SSc

(Khan i sar., 2012; Sato i sar., 2001). Naime, smatra se da IL6 ima nekoliko potencijalno važnih uloga u patogenezi SSc kroz akutno fazni odgovor, nastanak i širenje hroničnog zapaljenja, nastanak autoimunosti kroz promovisanje diferencijacije B ćelija u plazma ćelije i proizvodnje autoantitela, disfunkcije endotelijalnih ćelija i stimulacije fibrinogeneze (Barnes i sar., 2011).

### 1.2.2. Signalni put JAK2/STAT3

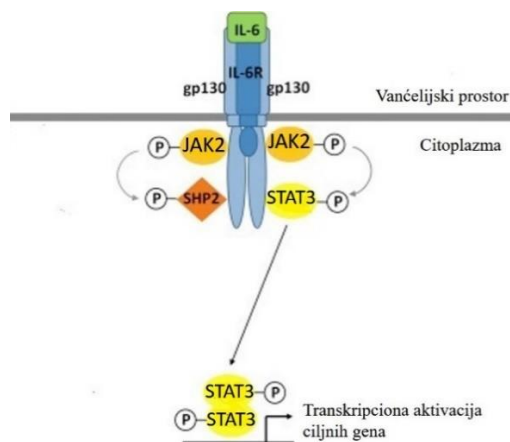
Citokini i faktori rasta imaju centralnu ulogu u patogenezi SSc kroz aktivaciju imunog sistema, posledičnog oštećenja vaskularnog sistema i povećane produkcije komponenti vanćelijskog matriksa (VCM), koje su glavne odlike SSc. Mehanizam njihovog delovanja zasniva se na modulaciji međusobnih ćelijskih interakcija, kao i interakcija između ćelije i okoloćelijskog matriksa na osnovu molekularnih puteva koji su složeni i nisu u potpunosti razjašnjeni (Raja i Denton, 2015). Signalni put JAK2/STAT3 (eng. *Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription, JAK/STAT*) predstavlja jedan od najvažnijih puteva kojima se signal u obliku citokina, na prvom mestu IL6 i IL1, ali i drugih faktora rasta prevodi u transkripcioni odgovor ćelije (Rawlings i sar., 2004; Valentino i Pierre, 2006) (Slika 1).

Kod sisara, JAK familija sastoji se od četiri člana: JAK1, JAK2, JAK3 i Tyk2. JAK proteine karakteriše prisustvo 7 JH (eng. *JAK homology, JH*) domena. JH1 domen odgovoran je za kinaznu aktivnost, dok pseudokinazni JH2 domen ima regulatornu funkciju. Ostali domeni (JH2-JH7) neophodni su za protein-protein interakcije sa citokinskim receptorima i STAT proteinima (Yamaoka i sar., 2004). Nakon vezivanja citokina za površinski receptor, dolazi do multimerizacije receptora i regrutovanja dva JAK proteina u međusobnu neposrednu blizinu koji se aktiviraju trans-fosforilacijom. Aktivirani JAK proteini funkcionišu kao kinaze koje vrše fosforilaciju tirozinskih ostataka na citoplazmatskom regionu receptora (Valentino i Pierre, 2006). STAT proteini bivaju privučeni na ova mesta fosforilacije, fosforilisani i aktivirani od strane JAK kinaza. Postoji ukupno 7 STAT proteina, i svi imaju DNK-vezujući domen. STAT3 i STAT5 glavni su supstrati aktivirane

JAK2 kinaze (Ihle i Gilliland, 2007). Aktivirani STAT-ovi potom formiraju homo- ili heterodimere preko svojih SH2 domena, napuštaju receptor, i uz pomoć importina 5 i Ran-zavisnog puta translociraju se u jedro. Kada se jednom nađu u jedru vezuju se za specifične regulatorne sekvence (GAS-motive) u promotorima nekoliko ciljnih gena regulišući tako njihovu ekspresiju (Fischer i Hilfiker-Kleiner, 2007; Valentino i Pierre, 2006). Upravo geni koji su regulisani na ovaj način neophodni su za ćelijski rast, preživljavanje, proliferaciju i migraciju ćelija, angiogenezu i imunološku toleranciju (Kamimura i sar., 2003; Rawlings i sar., 2004).

Iako je mehanizam JAK/STAT signalizacije relativno jednostavan u teoriji, biološke posledice aktivacije ovog signalnog puta su komplikovane usled interakcijama sa drugim signalnim putevima (Rane i Reddy, 2000; Shuai, 2000). Naime signalizacija preko različitih STAT proteina, naročito preko STAT3, povezana je sa signalnim putem NF-kB (eng. *Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*, NF-kB) na više načina. Inflamatorni medijatori, prvenstveno IL6, koji su produkt gena regulisanih od strane NF-kB, važni su aktivatori STAT3 (Heinrich i sar., 1998). Takođe je pokazano da je za regulaciju brojnih onkogenih i inflamatornih gena neophodno zajedničko delovanje i STAT3 i NF-kB (Basseres i Baldwin, 2006; Yu i sar., 2007).

Neadekvatno funkcionisanje signalnog puta JAK2/STAT3 asocirano sa dijabetesom tip 2 i solidnim tumorima (Thomas i sar., 2015; Yang i sar., 2017a) Naime, aberantna signalna kaskada koja uključuje IL6, IL10 i STAT3 prijavljena je u patogenezi inflamatorne bolesti creva (eng. *Inflammatory Bowel Disease*, IBD) i kolorektalnog karcinoma (Karin i Greten, 2005).



Slika 1. Signalni put IL6/JAK2/STAT3. Vezivanjem IL6 za IL6R aktivira se dimerizacija receptor-asocirane kinaze JAK2. Aktivacija JAK2 vodi fosforilaciji i dimerizaciji STAT3, koji nakon translokacije u nukleus, vezivanjem za regulatorne sekvence u promotoru reguliše ekspresiju ciljnih gena. Modifikovano iz rada *Wright i Nair*, iz 2010. godine (Wright i Nair, 2010).

### 1.2.3. Intracelularni receptori TLR7 i TLR9

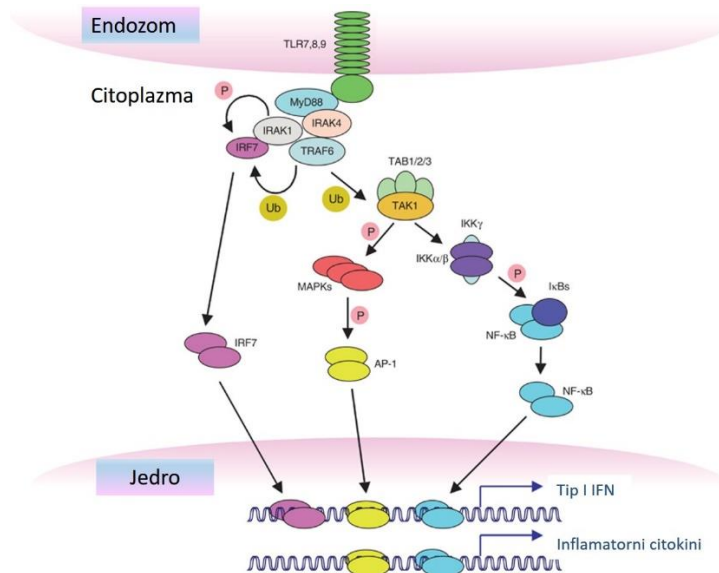
TLR (eng. *Toll-Like Receptor*, TLR) receptorska familija predstavlja familiju evolutivno konzerviranih receptora sa kanoničnom ulogom u prepoznavanju bakterijskih i virusnih molekula, te stoga predstavljaju komponente urođenog imunog odgovora i prvu liniju odbrane domaćina od invazije patogena (Goutagny i sar., 2012). Nalaze se široko eksprimirani na mnogim ćelijama imunog sistema, ali i na ćelijama kao što su fibroblati, epitelijalne i endotelijalne ćelije. TLR familija receptora, koja broji kod ljudi ukupno 11 članova, predstavlja tip I membranskih receptora sa veoma varijabilnim ekstracelularnim domenom bogatim leucinskim ponovcima LRR, kojim prepoznaju i vezuju ligande, i visoko konzerviranim intracelularnim domenom-TIR, koji posreduje u interakciji između aktiviranog receptora i nizvodnih signalnih molekula. Nasuprot lokalizaciji na plazma membrani većine članova TLR familije receptora, oni članovi koji su specifični za prepoznavanje nukleinskih kiselina (NK), kao što su TLR 3, 7, 8 i 9, lokalizovani su intracelularno u endolizozomima (Blasius i Beutler, 2010b; Marshak-Rothstein, 2006; Miggin i O'Neill, 2006; Wei i sar., 2011). TLR7 prepoznaje RNK molekule jednolančanih virusa (Diebold i sar., 2004; Heil i sar., 2004), dok TLR9 detektuje nemetlovanu CpG DNK koja se nalazi u prokariotskim genomima i DNK virusima (Hemmi i sar., 2000; Lund i sar.,

2003). Prepoznavanje liganda od strane TLR-ova indukuje intracelularnu signalnu kaskadu koja završava aktivacijom i translokacijom u jedro transkripcionog regulatora NF- $\kappa$ B, koji dalje orkestrira proizvodnjom proinflammatoryh citokina kao što su TNF- $\alpha$ , IL6, IL1 i IL12 (Blasius i Beutler, 2010b; Clancy i sar., 2010; Johnson i sar., 2015; Kawai i Akira, 2006) i uputstvima za adaptivni imunitet neophodnim za aktivaciju i sazrevanje dendritičnih ćelija i posledičnu indukciju proliferacije T ćelija (Fullard i O'Reilly, 2015; O'Neill, 2006; Pasare i Medzhitov, 2003; Schnare i sar., 2001).

Postoje nalazi koji ukazuju da su TLR-ovi, naročito TLR7 i TLR9 uključeni u patogenezu nekih AB, kao što su sistemskog eritemskog lupusa (SLE) (Celhar i Fairhurst, 2014; Papadimitraki i sar., 2006; Wu i sar., 2008), reumatoidnog artritisa (RA) (Huang i Pope, 2009; Ospelt i sar., 2008), multipla skleroza (MS) (Hemmi i sar., 2002; Lund i sar., 2004), artritis i anemia (Kawane i sar., 2006), miokarditis (Jurk i sar., 2002), diabetes (Heil i sar., 2004), ateroskleroza (Hemmi i sar., 2000), razvoj hronine inflamacije i fibroze (Ciechomska i sar., 2013b; Zheng i sar., 2007). U normalnim uslovima, NK domaćina se nalaze unutar odvojenih kompartmenata, a ekstracelularne i endozomalne DNKaze i RNKaze hidrolizuju slobodne NK, sprečavajući na taj način neadekvatnu aktivaciju urođenog imunog sistema (Blasius i Beutler, 2010a). Međutim, nekoliko studija ukazalo je da TLR-ovi mogu prepoznati i sopstvene RNK/DNK molekule domaćina, koji se znatno oslobađaju pri oštećenju tkiva i ćelijskom stresu usled neefikasnog otklanjanja apoptotskih ćelija koje onda podležu sekundarnoj nekrozi (Fullard i O'Reilly, 2015; Rifkin i sar., 2005). Pokazano je da su ligandi za TLR7 i TLR9 receptore kod SLE pacijenta imuno kompleksi (IK) prisutni u serumu, formirani od autoantitela i NK ili proteina koji vezuju NK domaćina. Upravo prepoznavanje IK od strane intracelularnih TLR-ova u dendritičnim ćelijama, monocitima/makrofagama i B ćelijama vodi produkciji proinflammatoryh citokina, prezentaciji autoantigena i razvoju autoimunosti (Lau i sar., 2005b; Leadbetter i sar., 2002; Rui i sar., 2003), što je i pokazano na modelu SLE miša (Marshak-Rothstein, 2006). Ono što je zanimljivo je da su obe bolesti, SLE i SSc, asociirane sa autoantitelima za nukleoproteinske komplekse (Lafyatis i York, 2009). Naime, jedna od prvih promena u SSc je upravo oštećenje zidova malih krvnih sudova koje se manifestuje Raynaudovim fenomenom i ishemijom kože i unutrašnjih organa. Dodatno, inflamacija, kao i posledično lokalno oštećenje tkiva dovode



do oslobađanja endogenih TLR liganda koje prepoznaju autoantitela inicirajući intracelularne signalne puteve (Begon i sar., 2007; Ciechomska i sar., 2013b; Rifkin i sar., 2005; Vollmer i sar., 2005a). Ovo može biti jedan od mehanizama koji iniciraju i održavaju inflamaciju, autoimunost i posledičnu fibrozu u SSc (Ciechomska i sar., 2013b; O'Reilly i sar., 2012).



Slika 2. TLR7 i TLR9 lokalizuju se u endozomalnom kompartmentu. Vezivanja liganda u formi NK za ove receptore, započinje MYDD88-zavisan signalni put koji rezultira aktivacijom i translokacijom u jedro transkripcionih regulatora NF- $\kappa$ B i AP-1, koji dalje regulišući ekspresiju ciljnih gena orkerstriraju proizvodnjom proinflamatornih citokina. Modifikovano iz rada *Kawai i sar.* iz 2006. godine (Kawai i Akira, 2006)

#### 1.2.4. IRAK1

Nekoliko AB, uključujući i SSc, karakterišu se pretežnim ispoljavanjem kod osoba ženskog pola iz još uvek nepoznatih razloga. Istraživački napori u protekle 3 decenije da se pokaže da su razlike u statusu polnih hormona kod osoba muškog i ženskog pola odgovorne za predominantno ispoljavanje ovih bolesti kod osoba ženskog pola nisu obezbedile ubedljiva objašnjenja (Whitacre, 2001). Sa druge strane, postoje malobrojne studije koje ukazuju na to da aberacije u određenim genima na X hromozomu mogu izazvati imunodeficientne uslove

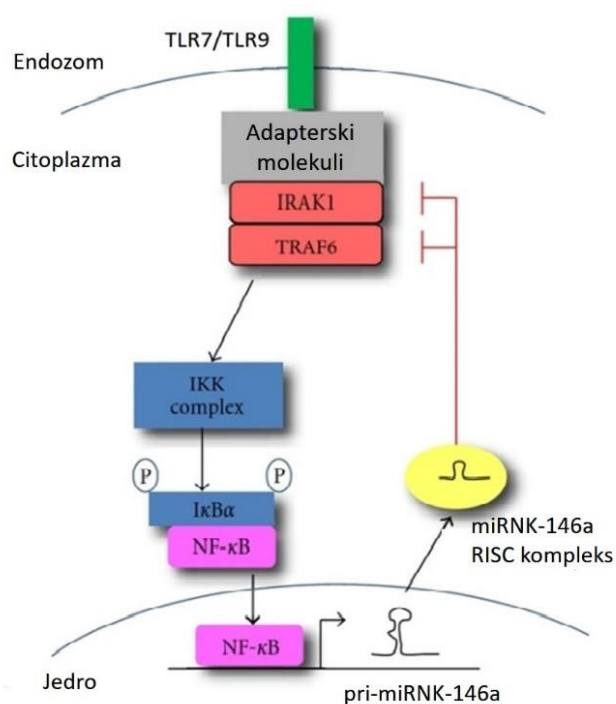
koji su asocirani sa AB (Invernizzi, 2007). Do danas, veoma malo se zna o ulozi gena lokalizovanih na X hromozomu u održavanju homeostaze imunog sistema i razvoju AB kod osoba ženskog pola (Invernizzi i sar., 2009; Libert i sar., 2010). Interesantno, nekoliko studija ukazale su da je gen *IRAK1* (eng. *Interleukin 1 Receptor Associated Kinase 1*, IRAK1), prvi gen na X hromozomu koji je doveden u vezu sa pojavom i predominantnim ispoljavanjem SLE i RA kod osoba ženskog pola (Jacob i sar., 2009; Khalifa i Balandraud, 2017).

Gen *IRAK1* je prvi otkriveni član *IRAK1* familije gena koju čine još i geni *IRAK2*, *IRAK3*, *IRAK4* i *IRAKM* (Gottipati i sar., 2008), i esencijalan je za funkcionisanje kako urođenog tako i stečenog imunog sistema (Chiang i sar., 2011). IRAK1 je serin/treonin protein kinaza sa značajnom ulogom u signalnoj kaskadi TIR (eng. *Toll Like Receptor/Interleukin 1 receptor*, TIR) receptorske familije koja rezultira aktivacijom transkripcionog regulatora NF- $\kappa$ B. Ova familija receptora sastoji se od IL1 receptorske podfamilije, koja prepoznaje endogene proinflamatorne citokine IL1 i IL18, i članova TLR receptorske podfamilije, koja prepoznaje molekularne paterne asocirane sa patogenima (eng. *Pathogen-Associated Molecular Patterns*, PAMP) (Dunne i O'Neill, 2003; Martin i Wesche, 2002). Naime, aktivacijom TIR receptora ligandom, adaptorni protein MYD88 (eng. *Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88*, MYD88) interaguje sa TIR domenom receptora i regrutuje preko DD (eng. *Death Domen*, DD) domena IRAK4. Aktivacija IRAK1 vrši se fosforilacijom na Thr<sup>209</sup> od strane IRAK4, ali i autofosforilacijom na Thr<sup>387</sup>. Aktivirani IRAK1 interaguje sa TRAF6 (eng. *Tumor Necrosis Factor (TNF) Receptor-associated Factor 6*, TRAF6), dovodeći do fosforilacije i inaktivacije inhibitorne subjedinice I $\kappa$ B, što posledično omogućava aktivaciju NF- $\kappa$ B i njegovu translokaciju u jedro uz pomoć importina 3 i 4 (Cao i sar., 1996; Huang i sar., 2005). Vezivanje NF- $\kappa$ B za regulatorne sekvence ciljnih gena dolazi do izmenjene ekspresije na prvom mestu gena koji regulišu funkcije imunog sistema kao što su TNF- $\alpha$  i IL8, IL6 i IL12 (Janssens i Beyaert, 2003; Martin i Wesche, 2002; Wang i sar., 2001).

U patogenezi nekih AB smatra se da je ključni događaj upravo izmenjena aktivacija transkripcionog regulatora NF- $\kappa$ B koja dovodi do poremećene regulacije transkripcije

mnogih proinflamatornih medijatora (Arcaroli i sar., 2006). Kako se IRAK1 smatra "prekidačem" signalnog puta koji povezuje TIR kompleks sa nizvodnim transkripcijskim regulatorima, prepoznat je kao gen rizika za nastanak AB (Jacob i sar., 2009; Kollewe i sar., 2004; Zhang i sar., 2013).

Pored aktivacije signalnog puta NF- $\kappa$ B (Slika 3), IRAK1 učestvuje i u aktivaciji TAK1 i MAP kinaznih puteva koji rezultuju aktivacijom drugih transkripcijskih regulatora kao što su interferon regulatornih faktora (eng. *Interferon Regulatory Factors*, IRF) i aktivatornog proteina (eng. *Activator Protein*, AP) (Chiang i sar., 2011), čije su izmenjene funkcije već dokumentovane u nekim AB (Baechler i sar., 2003; Banchereau i Pascual, 2006; Iyer i Cheng, 2012) uključujući i SSc (Eloranta i sar., 2010).



Slika 3. Naime, aktivacijom endogenih TLR receptora ligandom, pokreće se MYD88-zavisani signalni put koji rezultira aktivacijom IRAK1. IRAK1 u kompleksu TRAF6 dovodi do fosforilacije i inaktivacije inhibitorne subjediniice I $\kappa$ B, time omogućavajući aktivaciju NF- $\kappa$ B i njegovu translokaciju u jedro. NF- $\kappa$ B kao transkripcijski regulator inicira transkripciju brojnih gena, između ostalog i pri-miRNK-146a, koja nakon translokacije u citoplazmu i ulaska u RISC kompleks, u obliku zrele miRNK-146a, doprinosi supresiji signalnog puta NF- $\kappa$ B inhibicijom translacije *TRAF6* i *IRAK1* iRNK. Modifikovano iz rada *Rusca i Monticelli*, iz 2011. godine (Rusca i Monticelli, 2011).

### 1.2.5. MiRNK-146a

Iako etiologija i patološki mehanizmi u SSc nisu u potpunosti razjašnjeni, sve je više dokaza koji ukazuju na potencijalnu ulogu mikro RNK (miRNK) u SSc patogenezi (Miao i sar., 2015). MiRNK su mali nekodirajući RNK molekuli dužine 20-25 nukleotida koji funkcionišu kao post-transkripcioni regulatori. Vezivanjem za komplementarne sekvence u 3'-UTR (eng. *Untranslated region*, UTR) ciljane iRNK, dovode do translacione supresije ili destabilizacije iRNK i posledične degradacije u cilju održavanja homeostaze (Bartel, 2004; Doench i Sharp, 2004; Filipowicz i sar., 2008). Kako jedna miRNK može regulisati više iRNK, tako i jedna iRNK može biti regulisana sa više miRNK (Lim i sar., 2005). U humanom genomu, miRNK-kodirajući geni čine 5% svih humanih gena, što ih čini najzastupljenijom klasom regulatora koji kontrolišu ekspresiju čak 30% protein-kodirajućih gena (Sonkoly i sar., 2008b).

MiRNK su uključene u širok spektar ćelijskih funkcija, kao što je razviće i razvoj organa, ćelijska diferencijacija, proliferacija, signalna transdukcija, metabolizam i apoptoza (Kapsimali i sar., 2007; Ke i sar., 2003; Miska, 2005; Zhao i Srivastava, 2007). Stoga izmenjena funkcija miRNK povezana je sa širokim sprekrom bolesti kod ljudi, od karcinoma (Lu i sar., 2005), poremećaja u razviću (Kloosterman i sar., 2007), do bolesti mišićnog i kardiovaskularnog sistema (Cheng i sar., 2007; Eisenberg i sar., 2007). Međutim, malo se zna o mehanizmima uključenim u njihovu patogenezu.

Pravilna regulacija ekspresije gena miRNK molekulima neophodna je i za normalno funkcionisanje imunog sistema kao i za prevenciju autoimunosti (Lindsay, 2008; Sonkoly i sar., 2008a; Xu i sar., 2012). Naime, deregulacija jedne ili više miRNK može voditi ka smanjenu tolerancije prema sopstvenim antigenima i razvoju AB sa jedne strane, i gubitku fine regulacije imunog odgovora, i konstantnoj inflamaciji i razvoju hroničnih inflamatornih bolesti sa druge strane (Iborra i sar., 2012; Pauley i sar., 2009; Sonkoly i Pivarcsi, 2009).

MiRNK-146a jedna je od prvih okarakterisanih miRNK uključenih u funkcije imunog sistema, kroz regulaciju T-ćelijske selekcije, sazrevanje i selekciju B ćelija, razvoj regulatorih T ćelija, kao i produkciju proinflamatornih citokina kod makrofaga (Pauley i sar., 2009; Tsitsiou i Lindsay, 2009). Sinteza ove miRNK u ćelijama imunog sistema indukovana

je transkripcionim faktorom NF- $\kappa$ B u prisustvu inflamatornih citokina IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  i IL1 $\beta$  (Kutty i sar., 2013). Osnovni mehanizam delovanja ove miRNK podrazumeva finu regulaciju signalnog puta TIR kompleksa, post-transkripcionim utišavanjem *TRAF6* i *IRAK1* iRNK (Taganov i sar., 2006) (Slika 3). Inhibicija translacije sa ova dva molekula vodi ka redukciji aktivacije NF- $\kappa$ B i smanjenoj produkciji proinflamatornih medijatora kao što su IL6, TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$ , i IL17 (Bogunia-Kubik i sar., 2016; Taganov i sar., 2006). Pored IRAK1 i TRAF6, i drugi signalni proteini, kao što su STAT1, IRF5, IRAK2, FADD, PTC1 i FAF1 koji su uključeni u procese inflamacije i apoptoze, regulisani su ovom miRNK (Curtale i sar., 2010; Taganov i sar., 2006; Tang i sar., 2009). Najnovije studije ukazuju na to da izmenjena ekspresija ove miRNK mogla bi biti asocirana sa patogenezi nekih AB, kao što su SLE, RA, i Sjögrenov sindrom (SS) (Xu i sar., 2012), ali njena uloga u patogenezi SSc još uvek nije poznata.

#### 1.2.6. Značaj tačkastih varijanti u genima *IRAK1* i *miRNK-146a*

Zamena jednog nukleotida (eng. *Single Nucleotide Variation*, SNV) u DNK sekvenci miRNK-kodirajućih gena, čak i izvan sekvence za zreli miRNK, može uticati na nivo njene ekspresije i/ili sazrevanje (Zhang i sar., 2012). Takođe, postojanje SNV-a u ciljnom mestu u iRNK za datu miRNK, može rezultirati nemogućnošću njegovog prepoznavanja od strane miRNK, što posledično može voditi izostajanju inhibicije translacije ili degradacije ciljne iRNK (Chin i sar., 2008). Ovo bi moglo imati kompleksne posledice po funkcionisanje živog sistema i doprineti razvoju određenih patoloških uslova (Ryan i sar., 2010). Nedavno je prijavljeno da rs2910164 C>G varijanta u okviru prekusorske sekvence miRNK-146a (pre-miRNK) može imati uticaja na regulaciju ekspresije i funkciju zrele miRNK-146a što ističe potencijalnu ulogu ove varijante u patogenezi nekoliko bolesti, uključujući različite tipove karcinoma (Jazdzewski i sar., 2008; Xu i sar., 2011) ali i AB, kao što su RA (Chatzikiyakidou i sar., 2012), MS (Fenoglio i sar., 2011), i ulcerozni kolitis (Okubo i sar., 2011). Slično, varijanta rs3027898 C>A u genu *IRAK1* dovodi se u vezu sa pojavom RA (Chatzikiyakidou i sar., 2010a), ankilozantnog spondilitisa i psorijatičnog artritisa (PsA) (Chatzikiyakidou i sar., 2010b). Naime, iako se ova varijanta u 3'-UTR gena *IRAK1* ne

nalazi u okviru mesta direktnog vezivanja miRNK-146a, navodi se da može uticati na njegovo pravilno savijanje i afinitet vezivanja miRNK-146a za to ciljno mesto, i samim tim i remetiti post-transkripcionu regulaciju ovog gena utičajući na njegovu ekspresiju (Chatzikyriakidou i sar., 2012).

### 1.3. Fibroza

Najkarakterističnija patološka oznaka SSc kao heterogene bolesti vezivnog tkiva je fibroza kože i unutrašnjih organa kao što su pluća, gastrointestinalni trakt, srce, bubrezi, tetive i ligamenti i endokrine žlezde (Varga i Abraham, 2007). Upravo fibrotične promene su osnova većine kliničkih simptoma kod SSc pacijenata (Chen i sar., 2003). Disfunkcije unutrašnjih organa u SSc usled razvoja fibroze, koje se najčešće manifestuju kao plućna hipertenzija i plućna fibroza, bubrežna insuficijencija, gastrointestinalna dismotilnost i malapsorpcija i poremećena srčana funkcija, predstavljaju jedan od glavnih uzroka visoke stope morbiditeta i mortaliteta povezanih sa ovom bolešću (Ho i sar., 2014; Tyndall i sar., 2010).

Pored kože, drugi najčešće fibrozom pogođen visceralni sistem kod oko 90% SSc pacijenata je gastrointestinalni trakt. Simptomi koji se javljaju su veoma varijabilni, krećući se od poremećaja u peristaltici, pa sve do narušavanja ekskretorne i apsorpcione funkcije organa za varenje, generalno doprinoseći lošijem kvaliteta života SSc pacijenata (Schmeiser i sar., 2012). Svakako jedna od najizrazitijih manifestacija ove bolesti i vodeći uzrok smrti kod osoba sa SSc je oštećenje pluća. Plućna fibroza je razarajuća bolest u kojoj zamena funkcionalnog plućnog parenhima sa fibroznim tkivom progresivno otežava razmenu gasova i snabdevanje tela kiseonikom, što posledično vodi ka smrti izazvanom respiratornom insuficijencijom (Huebener i Schwabe, 2013). Ispoljavanje manifestacija u kardiovaskularnom sistemu prisutno je kod oko 40% SSc pacijenata, i dovodi se u vezu sa lošijom prognozom i kraćim preživljavanjem pacijenata (Tyndall i sar., 2010). Hipertrofija srca, koja obično nastaje kao odgovor na hroničnu hipertenziju, praćena je povećanom depozicijom komponenti VCM. Fibroza miokarda povećava njegovu čvrstoću i time

doprinosi ventrikularnoj disfunkciji, dok fibroza koronarne mikrocirkulacije dovodi do nepravilnog rada srca i poremećaja u sistemu provođenja. Kao najčešći klinički simptomi kod SSc pacijenata javljaju se palpitacije, dispneja, sinkopa pa i iznenadna smrt (Au i sar., 2011; Deswal i Follansbee, 1996; Ridolfi i sar., 1976). Progresivna hepatična fibroza koja nastaje transformacijom hepatičnih zvezdastih ćelija u miofibroblaste, može dovesti do ciroze, hepatocelularnog karcinoma i otkazivanja jetre, a transplantacija jetre ostaje za sada jedini mogući tretman kod ove kliničke podgrupe pacijenata (Bataller i Brenner, 2005). Renalna fibroza, koju karakteriše glomeruloskleroza i tubulointersticijalna fibroza, uobičajeno je završna faza različitih tipova hroničnih bolesti bubrega, kao i SSc. Razvoj bubrežne fibroze i paralelan gubitak funkcionalnog parenhima bubrega dovodi u završnoj fazi do bubrežne insuficijencije, razarajućeg stanja koje zahteva dijalizu ili transplantaciju bubrega (Huebener i Schwabe, 2013).

Fibroza predstavlja zajednički ishod bolesti koje se karakterišu hroničnom i produženom povredom tkiva i/ili inflamacijom, kao što su reumatološka oboljenja. Fibroblasti u normalnim fiziološkim uslovima imaju fundamentalnu ulogu u održavanju tkivne homeostaze i zarastanju rana produkcijom komponenti VCM na strogo kontrolisan način, koja biva utišana nakon uspešne popravke oštećenja pri čemu aktivirani fibroblasti podležu procesu apoptoze (Tomasek i sar., 2002). Fibroza tkiva je patološki proces koji nastaje kao posledica nekontrolisanog odgovora fibroblasta na produženo oštećenje tkiva usled povećane zastupljenosti citokina, hemokina, faktora rasta i angiogenih faktora proizvedenih od strane endotelijalnih, epitelijalnih i regrutovanih inflamatornih ćelija (Abraham i sar., 2007; De Langhe i Lories, 2015). Ovi molekuli iniciraju i/ili održavaju proces fibroze, ali i procese endotelijalnih i vaskularnih promena (Castro i Jimenez, 2010). Ovaj višestepeni proces pomera homeostazu tkiva prema intersticijalnoj hiperplaziji i preteranoj proizvodnji komponenti VCM, uključujući kolagene I i III (u manjoj meri i IV, V i VII), hijaluronsku kiselinu, proteoglikane, glikozaminoglikane i fibronektin (Akimoto i sar., 1992; Fleischmajer i sar., 1978; Varga i Bashey, 1995). Prekomerna akumulacija komponenti VCM dovodi do progresivnog remodeliranja tkiva koje na kraju narušava njegovu fiziološku strukturu i dovodi do postepenog gubitka funkcije organa (Gabrielli i sar., 2009). Kada se

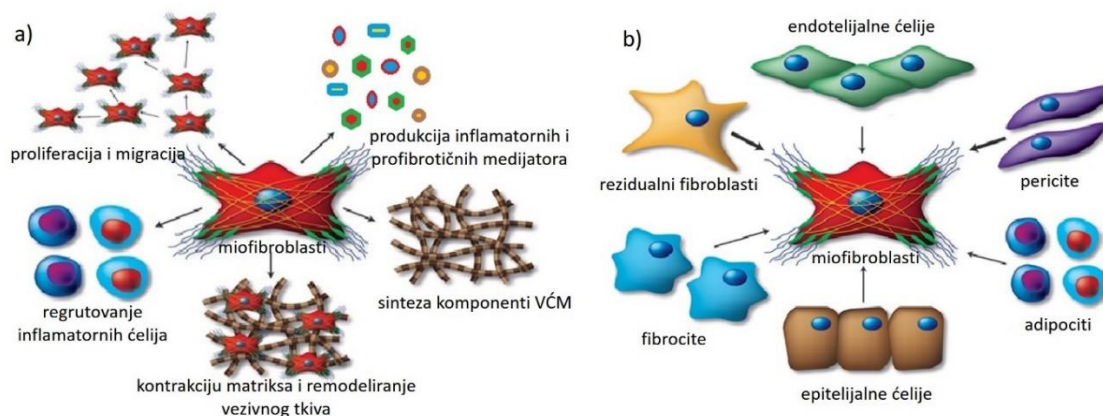
jednom inicira, proces fibroze progresivno napreduje kroz mnoštvo pozitivnih povratnih petlji koje se generišu kao posledica oštećenja tkiva, povećane gustine i čvrstoće VCM, hipoksije, oksidativnog stresa i akumulacije molekula koji se oslobađaju oštećenjem ćelijskih struktura (eng. *Damage-Associated Molecular Patterns*, DAMP). Ovi uslovi promovišu dalju nekontrolisanu aktivaciju fibroblasta i njihovu diferencijaciju u kontraktilne i sekretorne miofibroblaste kao glavne aktere fibrotičnog procesa (Bhattacharyya i sar., 2011).

Miofibroblasti predstavljaju intermedijarnu fazu između fibroblasta i glatkog mišićnog fenotipa. Kako kombinuju osobine oba ćelijska tipa, odgovorne su za kontrakciju matriksa i remodeliranje vezivnog tkiva. Karakterišu se *de novo* ekspresijom  $\alpha$ -aktinina glatkih mišićnih ćelija (eng. *alpha Smooth Muscle Actin*,  $\alpha$ SMA), mehanosenzitivnog proteina, koji ujedno predstavlja i najčešće korišćeni molekularni marker za detekciju prisustva ovih ćelija (Hinz i sar., 2001). Pored ovog markera karakterišu se još i prisustvom paksilina, vinkulina i tenzina (Gabbiani, 2003). Miofibroblasti u odgovoru na mehaničke i hemijske stimuluse iz okolne sredine, pored značajne sinteze komponenti VCM, proizvode i inflamatorne i profibrotične medijatore sa parakrinim i autokrinim delovanjem, zbog čega se smatraju ključnim faktorima koji održavaju začarani krug povrede/zapaljenja i fibroze u tkivu (Slika 4a.) (Baum i Duffy, 2011; Hinz i sar., 2007).

Rezidualni fibroblasti predstavljaju glavni, ali ne i jedini izvor miofibroblasta. Da bi se privremeno zadovoljila velika potreba za ovim ćelijama usled pojačane reparacije zbog produženog oštećenja i/ili zapaljenja tkiva, miofibroblastni prekursori regrutuju se iz više izvora (Slika 4b.). Naime, lokalne epitelijalne i endotelijalne ćelije kroz procese epitelijalno-, odn. endotelijalno- mezehhimalne tranzicije daju miofibroblaste, postepeno gubeći sopstvene markere i dobijajući nove mezenhimske markere (Kalluri i Neilson, 2003; Piera-Velazquez i sar., 2011). Jedan od izvora miofibroblasta su i pericite, specijalizovane mezenhimske ćelije, asocirane sa zidovima malih krvnih sudova i glatke mišićne ćelije krvnih sudova (Hao i sar., 2006; Rajkumar i sar., 2005). Novi miofibroblasti mogu nastati i od fibrocita, cirkulišućih fibroblastnih prekursora poreklom iz koštane srži koji migriraju na mesto povrede/zapaljenja privučeni signalnim molekulima. Fibrocite ekspimiraju CD45, CD34, kolagen I i CXCR4, prikazujući kako karakteristike fibroblasta, tako i leukocita i hematopoetskih progenitorskih ćelija. Smatra se da, pored uloge u zarastanju rana, učestvuju



i u funkcionisanju imunog sistema (Abe i sar., 2001; Bucala i sar., 1994). Neka istraživanja ističu da i rezidualni adipociti mogu se transdiferencirati u miofibroblaste i na taj način doprinosti pulu ćelija koje učestvuju u reparaciji oštećenog tkiva (Marangoni i sar., 2015).



Slika 4. a) karakteristike i funkcije aktiviranih miofibroblasta; b) izvori miofibroblasta. Modifikovano iz rada Travers i sar., iz 2016. godine (Travers i sar., 2016).

Najčešće korišćeni klinički metod za karakterizaciju i kvantifikaciju nastalih fibrotičnih promena u koži kod SSc pacijenata, prvi put razvio je i opisao GP Rodnan 1979. godine (Rodnan i sar., 1979). Danas kao zlatni standard većina kliničkih centara koristi modifikovani Rodnanov kožni indeks (eng. *Modified Rodnan Skin Score*, mRSS) za procenu rasprostranjenosti i težine kožnih promena, koji podrazumeva sumu svih dodeljenih vrednosti za debljinu kože određenih palpacijom na 17 različitih mesta na telu pacijentata (0-neizmenjena koža, 1-blago zadebljana koža, ali se nabira, 2-zadebljana koža i teže se nabira, 3-izrazito zadebljana koža i ne nabira se). Naime, Visoke vrednosti mRSS-a dovode se u vezu sa težim kliničkim manifestacijama kod SSc pacijenata i njihovim kraćim preživljavanjem (Clements i sar., 2000). Iako se ovaj neinvazivni postupak primenjuje u većini medicinskih centara širom sveta, validnost i reproducibilnost vrednosti mRSS značajno varira između različitih kliničara, kako u velikoj meri zavisi od njihove subjektivne procene palpacije kože, kao načina bodovanja prelaznih promena u koži (Pope i sar., 1995). Takođe, mRSS metoda nije dovoljno osetljiva za detekciju diskretnih, ali ranih i značajnih fibrotičnih promena u koži, i gotovo je nemoguće ovom metodom razlikovati fibrozno

zadebljanje kože od onog koji je posledica edema tkiva, upale, vaskulopatije (Czirjak i sar., 2008).

Intenzitet fibroze i remodeliranja tkiva je od najvećeg značaja u određivanju kliničkih karakteristika i prognoze toka SSc. Brzo napredovanje procesa fibroze u koži dovodi se u vezu sa lošijom prognozom i ishodom, uz veću verovatnoću javljanja fibroze i u vitalnim unutrašnjim organima (Medsger, 2003; Meyer i sar., 2007). Zbog toga postoji stalna potreba za pronalaženjem novih, više specifičnih i pouzdanih markera koji bi bili od neprocenjive pomoći u određivanju stepena fibroze kože, koji bi omogućili raniju dijagnozu i tačniju procenu aktivnosti ovog procesa, i koji bi imali bolju prediktivnu prognostičku vrednost.

### 1.3.1. Signalni putevi uključeni u nastanak fibroze

Iako molekularni mehanizmi koji dovode do aberatne aktivacije fibroblasta nisu još uvek u potpunosti razjašnjeni, smatra se da od svih prisutnih citokina i faktora rasta koje proizvode inflamatorne ćelije regrutovane na mesto povrede, TGF- $\beta$  (eng. *Transforming Growth factor  $\beta$* , TGF- $\beta$ ) predstavlja primarni okidač za ovu fenotipsku transformaciju (Varga i Abraham, 2007; Verrecchia i Mauviel, 2007). Naime, promociju ove transformacije ostvaruje, kroz delovanje na fibroblastnu migraciju, promociju njihovog preživljavanja i izbegavanja apoptoze, stimulaciju ekspresije gena za  $\alpha$ SMA i komponenti VCM i supresiju ekspresije gena za kolagenaze i matriksne metaloproteinaze (Overall i sar., 1989; Zhang i Phan, 1999). Pored TGF- $\beta$ , kao indukujući molekuli izdvajaju se IL1 $\beta$  i faktor rasta vezivnog tkiva (eng. *Connective Tissue Growth Factor*, CTGF) (Grotendorst, 1997; Kolb i sar., 2001).

Profibrotični efekti TGF- $\beta$  posredovani su složenom mrežom intracelularnih signalnih događaja. Kanonični TGF- $\beta$ -zavisni signalni put uključuje Smad molekule, koji u zavisnosti od tipa ćelije u kojoj su aktivirani i ciljnog gena, mogu funkcionisati ili kao samostalni transkripcioni regulatori ili graditi funkcionalne transkripcione komplekse sa regulatorima iz drugih signalnih kaskada (Attisano i Wrana, 2002; Massague i Wotton, 2000). Pored kanoničnog signalnog puta, pokazano je da u transdukciji profibrotičnih efekata TGF- $\beta$  učestvuju i nekanonični signalni putevi, kao što su signalni putevi posredovani

MAPK, FAK, c-ABL, JNK i SRC kinazama (Chakraborty i sar., 2017; Kim i sar., 2010; Zhang, 2009).

Najnovija istraživanja pak ukazuju na to da bi stimulatorni efekti TGF- $\beta$  na fibroblaste mogli biti posredovani signalnom kaskadom koja uključuje JAK2. Štaviše, podaci ukazuju da potencijalna indukcija fosforilacije i aktivacije JAK2 posredstvom TGF- $\beta$ , mogla bi dovesti do posledične aktivacije gena asociranih sa fibrozom (Chakraborty i sar., 2017). Takođe, JAK2 može biti aktiviran i drugim profibrotičnim medijatorima, uključujući PDGF, VEGF, IL6, IL13, angiotenzinom II, serotoninom i endotelinom (Rane i Reddy, 2000). Sa druge strane JAK2, potencijalni je aktivator i STAT3 za koga je već pokazana povećana ekspresija i akumulacija aktivne pSTAT3 forme u jedru fibroblasta poreklom iz kože SSc pacijenata ili mišjih SSc modela (Šumová i sar., 2014). STAT3 bi mogao biti jedan od glavnih nizvodnih medijatora nekanoničnog TGF- $\beta$  signalnog puta, i mogao bi predstavljati važnu molekularnu tačku kontrole ka kojoj konvergira više profibrotičnih signala (Chakraborty i sar., 2017). Za otkrivanje novih biomarkera koji bi preciznije pratili progresiju fibroze od presudne je važnosti razumevanje tačnog mehanizma aktivacije JAK2/STAT3 signalne kaskade i interakcije ovog signalnog puta sa ostalim članovima signalnih kaskada pokrenutim fibrotičnim signalima u dermalnim fibroblastima.

Smatra se da posrednici između hronične inflamacije i fibroze u tkivu mogli bi predstavljati i članovi TLR familije receptora. Različiti DAMP molekuli koji se oslobađaju na mestu oštećenja tkiva/ćelijskog stresa mogu pokrenuti oslobađanje kako proinflamatornih tako i profibrotičnih citokina kroz aktiviranje TLR signalnog puta (Fullard i O'Reilly, 2015). Naime, TLR signalizacija ima značajnu ulogu u promociji normalnog procesa zarastanja rana, dok izmene u ovim signalnim putevima su sve više prepoznate kao okidač koji dovodi do regrutovanja mononuklearnih ćelija i sinteze proinflamatornih medijatora, kao što su IL6, IL1 i TNF- $\alpha$ , aktiviranja fibroblasta u miofibroblaste i preterane produkcije kako profibrotičnih medijatora, kao TGF- $\beta$  i IL13 (Lafyatis i York, 2009), tako i komponenti VCM, i posledičnog nekontrolisanog, hipertrofičnog zarastanja rana i fibroze kod nekoliko hroničnih bolesti (Ciechomska i sar., 2013a; Kluwe i sar., 2009; York, 2011). Stoga, bolje razumevanje mehanizama TLR-posredovane patogeneze i potencijalno novih targeta

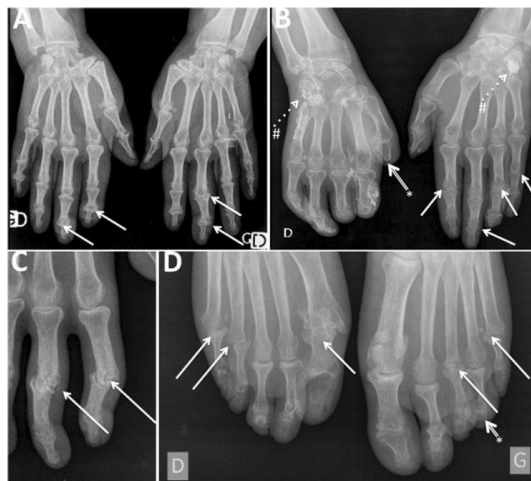
terapeutika u razvoju, moglo bi obezbediti specifičniji pristup u lečenju brojnih multisistemskih autoimunih bolesti.

Iako se imunomodulatorni lekovi široko koriste u lečenju SSc, nikakva terapija do danas nije u mogućnosti da zaustavi ili uspori progresiju fibroze u tkivu ili značajno modifikuje postojeći tok bolesti (Gabrielli i sar., 2009; Varga i Abraham, 2007), uključujući i anti-TGF- $\beta$  terapijske pristupe. Nedostatak efikasnih antifibrotičnih terapeutika postoji pre svega iz razloga što je etiologija fibrotičnih bolesti još uvek nepoznata. Sa druge strane postoji ogromna potreba za pouzdanim i preciznim biomarkerima koji precizno odražavaju fibrotični proces. Stoga, detaljna karakterizacija učesnika nizvodnih signalnih puteva ne samo da bi omogućila bolje razumevanje patogeneze same bolesti, već bi takođe pružila i važne informacije o potencijalno ciljnim molekulima novih selektivnijih i efikasnijih terapijskih intervencija. Analiza ekspresije gena iz uzoraka biopsija kože SSc pacijenata predstavljala bi interesantan pristup za identifikaciju upravo takvih biomarkera, kako upravo ovo tkivo predstavlja mesto ukrštanja procesa zapaljenja i fibroze.

#### **1.4. Degenerativne promene u koštano-zglobnom sistemu SSc pacijenata**

Iako je fibroza kože najkarakterističnija klinička manifestacija u SSc, poremećaji u koštano-mišićnom sistemu se ispoljavaju kod čak 46-97% pacijenata (Avouac i sar., 2012). Zahvaćenost zglobova patološkim promenama uzrokuje ograničene i bolne pokrete koji smanjuju radnu sposobnost i otežavaju svakodnevne aktivnosti čime značajno smanjuju kvalitet života osoba obolelih od SSc (Mau i sar., 2005). Manifestacije mogu uključivati različite stepene reumatoloških degenerativnih promena zglobova, od atralgije i artritisa, do kontraktura zglobova i tetivnog trenja. Ovim promenama mogu biti pogođeni gotovo svi zglobovi, ali najčešće su pogođeni mali zglobovi prstiju šaka i stopala (specifično proksimalni interfalangealni i metakarpofalangealni zglobovi, Slika 5.), ručni kao i skočni zglobovi (Avouac i sar., 2012; Balint i sar., 2014). Uprkos visokoj frekvenciji poremećaja u koštano-zglobnom sistemu kod ovih pacijenata, nije identifikovan nijedan prediktivni faktor asociran sa ovim promenama kod SSc (Avouac i sar., 2011). Smatra se da je etiologija patoloških promena na zglobovima multifaktorijalna i da može biti asocirana sa sistemskom

inflamacijom (Avouac i sar., 2010) sa jedne strane, o čemu svedoče podaci o infiltraciji inflamatornih ćelija u zglobni prostor (Schumacher, 1973), dok sa druge strane može nastati kao posledica ishemije usled oštećenja krvnih sudova i nemogućnosti snabdevanja zglobnih struktura kiseonikom i hranjivim materijama (Johnstone i sar., 2012).



Slika 5. Radiološki prikaz degenerativnih promena malih zglobova prstiju šaka (a, b, c) i stopala (d) kod SSc pacijenata. Slika preuzeta iz Avouac i sar., iz 2012. godine (Avouac i sar., 2012).

Simptomatske terapije za tretiranje promena u zglobnom sistemu nisu još uvek u potpunosti razvijene. Uglavnom se terapija zasniva na primeni immunosupresivnih terapeutika, kao što su metotreksat, ciklofosfamid, azatioprin, Rituksimab, Tocilizumab i mnogi drugi, koji uz veliki spektar neželjenih efekata koji se javljaju kao posledica njihove upotrebe, nisu pokazali, ili pokazuju izuzetno male efekte na artikularne ishode (Au i sar., 2010). Hiruške intervencije na šakama SSc pacijenata imaju ograničene uspehe, i obuhvataju najčešće olakšanje od bolova i uvođenje skromne mobilizacije u cilju poboljšanja funkcije prstiju (Jones i sar., 1987).

Upotrebom mezenhimskih adultnih matičnih ćelija napravljena je radikalna promena u terapiji različitih oboljenja. Aplikacija autolognih mezenhimskih matičnih ćelija kao terapijske strategije pokazala je veliku efikasnost u poboljšanju srčane funkcije nakon infarkta (Shake i sar., 2002), simptoma usled oštećenja na kostima i hrskavici (Paduano,

2017; Spasovski i sar., 2018; Wakitani i sar., 1994), kao i simptoma neurodegenerativnih bolesti kao što je Alzheimer (Woodbury i sar., 2000). Ova izuzetno atraktivna ćelijska terapija za primenu u regenerativnoj medicini koštano-mišićnog sistema, mogla bi da predstavlja novu nadu za lečenje artritisa malih zglobova kod SSc pacijenata.

#### 1.4.1. Humane adultne mezenhimske matične ćelije poreklom iz masnog tkiva

Mezenhimske matične ćelije (MMC) definišu se kao nediferencirane ćelije koje imaju veliki proliferativni potencijal i sposobnost održavanja sopstvene populacije procesom samoobnove, i koje se odlikuju multipotencijom, tj. sposobnošću diferencijacije u osteoblaste, hondroците, adipocite, miocite, astrocite i neurone (Pittenger i sar., 1999; Wei i sar., 2013). Ove ćelije se nalaze u svim tkivima koja sadrže vezivno-tkivne komponente, kao što su koštana srž, masno tkivo, pupčana vrpca i zubna pulpa, i tamo ostvaruju svoju ulogu u održavanju tkivne homeostaze, kao i u obnavljanju i reparaciji tkiva u slučaju povrede (Caplan, 2015; Paniushin i sar., 2006).

Ono što čini ove ćelije primamljivim za upotrebu u regenerativnoj medicini je to što se mogu lako izolovati iz pacijenta, zatim što se iz malog početnog broja ćelija, zahvaljujući njihovom velikom proliferativnom potencijalu, može ostvariti njihova dugotrajna *in vitro* ekspanzija i umnožavanje (Swart i sar., 2008). Ove ćelije su imuno privilegovane, te ne postoji opasnost od odbacivanja istih, kako eksprimiraju veoma malo članova MHC I i ne eksprimiraju članove MHC II klase molekula, ili razvoja infekcije (Uccelli i sar., 2006). MMC takođe imaju sposobnost ispoljavanja imunosupresivnih i anti-inflamatornih efekata (Tyndall i van Laar, 2010), bilo indirektno kroz produkciju solubilnih faktora ili direktno ćelijskim kontaktom (Krampera i sar., 2006). Pored zamene oštećenih ili izgubljenih ćelija svojom proliferacijom i diferencijacijom, MMC su takođe sposobne i da promovišu vaskularizaciju, kao i proliferaciju i diferencijaciju endogenih progenitorskih ćelija *in situ* (Meirelles Lda i sar., 2009). Masno tkivo postaje postepeno atraktivniji izvor ovih ćelija, zamenjujući koštanu srž, odakle su ove ćelije prvi put izolovane. Adipozno tkivo sadrži daleko više MMC u odnosu na isti volumen koštane srži, a uzimanje uzoraka vrši se daleko

lakše uz minimalno invazivni hirurški postupak pod lokalnom anestezijom (Yarak i Okamoto, 2010). Takođe, pokazano je da je imunomodulatorni efekat MMĆ poreklom iz masnog tkiva (aMMĆ) izraženiji u odnosu na MMĆ iz koštane srži (Melief i sar., 2013). U studiji Spasovski i sar., pokazano je da je terapija aMMĆ izuzetno perspektivan pristup u lečenju defekata hrskavice kod pacijenata sa osteoartritisom, pokazujući dugoročni efekat primenjene terapijske doze (Spasovski i sar., 2018). Stoga bi upotreba aMMĆ za lečenje artritisa malih zglobova SSc pacijenata svakako uvela radikalni i inovativni terapijski pristup, koji bi olakšao simptome pacijentima i doprineo poboljšanju kvaliteta njihovog života u svakodnevnoj rutini.

Uprkos rastućem znanju i upotrebi aMMĆ u ćelijskoj terapiji, ono što ostaje još uvek nepoznanica je kako njihova dugotrajna propagacija u ćelijskoj kulturi utiče na njihovu sposobnost samoobnavljanja i potencijal za regeneraciju hrskavice. Poznato je da geni matičnosti *OCT4* (eng. *Octamer-binding Transcription Factor 4*, OCT4) i *NANOG* (eng. *Nanog homeobox*, NANOG) utiču na održavanje osobine samoobnavljanja, dok geni *SOX5*, *SOX6* i *SOX9* (eng. *SRY-related HMG-box genes*, SOX), kao i *COL1A1* (eng. *Collagen type I Alpha 1 chain*, COL1A1) učestvuju u najranijim fazama hondrogene diferencijacije. Proučavanje ekspresije ovih gena tokom produženog gajenja ovih ćelija u laboratorijskim uslovima mogao bi da pruži odgovor na pitanje da li se osobine matičnosti, kao i potencijal za hondrogenu diferencijaciju ovih ćelija menja sa povećanjem broja ćelijskih deoba. Takođe, utvrđena razlika u ekspresiji odabranih gena poreklom iz različitih pacijenata mogla bi predstavljati novi prognostički parametar efikasnosti ćelijske terapije. U tom slučaju, za svakog pacijenta posebno bi se mogao odrediti pasaż koji bi bio najadekvantiji u smislu potentnosti i potencijala za regeneraciju hrskavice, prilikom primene ovih ćelija u tretmanu degenerativnih promena malih zglobova kod SSc pacijenata. Ovakvom optimizacijom svakako bi se povećala efikasnost ovog individualizovanog terapijskog pristupa.

## **2. CILJEVI**



Sistemska skleroza je usled svoje velike kompleksnosti i heterogenosti i dalje neistražena bolest nepoznate etiologije. Pronalaženje novih biomarkera, koji bi omogućili bolje razumevanje patogeneze same bolesti, doprineli bi ranijem uspostavljanju dijagnoze, boljoj klasifikaciji pacijenata i primeni adekvatnije terapije. Identifikacija potencijalno novih biomarkera na sistemskom i lokalnom nivou, pružila bi važne informacije o tome da li odabrane ključne komponente signalnih puteva JAK2/STAT3 i NF- $\kappa$ B mogu predstavljati ciljne molekule potencijalno novih terapijskih strategija.

Stoga, za ovaj deo našeg istraživanja formulisali smo sledeće ciljeve:

1. Analiza ekspresionih profila gena *IL6*, *JAK2*, *STAT3*, *TLR7*, *TLR9* i miRNK-146a, kao komponenti signalnih puteva uključenih u procese inflamacije, u mononuklearnim ćelijama periferne krvi SSc pacijenata, u cilju detekcije novih biomarkera bolesti na sistemskom nivou.
2. Ispitavanje asocijacije varijanti *miRNK-146a* rs2910164 i *IRAK1* rs3027898 sa predispozicijom za nastanak i progresiju SSc.
3. Analiza relativne ekspresija odabranih gena *JAK2*, *TLR7*, *TLR9*, *IRAK1* i miRNK-146a, kao komponenti signalnih puteva uključenih u proces fibroze, u uzorcima bioptiranog tkiva kože, u cilju pronalaženja novih biomarkera bolesti na lokalnom nivou.

Upotreba ćelijske terapije u lečenju oštećenja malih zglobova kod ovih pacijenata jedan je od potencijalno novih terapijskih pristupa. Uprkos rastućem znanju i upotrebi aMMĆ u ćelijskoj terapiji, veoma malo se zna kako gajenje ovih ćelija u laboratorijskim uslovima utiče na njihovu sposobnost samoobnove i potencijal za reparaciju oštećene hrskavice. S tim u vezi, definisali smo sledeće ciljeve:

4. Ispitivanje uticaja dugotrajne propagacije aMMĆ u *in vitro* uslovima na njihovu potentnost i potencijal za regeneraciju hrskavice, kroz analizu relativnih ekspresija gena *OCT4* i *NANOG*, odgovornih za suprimiranje njihove diferencijacije, održavanje njihove pluripotentnosti i nediferenciranog stanja matičnosti.
5. Ispitivanje uticaja dugotrajne propagacije aMMĆ u *in vitro* uslovima na njihovu sposobnost za hondrogenu diferencijaciju, kroz analizu ekspresije gena *SOX5*, *SOX6*, *SOX9* i *COL1A1*, uključenih u najranije faze hondrogene diferencijacije, u ranom i kasnom pasažu.

Razumevanje molekularnih mehanizama uključenih u održavanje karakteristika matičnih ćelija i njihovog potencijala za hondrogenu diferencijaciju, omogućilo bi bolju karakterizaciju ovih ćelija i samim tim povećanje efikasnosti terapije artritisa malih zglobova SSc pacijenata, optimizacijom ovog personalizovanog terapijskog pristupa.

# **3. MATERIJAL I METODE**

### 3.1. Ispitanici

Uzorci periferne krvi i bioptiranog tkiva kože pacijenata sa SSc prikupljeni su u saradnji sa Institutom za Reumatologiju, Kliničkog centra Srbije u Beogradu. Svi učesnici verifikovali su svoje učešće u istraživanju pismenim pristankom na posebno pripremljenom obrascu. Ispitivanje je sprovedeno uz poštovanje Helsinške deklaracije o medicinskim istraživanjima i principima dobre naučne prakse. Odobrenje za sprovođenje istraživanja dao je Etički komitet Kliničkog centra Srbije (broj odobrenja 29/1-70, 06.09.2016.). Svi pacijenti koji su ispunili EULAR 2013 klasifikacione kriterijume za SSc i imali sklerotične promene u makar jednom unutrašnjem organu, uključeni su u studiju (van den Hoogen i sar., 2013). Za svakog pacijenta prikupljeni su i prijavljeni sledeći podaci: starost, pol, trajanje bolesti, obrazac zahvaćenosti kože fibrotičnim promenama, laboratorijski nalazi (sedimentacija eritrocita-ESR, klirens kreatinina, C3 i C4), parametri funkcije pluća (vitalni kapacitet pluća-VC, difuzni kapacitet pluća za CO-DLCO), nalazi rendgenskog snimka pluća i/ili kompjuterizovane tomografije grudnog koša visoke rezolucije (HRCT), kao i nalazi ultrazvuka srca.

Za potrebe subfenotipskih analiza, SSc pacijenti podeljeni su u podgrupe na osnovu relevantnih kliničkih parametara. Na osnovu mRSS vrednosti, kao objektivne procene zahvaćenosti kože fibrotičnim promenama, merenjem njene tvrdoće i zadebljanja na 17 različitih tačaka na telu, SSc pacijenti su podeljeni u dve grupe, jednu grupu pacijenata sa umerenijom i blažom ( $mRSS \leq 10$ ) i drugu grupu pacijenata sa izrazitijom i težom zahvaćenošću površine kože fibrotičnim promenama ( $mRSS > 10$ ). Na osnovu obrasca rasprostranjenosti sklerodermnih promena, a prema kriterijumima koji su predložili Leroy i sar. (LeRoy i Medsger, 2001), SSc je svrstana u dva glavna oblika: ISSc i dSSc. Ovi oblici bolesti se međusobno značajno razlikuju po težini kliničke slike i prognozi bolesti. Na osnovu evaluacije kliničkih i laboratorijskih parametara, na način kako su to definisali Valentini i sar. (Valentini i sar., 2001) aktivnost bolesti rangirana je od 0 do 10 (0 predstavlja odsustvo aktivnosti, dok 10 predstavlja maksimalnu aktivnost bolesti) za svakog SSc pacijenta. Oni pacijenti koji su imali vrednost  $\geq 3$  svrstavani su u grupu pacijenata sa aktivnom formom bolesti, za razliku od onih koji su imali ovu vrednost  $< 3$  i bili svrstavani u grupu pacijenata

sa stabilnom formom bolesti. Kod 95% SSc pacijenata u serumu detektovana su specifična autoantilela za SSc. Na osnovu tipa antitela, SSc pacijenti su podeljeni u 3 grupe: prvu koju karakteriše isključivo prisustvo ACA, drugu koju karakteriše isključivo prisustvo ATA i treću grupu pacijenata koju karakteriše prisustvo više od jednog tipa antinuklearnih antitela (ANA). Prisustvo plućne fibroze bilo je definisano pozitivnim rendgenskim i HRCT nalazima. Trajanje bolesti definisano je kao vreme koje protekne od pojave prvog simptoma različitog od Raynaudov fenomena do trenutka uključivanja u studiju. Na osnovu trajanja bolesti SSc pacijenti su podeljeni u grupe sa trajanjem bolesti  $<3$  kao ranim oblikom, i  $\geq 3$  godine kao kasnim oblikom bolesti.

U asocijativnu studiju uključeno je 102 SSc pacijenta (88 osoba ženskog i 14 osoba muškog pola) sa prosekom godina  $57.7 \pm 11.0$ . Kontrolna grupa sastojala se od 66 zdravih ispitanika (56 osoba ženskog i 10 osoba muškog pola) koji su usklađeni sa pacijentima po poreklu, polu i starosti (sa prosekom godina  $55.2 \pm 10.2$ ). Analiza ekspresije odabranih gena izvedena je na podgrupama od 50 SSc pacijenata (45 osoba ženskog i 5 osoba muškog pola, uzrasta  $59.6 \pm 9.3$  godina) i 13 zdravih pojedinaca (10 osoba ženskog i 3 osobe muškog pola, sa prosekom godina  $57.2 \pm 11.5$ ) za koje su bili dostupni uzorci mononuklearnih ćelija za izolaciju RNK.

Demografske, kliničke i serološke karakteristike SSc pacijenata i kontrolnih pojedinaca koji su učestvovali u ovoj studiji prikazani su u Tabeli 1 i 2.

Tabela 1. Demografske, kliničke i serološke karakteristike SSc pacijenata i zdravih pojedinaca uključenih u asocijativnu studiju

		<b>SSc pacijenti</b>	<b>Kontrolni ispitanici</b>
<b>Demografski podaci</b>			
<b>Broj</b>		102	66
<b>Starost</b>	prosek ± SD	57.7 ± 11.0 god;	55.2±10.2 god;
	medijana	59.0 god;	55.5 god;
<b>Distribucija polova</b>	ženski	88 (86%)	56 (83%)
	muški	14 (14%)	10 (17%)
<b>Kliničke karakteristike</b>			
<b>Trajanje blesti</b>	prosek ± S.D	8.9 ± 8.2 yr;	
	medijana	6.5 yr;	
	rana forma	28 (27%)	
	kasna forma	74 (73%)	
<b>Klinički podtipovi</b>	difuzni oblik	22 (22%)	
	limitirani oblik	79 (77%)	
<b>Aktivnost bolesti</b>	aktivna	32 (31%)	
	stabilna	70 (69%)	
<b>Zahvaćenost bubrega</b>		22 (22%)	
<b>Zahvaćenost pluća</b>		65 (64%)	
<b>Digitalni ulceri</b>		9 (18%)	
<b>Fibroza pluća</b>		28 (27%)	
<b>mRSS vrednost</b>	≤10	63 (62%)	
	>10	39 (38%)	
<b>Serološke karakteristike</b>			
	prisustvo ACA	35 (34%)	
	prisustvo ATA	28 (27%)	
	prisustvo ANA	25 (25%)	
	odsustvo antitela	14 (14%)	
<b>Terapija</b>			
	Endoksan	69 (67%)	
	Imuran	19 (18%)	
	Prednizon	40 (39%)	
	Metotreksat	46 (45%)	

Tabela 2. Demografske, kliničke i serološke karakteristike SSc pacijenata i zdravih pojedinaca uključenih u relativne ekspresione analize

		<b>SSc pacijenti</b>	<b>Kontrolni ispitanici</b>
<b>Demografski podaci</b>			
<b>Broj</b>		50	13
<b>Starost</b>	prosek ± SD	58.9 ± 9.2 god;	57.2 ± 11.5 god;
	medijana	61.0 god;	54 god;
<b>Distribucija polova</b>	ženski	45 (90%)	10 (77%)
	muški	5 (10%)	3 (23%)
<b>Kliničke karakteristike</b>			
<b>Trajanje blesti</b>	prosek ± S.D	8.0 ± 6.4 god;	
	medijana	6.0 god;	
	rana forma	13 (26%)	
	kasna forma	37 (74%)	
<b>Klinički podtipovi</b>	difuzni oblik	8 (16%)	
	limitirani oblik	42 (84%)	
<b>Aktivnost bolesti</b>	aktivna	17 (34%)	
	stabilna	33 (66%)	
<b>Zahvaćenost bubrega</b>		12 (24%)	
<b>Zahvaćenost pluća</b>		27 (54%)	
<b>Digitalni ulceri</b>		9 (18%)	
<b>Fibroza pluća</b>		18 (36%)	
<b>mRSS vrednost</b>	≤10	25 (50%)	
	>10	25 (50%)	
<b>Serološke karakteristike</b>			
	prisustvo ACA	19 (38%)	
	prisustvo ATA	15 (30%)	
	prisustvo ANA	12 (24%)	
	odsustvo antitela	4 (8%)	
<b>Terapija</b>			
	Endoksan	19 (38%)	
	Imuran	15 (30%)	
	Prednizon	12 (24%)	
	Metotreksat	4 (8%)	

### 3.2. Izolacija DNK iz periferne krvi

Sveži uzorci periferne krvi SSc pacijenta i kontrolnih ispitanika uzeti su na 3.8% Na-citratu kao antikoagulansu u odnosu 9:1. Za izolaciju DNK iz periferne krvi korišćen je *QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Nemačka)*.

#### **Protokol:**

- U mikrotube 1.5 ml zapremine (*Ependorf*) dodati 20 µl proteinaze K (20 mg/ml), 200 µl uzorka periferne nekoagulisane krvi, 200 µl AL pufera i promešati vorteksovanjem 15sec
- Inkubirati 10 min u vodenom kupatilu na 56<sup>0</sup>C
- Spustiti uzorak na dno tube kratkim centrifugiranjem (“spin-down” centrifugiranje)
- U tubu dodati 200 µl 96-100% etanola, a zatim vorteksovati 15sec
- “Spin-down” centrifugiranje
- Uzorak naneti na *QIAamp Mini spin* kolonicu i centrifugirati 1 min na 8 000 rpm
- Odbaciti filtrate, a zatim kolonicu isprati sa 500 µl AW1 pufera
- Centrifugirati 1 min na 8 000 rpm
- Odbaciti filtrat i kolonicu isprati sa 500 µl AW2 pufera i centrifugirati 3 min na 13 000 rpm
- Odbaciti filtrate, kolonicu prebaciti u novu sterilnu mikrotubu, dodati 150 µl AE pufera za eluciju i inkubirati 10 min na sobnoj temperaturi
- Centrifugirati 1 min na 8 000 rpm
- Prinos i čistoća izolovane DNK određivani su na *NanoVue* spektrofotometru (*GE Healthcare Life sciences, Amersham, UK*), po uputstvu proizvođača za rad na aparatu
- Uzorak izolovane DNK čuvani su na -20<sup>0</sup>C.



### 3.3. Izolacija mononuklearnih ćelija iz periferne krvi

Za izolaciju mononuklearnih ćelija sačinjenih od 70-90% limfocita, 10-20% monocita i 1-2% dendritičnih ćelija, upotrebljeni su sveži uzorci pune periferne krvi i rastvor fikola (*Ficoll-Paque Plus*, *GE Healthcare Life sciences, UK*) u cilju razdvajanja krvnih ćelija centrifugiranjem na gradijentu gustine.

#### **Protokol:**

- Naneti 3 ml *Ficoll-Paque Plus* na dno sterilne epruvete zapremine 10 ml
- Pažljivo naslojiti 4 ml razblaženog uzorka (uzorak:fiziološki rastvor, 0.9% NaCl = 1:1) tako da se dve faze ne mešaju
- Centrifugirati 25 min na 1 500 rpm na sobnoj temperaturi (RT)
- Pažljivo pokupiti beličastu interfazu, sačinjenu od MNĆPK i prebaciti je u novu sterilnu epruvetu zapremine 10 ml
- Za ispiranje naliti 8 ml 1x PBS (eng. *Phosphate Buffered Saline*, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), isprati u epruvetu i promešati inertovanjem 10-15 puta a zatim centrifugirati 15 min na 1 500 rpm na RT
- Odliti supernatant i resuspendovati talog sačinjen od MNĆPK u *TRI Reagent (Ambion)*
- Resuspendovan talog u *TRI Reagent* prebaciti u novu sterilnu mikrotubu zapremine 1.5 ml
- Uzorak izolovanih MNĆPK čuvati na -80°C.

### 3. 4. Izolacija RNK iz mononuklearnih ćelija

Za izolaciju ukupne RNK visokog kvaliteta iz MNĆPK je korišćen *TRI Reagent*. Ovaj monofazni rastvor fenola i guanidin-izotiocijanata odvaja frakcije DNK i proteina od frakcije RNK, ne dozvoljavajući narušavanje njenog integriteta prilikom izolacije. Upotrebljen metod izolacije RNK predstavlja unapređen klasični metod izolacije koji su predhodno definisali Chomczynski i Sacchi (Chomczynski i Sacchi, 2006).

**Protokol:**

- Lizirati MNČPK čuvane u *TRI Reagent*, provlačenjem 5-10 puta kroz iglu promera 0.7 mm
- Dodati 200 µl hloroforma i snažno promućkati rukom, a zatim inkubirati 15 min na RT
- Centrifugirati 15 min na 12 200 rcf na 4<sup>0</sup>C
- Nakon centrifugiranja jasno se izdvajaju tri faze: gornja, vodena faza u kojoj se nalazi rastvorena RNK, interfaza i organska, donja faza sa proteinima i DNK
- Bez dodirivanja interfaze, polako pokupiti gornju fazu sa RNK i prebaciti je u novu sterilnu mikrotubu zapremine 1.5 ml
- Da bi RNK precipitirala, dodati 500 µl izopropanola (na 1ml *TRI Reagent* rastvora), invertovati i inkubirati 10-15 min na RT, a zatim centrifugirati 10 min na 12 200 rcf na 4<sup>0</sup>C
- Ukloniti supernatant dekantovanjem i dodati 1 ml hladnog 70% etanola koji je razblažen destilovanom vodom tretiranom 0.1% dietilpirokarbonatom (DEPC)
- Centrifugirati 10 min 12 200 rcf na 4<sup>0</sup>C
- Ukloniti supernatant i ostatak etanola, a zatim talog osušiti na RT (paziti da se talog ne presuši)
- Rastvoriti talog u 30 µl vode oslobođene od RNaza i inkubirati 10-15 min u vodenom kupatilu na 56<sup>0</sup>C uz povremeni vorteks
- Prinos i čistoća izolovane RNK određivani su na *NanoVue* spektrofotometru
- Uzorak izolovane RNK čuvan je na -80<sup>0</sup>C do ponovne upotrebe
- DEPC voda je prethodno pripremana je na sledeći način: 0.1% rastvor DEPC vode inkubiran je preko noći na 37<sup>0</sup>C, a zatim autoklaviran 60 min na 100<sup>0</sup>C.

**3. 5. Izolacija RNK iz uzoraka bioptiranog tkiva kože**

Uzorkovano tkivo biopsije kože sa dela zahvaćenog fibrotičnim promenama i dela bez vidljivih promena kod SSc pacijenata, se odmah uranjalo u rastvor *Allprotect Tissue Reagent* (*Qiagen, Nemačka*), koji je namenjen stabilizaciji RNK i očuvanju nativnih proteina do njihove izolacije. Biopsijom se dobijalo oko 5 mg tkiva kože koje je čuvano u 200 µl navedenog rastvora. Uzorci su inkubirani preko noći na 4<sup>0</sup>C i dalje čuvani na -20<sup>0</sup>C. Izolacija

molekula RNK iz uzoraka biotiranog tkiva kože vršena je prema protokolu proizvođača *RNeasy Mini Kit*-a koji je korišćen za tu svrhu (*Qiagen, Nemačka*).

**Protokol:**

- Napraviti denaturišući RTL pufer sa  $\beta$ -merkaptoetanolom (10  $\mu$ l  $\beta$ -merkaptoetanela na 1 ml pufera RTL)
- Dodati 350  $\mu$ l ovako pripremljenog rastvora u sterilnu epruvetu zapremine 10 ml
- Uzorak tkiva koji je čuvan u *ALLprotect Tissue Reagent* izvaditi sterilnom iglom, osušiti sterilnom vatom i prebaciti u epruvetu sa rastvorom
- Homogenizovati tkivo u trajanju od 30 - 60 sec u epruveti, homogenizatorom *TissueRuptor* (*Qiagen*) na maksimalnoj brzini
- U novu sterilnu mikrotubu od 1.5 ml zapremine prebaciti lizat nakon homogenizacije i centrifugirati 3 min na 13 000 rpm
- Supernatant prebaciti u novu sterilnu mikrotubu i dodati jednaku zapreminu hladnog 70% DEPC etanola (etanol razblažen sa 0.1% DEPC vodom), a zatim promešati
- Prebaciti uzorak na *RNeasy Mini Kit* kolonu i centrifugirati 30 sec na 12 000 rpm, zatim odbaciti filtrat
- Naneti na kolonicu 700  $\mu$ l RW1 pufera i centrifugirati 30 sec na 12 000 rpm, odbaciti filtrat
- Dodati 500  $\mu$ l RPE pufera i centrifugirati 30 sec na 12 000 rpm, odbaciti filtrat
- Dodati 500  $\mu$ l RPE pufera i centrifugirati 2 min na 12 000 rpm, odbaciti filtrat
- Prebaciti kolonicu u novu sterilnu mikrotubu i dodati 30  $\mu$ l vode oslobođene od RNaza
- Inkubirati 2 min na RT, a zatim centrifugirati 1 min na 12 000rpm
- Prinos i čistoća izolovane RNK utvrđivani su na *Quibit 3.0* fluorimetru (*Invitrogen, SAD*) uz upotrebu *Quibit RNA BR Assay Kit*-a (*Invitrogen*) prema protokolu proizvođača
- Uzorak izolovane RNK čuvan je na  $-80^{\circ}\text{C}$  do sledeće upotrebe.

### 3. 6. Reakcija lančanog umnožavanja DNK

Reakcija lančanog umnožavanja (eng. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) predstavlja amplifikaciju ciljne sekvence DNK u *in vitro* uslovima, korišćenjem dva oligonukleotida (prajmera) koji su uzajamno suprotno orijentisani, i koji su komplementarni krajevima ciljne sekvence. Svaki ciklus PCR reakcije koji se sastoji od denaturacije DNK, hibridizacije prajmera i ekstenzije hibridizovanih prajmera, katalizovan je termostabilnom DNK polimerazom. Ponavljanje ciklusa omogućava stvaranje velikog broja kopija ciljne sekvence DNK, počev od male početne količine DNK uzorka. Za *in vitro* sintezu DNK neophodno je da PCR reakciona smeša sadrži sledeće komponente: DNK matricu, odgovarajuće prajmere, nukleotide kao gradivne DNK elemente, *Taq* polimerazu koja katalizuje samu reakciju, kao i jone magnezijuma i pufer koji su neophodni za njen optimalni rad (Brajuskovic, 2012).

### 3. 7. Analiza DNK fragmenata elektroforezom na agaroznom gelu

Analiza umnoženih fragmenata DNK reakcijom PCR, izvršena je na horizontalnom agaroznom gelu (koncentracije od 2% do 4%), zavisno od veličine DNK fragmenta koji se analizira. Prilikom pripreme agaroznog gela dodavan je i etidijum bromid (1 µg/ml). Elektroforeza je vršena u 1x TAE puferu (1mM Na<sub>2</sub>EDTA, 20 mM Na-acetat, 40mM Tris), pri struji jačine od 5 A/cm i naponu od 4-7 V/cm. Vizuelizacija DNK izvršena je izlaganjem gela UV svetlosti talasne dužine od 266 nm. Fotografisanjem gela kamerom CCD sa integrisanim *BioDocAnalyze* sistemom, dobija se trajni zapis rezultata u obliku digitalne slike. Za određivanje veličine analiziranih fragmenata DNK upotrebljeni su odgovarajući DNK markeri koji su komercijalno dostupni (*Fermentas*).

### 3. 8. Reverzna transkripcija

Metoda reverzne transkripcije, na osnovu koje je sintetisana cDNK od predhodno izolovane RNK, izvedena je po upustvu proizvođača *RevertAid Reverse Transcriptase Kit-a* (*ThermoFisher Scientific*) koji je u tu svrhu upotrebljen.

**Protokol:**

- 11  $\mu$ l smeše koja sadrži 1  $\mu$ g RNK poreklom iz krvi (odnosno 400 ng RNK poreklom iz tkiva) i 100 pmol nasumičnih heksamera kao prajmera, inkubirati 5 min na 70°C i prebaciti na led
- Dodati zatim smešu volumena 9  $\mu$ l koja sadrži 40 U *M-MuLV* reverzne transkriptaze, 0.5  $\mu$ l *Ribo-Lock* RNaznog inhibitora, 2  $\mu$ l dNTP (10 mM) i 4  $\mu$ l 5x RT-puferu (*ThermoFisher Scientific*)
- Inkubirati na 15 min na 25°C, onda 60 min na 42°C, a potom inkubacijom od 10 min na 70°C zaustaviti reakciju
- Uzorak cDNK koncentracije 50 ng/ $\mu$ l (u ukupnoj zapremini od 20  $\mu$ l) čuvati na -20°C do dalje upotrebe.

**3.9. Provera kvaliteta sintetisane cDNK**

Kvalitet novosintetisane cDNK proveravan je amplifikacijom odabranog regiona konstitutivno eksprimiranog gena *ABL* (“housekeeping”). Ovakvim postupkom indirektno je određivana kako očuvanost izolovane RNK koja je upotrebljena kao matrica za sintezu cDNK, tako i efikasnost same reakcije reverzne transkripcije. Sekvence prajmera korišćene za umnožavanje željenog regiona prikazane su u tabeli 3. Sastav reakcione smeše, kao i temperaturni profil PCR reakcije navedeni su u tabeli 4.

Tabela 3. Sekvence prajmera korišćene u okviru provere kvaliteta sintetisane cDNK za umnožavanje odabranog regiona gena *ABL*

Gen	Sekvenca (5'–3' smer) prajmera		Dužina (bp)
<i>ABL</i>	uzvodni	5'-ATCTGCCTGAAGCTGGTGGGCT-3'	22
	nizvodni	5'-TGTGATTATAGCCTAAGACCCGGAG-3'	25

Tabela 4. Sastav PCR reakcione smeše kao i temperaturni profil PCR reakcije

Sastav PCR reakcije ukupnog volumena od 25 $\mu$ l:	Temperaturni profil PCR reakcije:
50 ng cDNK	1. 5 min/ 95 <sup>0</sup> C
1 x PCR pufer	2. 35 ciklusa:
1 x Q rastvor	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 30 sec/ 95<sup>0</sup>C</li> <li>• 1 min/ 65<sup>0</sup>C</li> <li>• 1 min/ 72<sup>0</sup>C</li> </ul>
1.5 mM MgCl <sub>2</sub>	
0.4 mM dNTP	
0.4 $\mu$ M prajmera (uzvodni i nizvodni)	
1 U <i>Taq</i> polimeraze ( <i>Kapa Biosystems</i> )	3. 10 min/ 72 <sup>0</sup> C

Provera uspešnosti PCR amplifikacije vršena je elektroforezom na 2% agaroznom gelu. Ukoliko je umnožen fragment dektovan na dužini koja odgovara 277 bp, smatrano je da sintetisana cDNK može da se upotrebi za analizu ekspresije odabranih gena metodom RT-qPCR.

### 3. 10. Praćenje ekspresije gena pomoću metode PCR u realnom vremenu (qPCR)

Kvantitativni PCR ili PCR u realnom vremenu (eng. *real-time PCR*, qPCR) omogućava preciznu kvantifikaciju dobijenog PCR produkta nakon svakog završenog pojedinačnog ciklusa PCR reakcije, tj. u realnom vremenu. Kod qPCR metode, merenje količine produkta vrši se u toku eksponencijalne faze reakcije, kada prilikom svakog PCR ciklusa, dolazi do dupliranja količine PCR produkta, za razliku od klasične PCR metode kod koje se određivanje količine dobijenog produkta vrši isključivo na samom kraju PCR reakcije. Ovom metodom omogućena je i precizno određivanje količine početne matrice DNK (Brajuskovic, 2012).

Intenzitet fluorescencije u početnim PCR ciklusima relativno je ujednačen i naziva se bazalni ili osnovni nivo fluorescencije. Sa povećanjem broja ciklusa intenzitet fluorescencije raste i u pozitivnoj je korelaciji sa brojem amplifikovanih PCR produkata. Kada

fluorescentni signal uzorka postane značajno viši od bazalnog nivoa, taj ciklus naziva se „*threshold cycle*“ – Ct. Vrednost Ct je obrnuto proporcionalna količini target sekvence uzorka. Ukoliko je početni broj kopija odabrane sekvence veći, to će detektovana vrednost Ct biti niža, i obratno, što je početna količina DNK u uzorku veća, da bi fluorescentni signal postao statistički veći od bazalnog nivoa fluorescencije, manje će ciklusa biti potrebno.

Trenutno dve osnovne tehnike koje se koriste u qPCR metodi su *SYBR Green* i *TaqMan*.

*SYBR Green* bila je prva primenjena fluoroboja u qPCR-u. Tehnika se zasniva na vezivanju ove fluoroboje za manji žleb dvolančanih produkata DNK i na emisiji svetlosti na određenoj talasnoj dužini (520 nm). Nivo emitovane svetlosti proporcionalan je zastupljenosti ciljne DNK u uzorku koji se analizira. Kako se broj PCR ciklusa povećava tako se povećava i količina dvolančane DNK, a samim tim i jačina fluorescentnog signala koga *SYBR Green* boja emituje. Pored toga, intenzitet signala koji se meri, zavisi ne samo od količine nego i od dužine ciljne sekvence. Što je ciljna sekvenca duža intenzitet signala će biti jači. Međutim, nedostatak ove tehnike jeste njena nedovoljna specifičnost, što za posledicu može imati detekciju dimera prajmera i umnoženih nespecifičnih PCR produkata. Stoga se analiza krive topljenja koristi za procenu njene specifičnosti. Nivo fluorescencije konstatno se prati kako temperatura raste postepeno od 40<sup>0</sup>C do 95<sup>0</sup>C. Pri nižim temperaturama, ukoliko je prisutna dvolančana DNK, postojaće visok fluorescentni signal. Na temperaturi oko tačke topljenja PCR produkata, intenzitet fluorescencije značajno će opasti. Tako da ukoliko je prisutan samo specifičan PCR produkt, kriva topljenja/disocijacije pokazaće samo jedan pik fluorescencije. U slučaju da postoje više PCR produkata različitog sastava i dužine, na krivi topljenja dobija se više pikova fluorescencije usled razlika u njihovim tačkama topljenja.

*TaqMan* tehnika za detekciju PCR produkata koristi 5'→3' egzonukleaznu aktivnost *Taq* polimeraze. Proba *TaqMan* je dužine oko 20-30 nukleotida, vezuje se nizvodno od prajmera i komplementarna je delu sekvence koji se umnožava. Ove probe su obeležene sa dve fluoroboje, boja koja se nalazi na 5' kraju je reporterska, fluorescentna boja- R (najčešće

FAM, JOE ili VIC), dok se na 3' kraju nalazi prigušivač- Q (eng. *quencher*). Sve dok je proba intaktna, tj. dok se R boja nalazi u blizini Q boje, intenzitet fluorescencije nije detektabilan. Razlog tome je transfer fluorescentne rezonantne energije (eng. *Fluorescence Resonance Energy Transfer*, FRET), odnosno emisija energija R boje prenosi se na Q boju bez emitovanja fotona. Uklanjanjem sa DNK lanca hibridizovane probe egzonukleaznom aktivnošću *Taq* polimeraze, R boja nije više u blizini Q boje, što za posledicu ima detektabilnu emisiju fluorescencije. Količina DNK za koju se vezuju probe *TaqMan*, povećava se svakim narednim ciklusom. Kako je intenzitet fluorescencije proporcionalan količini umnoženih molekula DNK, tako raste i jačina signala (Brajuskovic, 2012).

Kvantifikacija podataka dobijenih qPCR metodom može biti apsolutna i relativna. Rezultat u apsolutnoj kvantifikaciji predstavljen je kao apsolutni broj kopija ciljne sekvence. Taj broj se dobija poređenjem sa standardnom krivom dobijenom kvantifikacijom uzoraka poznate koncentracije. U relativnoj kvantifikaciji, krajni rezultat je predstavljen relativnim odnosom referentnog uzorka (kalibratora) i uzorka koji se meri. Oba ova pristupa zahtevaju normalizaciju podataka, stoga se paralelno sa umnožavanjem target sekvence vrši i amplifikacija endogene kontrole. Endogena kontrola je najčešće konstitutivno ekspimiran („housekeeping“) gen koji ima stabilnu ekspresiju u svim uzorcima koji se kvantifikuju.

### 3. 11. Relativna kvantifikacija

Komparativni ddCt metod koji su definisali Livak i Schmittgen (Livak i Schmittgen, 2001) najčešće je upotrebljavan metod kvantifikacije ekspresije gena. Količina ispitivanog gena, koji je normalizovan u odnosu na unutrašnju kontrolu i relativno izražen u odnosu na kalibrator je:

$$Q = 2^{-ddCt} ; \quad \text{pri čemu je } ddCt = dCt_U - dCt_K = (Ct_T - Ct_E) - (Ct_{T,K} - Ct_{E,K})$$

U-uzorak; K-kalibrator; T-target; E-endogena kontrola;

Ova metoda zahteva približno istu visoku efikasnost amplifikacije (iznad 96%) kako target gena tako i endogene kontrole.



3. 11. 1. Određivanje relativne ekspresije gena *IL6*, *JAK2*, *STAT3*, *TLR7*, *TLR9* i *IRAK1*

Nivoi ekspresije selektovanih gena analizirani su metodom qPCR u kojoj se kao matrica za amplifikaciju specifične sekvence koristi predhodno sintetisana cDNK, što znači da su ovoj metodi predhodili metode izolacije RNK iz MNČPK i tkiva kože, kao i reverzna transkripcija. Relativna ekspresija gena određivana na je na aparatu *7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)*, upotrebom *TaqMan* tehnike za određivanje ekspresije gena *JAK2*, *TLR7*, *TLR9* i *IRAK1*, dok su nivoi ekspresije gena *IL6* i *STAT3* praćeni upotrebom *SYBR Green* tehnike. Ekspresija gena *GAPDH* (eng. *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*, *GAPDH*) korišćena je kao endogena kontrola za normalizaciju količine ukupne RNK u svakom uzorku (Baluchamy i sar., 2007; Clark i sar., 2008). Svi eksperimenti urađeni su u duplikatu. Sekvence prajmera i proba kao i kataloški brojevi komercijalno dostupnih eseja korišćenih za merenje ekspresije gena navedeni su u tabeli 5.

Tabela 5. Sekvence prajmera i proba, kao i kataloški brojevi komercijalno dostupnih eseja upotrebljenih za merenje relativne ekspresije gena *JAK2*, *TLR7*, *TLR9*, *IRAK1*, *IL6*, *STAT3* i *GAPDH*

Gen	Sekvence (5'→3' smer) upotrebljenih prajmera i proba		Dužina (bp)	qPCR hemija
<b>JAK2</b>	Esej za ekspresiju gena Hs00234567_m1 ( <i>ThermoFisher Scientific</i> )			<i>TaqMan</i>
<b>IRAK1</b>	Esej za ekspresiju gena Hs01018347_m1 ( <i>ThermoFisher Scientific</i> )			<i>TaqMan</i>
<b>TLR7</b>	uzvodni nizvodni proba	5'-GGAGGTATTCCCACGAACACC-3'	21	<i>TaqMan</i>
		5'-TGACCCCAGTGAATAGGTACAC-3'	23	
		(FAM)5'-CGAACCTCACCCTCACCATTAACCACAT-3'-(TAMRA)	28	
<b>TLR9</b>	uzvodni nizvodni proba	5'-GGACCTCTGGTACTGCTTCCA-3'	21	<i>TaqMan</i>
		5'-AAGCTCGTTGTACACCCAGTCT-3'	22	
		(FAM)-5'-ACGATGCCTTCGTGGTCTTCGACAAA-3'-(TAMRA)	26	
<b>GAPDH</b>	uzvodni nizvodni proba	5'-GAAGGTGAAGGTCCGAGT-3'	18	<i>TaqMan</i>
		5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'	20	
		(FAM)-5'-GGCTGAGAACGGGAAGCTTG-3'-(TAMRA)	20	
<b>IL6</b>	uzvodni nizvodni	5'-GCAAAGAGGCACTGGCAGAA-3'	20	<i>SYBR Green</i>
		5'-GGCAAGTCTCCTCATTGAATCC-3'	22	
<b>STAT3</b>	uzvodni nizvodni	5'-ACCTGCAGCAATACCATTGAC-3'	21	<i>SYBR Green</i>
		5'-AAGGTGAGGACTCAACCTGC-3'	21	
<b>GAPDH</b>	uzvodni nizvodni	5'-GTGAAGGTCCGAGTCAACG-3'	19	<i>SYBR Green</i>
		5'-TGAGGTCAATGAAGGGGTC-3'	19	

Sastav PCR reakcije finalnog volumena od 10  $\mu$ l:

<i>TaqMan</i> hemija	<i>SYBR Green</i> hemija
50 ng cDNK iz krvi, 20 ng cDNK iz tkiva prajmeri finalne koncentracije 300 nM proba finalne koncentracije 200 nM 1x <i>ROX High</i> finalne koncentracije 500 nM 1x <i>KAPA PROBE FAST Universal qPCR Master Mix</i> (Kapa Biosystems)	50 ng cDNK iz krvi, 20 ng cDNK iz tkiva Prajmeri finalne koncentracije 300 nM 1x <i>ROX High</i> referetna boja finalne koncentracije 500 nM 1x <i>KAPA SYBR FAST Universal qPCR Master Mix</i> (Kapa Biosystems)

Kvantifikacija ekspresije gena *JAK2* i *IRAK1* izvršena je u PCR reakciji finalnog volumena 10  $\mu$ l koristeći 50 ng cDNK poreklom iz krvi i sa *TaqMan Universal Master Mix II* (Applied Biosystems), ekspresionim esejima za gene *JAK2* i *IRAK1* (*TaqMan Gene Expression Assays* Hs00234567\_m1 i Hs01018347\_m1, ThermoFisher Scientific) po protokolu proizvođača koristeći ekspresiju gena *GAPDH* kao endogenu kontrolu. Svi uzorci mereni su u duplikatu.

Temperaturni profil za sve PCR reakcije je bio:

1. 50<sup>0</sup>C/ 2 min
2. 95<sup>0</sup>C/ 10 min
3. 45 ciklusa
  - 95<sup>0</sup>C/ 15 sec
  - 60<sup>0</sup>C/ 1 min

4. U slučaju merenja ekspresije uz upotrebu *SYBR* hemije rađenja je i kriva topljenja radi utvrđivanja specifičnosti PCR reakcije.

Za obradu rezultata upotrebljen je komparativni ddCt metod, pri čemu je medijana dCt vrednosti zdravih kontrolnih uzoraka korišćena kao kalibrator.

## 3. 11. 2. Određivanje relativne ekspresije miRNK-146a

Određivanje relativne ekspresije zrele miRNK-146a vršeno je *TaqMan MicroRNA Assay-a* (*Applied Biosystems, SAD*) po upustu proizvođača. Ova analiza se zasniva na dvostepenoj RT-qPCR metodi, sastavljenom od reverzne transkripcije i PCR amplifikacije.

Reverzna transkripcija: Polazeći od uzoraka totalne RNK, cDNK sintetisana je uz pomoć specifičnih RT-prajmera sa petljom (“stem-loop”) i komponenti *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit-a* (*Applied Biosystems*).

Sastav i temperaturni profil RT reakcije finalnog volumena od 15 µl:

Sastav reakcione smeše ukupnog volumena od 15 µl:	Temperaturni profil RT reakcije:
20 ng RNK iz periferne krvi i uzoraka tkiva kože 1.5 µl RT-prajmer za miRNK-146a 1.5 µl RT-prajmer za RNU6B 0.15 µl 100mM dNTP-a 1 µl 50 U/µl <i>MultiScribe</i> reverzna transkriptaza 1.5 µl 10x RT pufera 0.19 µl Rnazni Inhibitor, 20 U/µl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 16°C / 30 min</li> <li>• 42°C/ 30 min</li> <li>• 85°C/ 5 min</li> <li>• 4°C/ ∞</li> </ul>

PCR amplifikacija: U ovom koraku, polazeći od predhodno sintetisane cDNK iz periferne krvi i bioptiranog tkiva kože, željeni PCR produkti amplifikuju se na aparatu *7900 HT Fast Real-Time PCR System*, upotrebom odgovarajućih *Taqman MicroRNA Assay-a* i *TaqMan Universal PCR Master Mix-a* (*Applied Biosystems*).

Sastav i temperaturni profil PCR reakcije:

Sastav reakcione smeše ukupnog volumena od 10 $\mu$ l:	Temperaturni profil PCR reakcije:
RT produkt (razblaženje 1:15) 0.5 $\mu$ l <i>TaqMan miR-146a Gene Expression Assay-a za miRNK-146a*</i> 5 $\mu$ l <i>TaqMan 2x Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG</i>	1. 95°C/ 10 min 2. 40 ciklusa: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 95°C/ 15 sec</li> <li>• 60°C/ 1 min</li> <li>• 85°C/ 5 min</li> <li>• 4°C/ <math>\infty</math></li> </ul>

\* za RNU6B upotrebljen je *TaqMan microRNA Control Assay RNU6B (Applied Biosystems)*

Sva merenja urađena su u duplikatu. Rezultati su analizirani komparativnim ddCt metodom, a kao kalibrator korišćena je medijana dCt vrednosti analiziranih zdravih kontrola. Relativna ekspresija *RNU6B* korišćena je kao endogena kontrola za normalizaciju početne količine cDNK svakog uzorka.

### 3. 12. Metoda sekvenciranja po Sangeru

Sekvenciranje DNK izvedeno je kapilarnom elektroforezom na automatskom sekvenceru (*3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems*) uz upotrebu *BigDye<sup>TM</sup> Terminators Version 3.1 Ready Reaction Kit-om (Applied Biosystems)*. U reakciji sekvenciranja pored deoksinukleozid trifosfata (dNTP) koriste se i 2', 3'- dideoksi-nukleozid trifosfata (ddNTP) (Sanger i sar., 1992). Kako enzim DNK polimeraza ne pravi razliku između dNTP-ova i ddNTP-ova tokom *in vitro* sinteze lanca DNK, ddNTP-ovi formiranjem fosfodiesterne veze između svoje 5'- fosfatne grupe i 3'- hidroksilne grupe poslednjeg nukleotida u lancu mogu se ugraditi u rastući lanac DNK. Do prekida dalje sinteze DNK dolazi zbog nemogućnosti formiranja nove fosfodiesterne veze sa sledećim nukleotidom u lancu DNK, kako ddNTP-ovi nemaju slobodnu 3'- hidroksilnu grupu (Brajuskovic, 2012). U reakciju se dodaje samo jedan prajmer tako da se dobija niz fragmenata različitih dužina koji se završavaju ddNTP-om. Za razliku od kitova u kojima su ddNTP-ovi obeleženi jednom istom fluorescentnom

bojom, u ovom kitu je svaki od četiri ddNTP-a obeležen različitom fluorescentnom bojom, čime se omogućava da se u jednoj PCR reakciji izvrši sekvenciranje jednog uzorka, umesto u četiri odvojene. Detektor fluorescencije u aparatu je takav da može da napravi razliku između svake boje, pri tom definišući da li ona predstavlja A, T, G ili C. Zapis sekvence čini serija obojenih pikova, pri čemu je pozicija svakog nukleotida u sekvenci predstavljena pojedinačnim pikom odgovarajuće boje.

### 3.12.1. Identifikacija varijanti u genima *IRAK1* i *miRNK-146a*

Detekcija prisustva varijanti u genu *IRAK1* (rs3027898 C>A) i *miRNK-146a* (rs2910164 G>C) u uzorcima periferne krvi SSc pacijenata i zdravih pojedinaca, vršena je metodom direktnog sekvenciranja.

Ovoj metodi predhodili su sledeći koraci:

1. Izolacija DNK odgovarajućeg prinosa i kvaliteta iz periferne krvi (predhodno opisan protokol 3.2.)
2. Umnožavanje odabranih regiona gena *IRAK1* i *miRNK-146a* koji sadrže datu varijantu i okolnu sekvencu predhodno opisanom metodom PCR-a. U tabeli 6. navedene su sekvence korišćenih parova prajmera, njihove dužine i temperature topljenja.

Tabela 6. Parovi prajmera korišćenih za umnožavanje odabranih regiona gena *IRAK1* i *miRNK-146a* koji sadrže ispitivane genetičke varijante

Naziv gena		Sekvenca prajmera (5'→3' smer)	Dužina (bp)	T <sub>m</sub> (°C)
<b><i>IRAK1</i></b>	uzvodni	5'-GATTTTGTGTTTCAGCCGTGAGTC-3'	23	56.6
	nizvodni	5'-GAAAAACCTGACACGGGAAGTG-3'	22	56.4
<b><i>miRNK-146a</i></b>	uzvodni	5'-GACAGGCCTGGACTGCAAG-3'	19	58.6
	nizvodni	5'-GACTCTGCCTTCTGTCTCCAG-3'	21	56.9

Sastav i temperaturni profil PCR reakcija finalnog volumena od 25  $\mu$ l:

Sastav PCR reakcija:	Temperaturni profil PCR reakcija:
100 ng DNK 1x PCR pufer 1x Q rastvor 1.5 mM MgCL <sub>2</sub> 0.4 mM dNTP 0.4 $\mu$ M uzvodni i nizvodni prajmeri 1 U <i>Taq</i> polimeraze ( <i>Kapa Biosystems</i> )	1. 94°C/ 5 min 2. 35 ciklusa: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 94°C/ 30 sec</li> <li>• 56°C/ 30 sec za rs3027898 (odnosno 58°C/ 30 sec za rs2910164)</li> <li>• 72°C/ 45 sec</li> </ul> 3. 72°C/ 10 min

3. Provera uspešnosti PCR amplifikacije odabranog regiona gena *IRAK1* detekcijom trake dužine od 239 bp, odnosno odabranog regiona gena *miRNK-146a* detekcijom trake dužine od 233 bp, izvršena je elektroforezom na 2% agaroznom gelu.

4. Prečišćavanje dobijenih PCR produkata rađeno je po uputstvu proizvođača *QIAquick PCR Purification Kit-a* (*Qiagen, Nemačka*) upotrebljenog u tu svrhu.

**Protokol:**

- Na volumen naše PCR reakcije dodati 5 volumena PB pufera i 10  $\mu$ l 3M Na-acetata (pH=5)
- Naneti uzorak na kolonicu *QIAquick PCR Purification Kit-a* i centrifugirati 1 min na 13 000 rpm
- Ukloniti filtrat i dodati 750  $\mu$ l PE pufera, a zatim centrifugirati 1 min na 13 000 rpm
- Ukloniti filtrat pa još jednom centrifugirati 1 min na 13 000 rpm
- Prebaciti kolonicu u novu mikrotubu od 1.5 ml
- Naneti na kolonicu 30-50  $\mu$ l EB i inkubirati 5-10 min na RT
- Centrifugirati 1 min na 13 000 rpm, zadržati eluat koji predstavlja prečišćen PCR produkt
- Odrediti koncentraciju prečišćenog PCR produkta na aparatu *Quibit 3.0* fluorimetru, uz upotrebu *Quibit dsDNA HS Assay Kit-a* (*Invitrogen*) prema protokolu proizvođača.

Smeša za sekvenciranje finalne zapremine 5  $\mu$ l sadrži sledeće komponente:

Sastav PCR za sekvenciranje volumena od 5 $\mu$ l:	Temperaturni profil PCR reakcije:
3-20 ng prečišćenog PCR produkta	1. 96 <sup>0</sup> C/ 1 min
2 pmol prajmera za sekvenciranje (za sekvenciranje odabranog fragmenta gena <i>IRAK1</i> upotrebljen je uzvodni prajmer, a za odabrani region gena <i>miRNK-146a</i> nizvodni prajmer)	2. 25 ciklusa; <ul style="list-style-type: none"> <li>• 96<sup>0</sup>C/ 10 sec</li> <li>• 50<sup>0</sup>C/ 5 sec</li> </ul>
0.5 $\mu$ l <i>Ready Reaction Mix (Applied Biosystems)</i>	• 60 <sup>0</sup> C/ 4 min
	3. 4 <sup>0</sup> C/ $\infty$

Posle završene reakcije sekvenciranja uzorci su prečišćavani Na-acetatnom precipitacijom.

**Protokol:**

- U uzorak dodati 40  $\mu$ l 3M Na-acetata (pH=5, -20 <sup>0</sup>C), zatim vorteksovati
- Centrifugirati 20 min na 13 200 rpm
- Ukloniti supernatant, dodati 200  $\mu$ l 70% etanola (-20 <sup>0</sup>C)
- Centrifugirati 10 min na 13 200 rpm, a zatim odliti supernatant i talog u potpunosti osušiti.
- Osušeni talog rastvoriti u 25  $\mu$ l HiDi i naneti na ploču za sekvenciranje

### 3.13. Mezenhimske matične ćelije poreklom iz masnog tkiva

Uzorci masnog tkiva poreklom od 4 donora sa osteoartritisom prikupljeni su u saradnji sa Institutom za ortopedske-hirurške bolesti "Banjica". Istraživanje je sprovedeno u saglasnosti sa Helsinškom deklaracijom o medicinskim istraživanjima i principima dobre naučne prakse. Svi učesnici verifikovali su svoje učešće u istraživanju pismenom saglasnošću. Odobrenje za sprovođenje ovog dela istraživanja dalo je Ministarstvo zdravlja Srbije (dozvola br. 500-01-01106/2014-03, 25.11.2014.) i Etički komitet Instituta za ortopedske ortopedske-hirurške bolesti "Banjica" (broj odobrenja I-/21/8, 19.04.2018). Uzorkovanje je izvedeno ekscizijom 5 ml potkožnog masnog tkiva iz površinskog abdominalnog regiona kroz mali rez u lokalnoj anesteziji. Uzorak je nakon toga prebačen u Laboratoriju za molekularnu biomedicinu, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo.

### 3.13.1. Priprema autolognog seruma

Periferna krv donora upotrebljena je za dobijanje autolognog seruma korišćenog za gajenje aMMĆ.

**Protokol:**

- Perifernu krv donora inkubirati na RT u periodu od 24 h od trenutka uzorkovanja
- Centrifugirati 10 min na 1310 g. U toku centrifugiranja, fibrinska mreža sa krvnim ćelijama (koagulum) izdvaja se na dnu epruvete, a iznad njih ostaje serum, koji normalno ima izgled bistre, žućkaste tečnosti.
- Odvojiti serum pažljivo od koagulata sa iglom i špricom, i prebaciti u novu falkon tubu od 50 ml
- U sterilnim uslovima filtrirati serum sa 0.22 µm filterom (*Sarstedt, Nemačka*)
- Tako dobijen serum čuvati na 4°C

### 3.13.2. Izolacija mezenhimskih matičnih ćelija iz masnog tkiva

**Protokol:**

- Uzorkovano masnog tkivo inkubirati na RT 24 h od trenutka izolacije iz donora
- Pipetom odvaditi krv iz falkon tube u kojoj se nalazi masno tkivo i odrediti njegov volumen (optimalno je oko 5ml)
- Dodati u epruvetu jednak volumen 1x PBS-a (*Gibco, Life Technologies, SAD*) sa 1x Antibiotik/Antimikotik (Ab/Am, penicilin/streptavidin, *Gibco, Life technologies, SAD*) na RT ili 4°C, blago promućkati i ostaviti malo da odstoji, tako da se masno tkivo izdvoji na površini. Ovaj postupak ponoviti 3-5 puta, sve dok tečnost u kojoj se ispira masno tkivo ne postane bistra
- Centrifugirati 2 min na 1220 g kako bi se uzorak oslobodio eritrocita, a zatim tečnost odvaditi pipetom



- Na oprani lipoaspirat dodati 1x kolagenazu (4.5 ml DMEM, 500 µl 10x kolagenaze (*Sigma Aldrich, SAD*), 50 µl Ab/Am, snažno promućkati, i inkubirati 60 min na 37°C, uz snažno mućkanje 5-10 puta na svakih 15 min
- Pripremiti kompletan medijum (DMEM (*Low glucose, GlutaMAX™, Gibco, Life technologies, SAD*), 10% autolognog seruma, 1x Ab/Am) u sterilnoj falkom tubi od 50 ml, i zagrijati ga postepeno na 37°C
- Kolagenazu u uzorku masnog tkiva neutralisati dodavanjem kompletnog medijuma jednakog volumena (5ml) i promućkati
- Centrifugirati 10 min na 1220 g, a zatim pažljivo odliti masan čep, pa zatim i ostatak tečnosti
- Talog resuspendovati u 5 ml kompletnog medijuma, pa potom filtrirati kroz 100 µm filter (*BD, SAD*)
- Utvrditi broj ćelija na Neubauer Improved pločiti nakon njihovog bojenja sa 0.1% Tripan plavim (*Tripa blue stain, Gibco, Invitrogen*). Tripan plavo je boja koja ima sposobnost da prodire u mrtve ćelije kroz oštećenu ćelijsku membranu, dok vijabilne ćelije ostaju intaktne, tj. nebojene. Nakon dodavanja Tripan plavog, uzorak se u periodu od oko 3 min nanosi pažljivo između pločice i pokrivnog stakla koji nalaže na obe komore pločice.

Ukupan broj vijabilnih ćelija određivan je na sledeći način:

$$N \times \text{razblaženje} \times 10^4 = \text{broj ćelija/ ml}$$

$$N = \text{broj ćelija po } 4 \times 4 \text{ polju}$$

Ukupan broj ćelija u uzorku se dobija kada se broj izmerenih ćelija/ ml pomnoži sa ukupnom početnom zapreminom uzorka

- Zasaditi ćelije u flaskove za gajenje adherentnih ćelija (Ti25, Ti75, Ti175, *Sarstedt, Nemačka*), u gustini od  $6 \times 10^4 / \text{cm}^2$ , pri čemu se ovaj pasaž označava kao 0. pasaž

## 3.13.3. Gajenje i propagacija ćelija u kulturi

**Protokol:**

- Ćelije u zasejanim flaskovima su gajene u vlažnoj atmosferi koja sadrži 5% ugljen-dioksida i 95% vazduha inkubatora *Heracell 240i (ThermoFisher Scientific)*
- Nakon 7 dana, iz flaskova odliti stari medijum, ćelije isprati 2 puta sa toplim 1x PBS-om sa Ab/Am (zagrejanog do 37<sup>0</sup>C) kako bi se uklonile neadherirane ćelije, a zatim dodati svež medijum
- Kada ćelije dostignu 80-90% konfluentnosti, odliti stari medijum, i isprati ćelije 2 puta sa toplim 1x PBS-om sa Ab/Am, u zapremini od 4 ml za Ti25, 8-10 ml za Ti75, 12-14 ml za Ti175 flask
- Za tripsinizaciju konfluentnih ćelija koristiti 1x tripsin (*Gibco, Life technologies, SAD*) u zapremini od 0.3 ml za Ti25, 0.8 ml za Ti75, 1.8 ml za Ti175 flask
- Inkubirati 2-4 min u vlažnoj sredini sa 5% CO<sub>2</sub>, 95% vazduha, na 37<sup>0</sup>C u inkubatoru
- Neutralisati tripsin sa kompletnim medijumom u zapremini od 3-4 ml za Ti25, 5-6 ml za Ti75, 8-10 ml za Ti175 flask, a potom sprati ćelije sa zidova suda, pokupiti ih i prebaciti u novu sterilnu tubu i odrediti koncentraciju ćelija predhodno opisanom metodom
- Nakon utvrđivanja broja ćelija, centrifugirati 4 min na 300g, odliti supernatant
- Za zasejavanje ćelija u nove flaskove i propagaciju ćelija u kulturi dodati svež medijum tako da koncentracija bude 2.5 x 10<sup>5</sup> ćelija u 5 ml ukupne zapremine za Ti25 flask, 7.5 x 10<sup>5</sup> ćelija u 15 ml ukupne zapremine za Ti75 flask i 17.5 x 10<sup>5</sup> ćelija u 34 ml ukupne zapremine u slučaju zasejavanja Ti175 flaska. Ovaj pasaž se označava kao 1. pasaž, i svakim sledećim presejavanjem ćelija broj pasaža raste za jedan više
- Ćelije su za potrebe istraživanja prikupljane u 3. i 6. pasažu, nakon čega su centrifugirane 4 min na 300g i medijum je uklonjen pažljivo, nedodirujući talog ćelija
- Ćelija su resuspendovane u 1 ml *TRI Reagent* u kome su čuvane na -80<sup>0</sup>C sve do trenutka izolacije RNK po predhodnom opisanom protokolu (odeljak 3.4.)

### 3.14. Fenotipska karakterizacija aMMĆ

Karakterizacija izolovanih matičnih ćelija iz masnog tkiva podrazumeva demonstriranje fenotipskih karakteristika specifičnih za mezenhimske matične ćelije. Međunarodno društvo za ćelijsku terapiju (Dominici i sar., 2006) definisalo je nekoliko kriterijuma za fenotipsku karakterizaciju koji podrazumevaju da ove ćelije imaju fenotip sličan fibroblastima i da imaju sposobnost adhezije za površinu plastičnog suda u kojem se gaje, da imaju potencijal da se diferenciraju u osteoblaste i hondrocite, da ih karakteriše prisustvo specifičnih mezenhimskih površinskih markera (CD73, CD90 i CD105) i odsustvo endotelijalnih, hematopoetskih i leukocitnih površinskih markera (CD34 i CD45).

#### 3.14.1. Karakterizacija aMMĆ protočnom citofluorimetrijom

Fenotipska karakterizacija aMMĆ izvršena je protočnom citofluorimetrijom detekcijom prisustva/odsustva specifičnih površinskih markera. U tu svrhu upotrebljena su specifična mišja monoklonska antitela: CD34, CD45, CD73, CD90, CD105 (*R&D Systems, SAD*).

#### **Protokol:**

- Potrebno je prikupiti 6 tubica sa po  $2.5 \times 10^5$  ćelija u resuspendovanih u 1 ml PBS-a, za detekciju 5 specifičnih površinskih markera obeleženih fikoeritriinom (CD34, CD45, CD73, CD90, CD105) i 1 kontrolni uzorak
- Centrifugirati 2 min 1800 rpm i pažljivo ukloniti supernatant od taloga ćelija, a ćelije resuspendovati u 1 ml 0.1% BSA / PBS pufera (*Gibco, Life Technologies*)
- Centrifugirati 5 min na 300g na 4°C, ukloniti supernatant
- Taloge ćelija resuspendovati sa 10 µl smeše 0.1% BSA/ PBS pufera sa specifičnim antitelom za površinski marker u odnosu 1:1, kontrolni uzorak resuspendovati u 10 µl 0.1% BSA/ PBS pufera. Inkubirati 30 min u mraku na ledu

- Dodati po 1 ml 0.1% BSA/ PBS pufera, i promešati, a zatim centrifugirati 5 min na 300g na 4°C. Odliti supernatant. Postupak ponoviti 2 puta.
- Resuspendovati talog u 1 ml 0.1% BSA/ PBS pufera po uzorku
- Analizirati na citofluorimetru (*Partec, Nemačka*) koristeći *FlowMax* softverski paket

### 3.14.2. Osteogena diferencijacija *in vitro* i detekcija depozita Ca<sup>2+</sup> specifičnim bojenjem

Da bi se utvrdio diferencijalni potencijal izolovanih aMMĆ, ćelije su bile indukovane da se diferenciraju ka osteogenoj liniji. Ukoliko je diferencijacija bila uspešna, to bi značilo da su iz nediferenciranih matičnih ćelija poreklom iz različitih donora dobijeni funkcionalni osteoblasti koji imaju *in vivo* i *in vitro* sposobnost deponovanja ekstracelularnog kalcijuma. Kao meru uspešnosti osteogene diferencijacije predstavljala bi detekcija ekstracelularnih depoa kalcijuma specifičnim bojenjem.

#### **Protokol:**

- Zasejati  $6 \times 10^4$  ćelija poreklom iz 3. i 6. pasaža svakog donora u duplikatu na mikrotitar ploče sa 24 bunarića (*Sarstedt*)
- Ostaviti ćelije da rastu 24-72 h u vlažnoj sredini 5% CO<sub>2</sub>, 95% vazduha, na 37°C u inkubatoru kako bi dostigle 100% konfluentnosti
- U jedan od duplikata uzorka dodati medijum za osteogenu diferencijaciju, a drugom ostaviti kompletan medijum za gajenje matičnih ćelija, i ovaj bunarić smatrati za negativnu kontrolu. Medijum za osteogenu diferencijaciju sastojao se od *Low glucose* DMEM-a, 10% FBS (*Gibco, Life technologies*), 1x Ab/Am, 0.1 μM deksametazona (*Sigma Aldrich, SAD*), 50 μM L-askorobil-2-fosfata (*Sigma Aldrich, SAD*) i 10 mM β-glicerofosfata (*Sigma Aldrich, SAD*).
- Inkubirati ovako gajene ćelije 21 dan, sa zamenom odgovarajućeg medijuma svežim svaki treći dan, pazeći da se ne poremeti ćelijski sloj
- Nakon 21 dan, pažljivo ukloniti iz bunarića medijum, i oprati ćelije sa 1 ml PBS-a

- Pažljivo odliti PBS, i dodati 1 ml 10% neutralnog formalina, koji je neophodan za fiksaciju ćelija, inkubirati 60 min na RT
- Oprati ćelije sa 1 ml destilovane vode
- Ukloniti destilovanu vodu i dodati 1 ml 2% rastvora Alizarin S crvenog, pH=4.2 (*Alizarin red S, Sigma Aldrich, SAD*), inkubirati 45 min na RT u mraku
- Oprati ćelije sa 1 ml destilovane vode. Postupak ponoviti 4 puta kako bi se uklonilo nespecifično bojenje
- Ukloniti destilovanu vodu i dodati 1 ml PBS, a zatim posmatrati bunariće. Ukoliko postoje, ekstracelularni depoi kalcijuma se boje u crveno, dok kontrolni bunarići ostaju nebojeni.

### 3.14.3. Hondrogena diferencijacija *in vitro* i detekcija komponenti VCM hrskavice specifičnim bojenjem

Da bi se utvrdio potencijal izolovanih matičnih ćelija iz masnog tkiva donora da se diferenciraju u hondrocyte, aMMC su gajenje u medijumu koji podstiče hondrogenu diferencijaciju. Pod uspešnom diferencijacijom podrazumevano je da su ćelije formirale 3D sferoidne strukture i bile sposobne da sintetišu i ekskretuju komponente VCM hrskavice, na prvom mestu proteoglikan agrekan, koji se detektuje Alcain plavom bojom specifičnom za sulfatizovane glikozaminoglikane.

#### **Protokol:**

- Zasejati  $3 \times 10^5$  ćelija po bunariću, u četiriplikatu (2 za bojenje, 2 za uzorkovanje), poreklom iz 3. i 6. pasaža svakog donora na mikrotitar ploče sa 96 bunarića sa ovalnim dnom (*Sarstedt, Nemačka*)
- Inkubirati ćelije 24-48 h u vlažnoj sredini 5% CO<sub>2</sub>, 95% vazduha, na 37°C u inkubatoru sve dok spontano ne formiraju 3D sferoidne strukture
- U dva bunarića po uzorku dodati medijum za hondrogenu diferencijaciju, a druga dva bunarića koristiti kao negativne kontrole i dodati kompletan medijum za gajenje mezenhiskih matičnih ćelija. Medijum za hondrogenu diferencijaciju sastojao se od *High Glucose DMEM-*

a (*Gibco, Life technologies*), 10 ng/ml TGF- $\beta$ 3 (*Sigma Aldrich, SAD*), 1x ITS (*Sigma Aldrich, SAD*), 50  $\mu$ g/ml L-askorbil-2-fosfata, 0.1  $\mu$ M deksametazona i 1x Ab/Am.

- Inkubirati 21 dan, zameniti stare medijume sa odgovarajućim novim medijumima svaki treći dan, pazeći da se ne naruše ili oštete sferoidne strukture
- Nakon 21 dan, izvaditi mikrotitar ploču iz inkubatora, pažljivo ukloniti iz bunarića medijum pazeći na sferoide, i isprati sa 200  $\mu$ l PBS-a. Postupak ponoviti 2 puta.
- Aspirirati PBS i iz 2/4 bunarića pokupiti sferoide i prebaciti svaki u 1 ml *TRI Reagent* u kome će biti čuvani na -80°C sve do trenutka izolacije RNK po predhodnom opisanom protokolu (odeljak 3.4.)
- U preostala 2 bunarića po uzorku dodati 200  $\mu$ l 10% neutralnog formalina, koji je neophodan za fiksaciju ćelija, inkubirati 60 min sa RT
- Aspirirati formalin i oprati sferoide sa 200  $\mu$ l destilovane vode. Postupak ponoviti 2 puta.
- Ukloniti destilovanu vodu i dodati po 200  $\mu$ l rastvora Alcian plavog (*Alcian Blue 8 GX dye, Sigma Aldrich, SAD*). Inkubirati preko noći na RT, u mraku.
- Ukloniti rastvor Alcain plavog i oprati sferoide sa 200  $\mu$ l rastvora za obezbojavanje (98-100% etanol: 98-100% sirćetna kiselina= 3:2). Inkubirati 20 min. Postupak ponoviti 2 puta.
- Ukloniti rastvor za obezbojavanje, i dodati 200  $\mu$ l PBS. Posmatrati. Kontrolni bunarići se obezbojavaju, a sferoidi hrskavice se boje u plavo, usled prisustva ekstracelularnih depoa agrekana.

### **3.15. Određivanje relativne ekspresije gena *OCT4*, *NANOG*, *SOX5*, *SOX6*, *SOX9* i *COL1A1***

Relativna kvantifikacija ekspresije gena matičnosti *OCT4* i *NANOG*, i gena uključenih u hondrogenu diferencijaciju *SOX5*, *SOX6*, *SOX9* i *COL1A1* izvršena je na aparatu *7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)*. Nivoi ekspresije odabranih gena praćeni upotrebom *SYBR Green* tehnike. Puštana je i kriva disocijacije radi utvrđivanja specifičnosti PCR amplifikacije. Ekspresija gena *GAPDH* korišćena je kao endogena kontrola za normalizaciju količine ukupne RNK u svakom uzorku (Baluchamy i sar., 2007; Clark i sar., 2008). Svi eksperimenti urađeni su u duplikatu. Za obradu rezultata upotrebljen

je komparativni ddCt metod, pri čemu je dCt vrednost NT2 ćelijske linije upotrebljavana kao kalibrator. Sekvence prajmera korišćenih za merenje ekspresije odabranih gena navedene su u tabeli 7.

Tabela 7. Sekvence prajmera upotrebljenih za merenje relativne ekspresije gena *Oct4*, *NANOG*, *SOX5*, *SOX6*, *SOX9*, *COLIA2* i *GAPDH*

Gen	Sekvence (5'→3'smer) upotrebljenih prajmera		Dužina (bp)
<b><i>OCT4</i></b>	uzvodni	5'-CGAGAAGGATGTGGTCCGAGTGTG-3'	24
	nizvodni	5'-CGAGGAGTACAGTGCAGTGAAGTGAG-3'	26
<b><i>NANOG</i></b>	uzvodni	5'-GCAATGGTGTGACGCAGAAGGCC- 3'	23
	nizvodni	5'-GGACTGGATGTTCTGGGTCTGGTTGC- 3'	26
<b><i>SOX5</i></b>	uzvodni	5'-GGCTGGATGTAGTGACCCTTACCCTG - 3'	26
	nizvodni	5'-CAGCTTCCCTCCTGGAGATACCTGC- 3'	25
<b><i>SOX6</i></b>	uzvodni	5'-CGCCAACAGCAAGAACAGATTGCG -3'	24
	nizvodni	5'-CCAGAGTCCGCTGGTCATGTGG -3'	22
<b><i>SOX9</i></b>	uzvodni	5'-CTGGGCAAGCTCTGGAGACTTCTG- 3'	24
	nizvodni	5'-CCTGCCCCTTCTTCACCGAC-3'	20
<b><i>COLIA2</i></b>	uzvodni	5'-GAGGGCCAAGACGAAGACATC- 3'	21
	nizvodni	5'-CAGATCACGTCATCGCACAAAC- 3'	21
<b><i>GAPDH</i></b>	uzvodni	5'-GTGAAGGTCGGAGTCAACG-3'	19
	nizvodni	5'-TGAGGTCAATGAAGGGGTC-3'	19

Sastav qPCR reakcije finalnog volumena od 10 µl:

Sastav reakcione smeše ukupnog volumena od 10 µl:	Temperaturni profil qPCR reakcije:
20 ng cDNK aMMĆ Prajmeri finalne koncentracije 400 nM 1x <i>ROX High</i> referetna boja finalne koncentracije 500 nM 1x <i>KAPA SYBR FAST Universal qPCR Master Mix (Kapa Biosystems)</i>	1. 95°C/ 5 min 2. 45 ciklusa: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 95°C/ 15 sec</li> <li>• 60°C/ 1 min</li> </ul>

### 3.16. Statistička obrada podataka

Za svaki analizirani genski lokus ispitano je da li distribucija genotipova prati Hardy-Vajnbergovu ravnotežu (eng. *Hardy-Weinberg Equilibrium*, HWE) upotrebom hi-kvadrat ( $\chi^2$ ) testa za ponašanje po distribuciji (eng. *goodness of fit*). Za testiranje razlika u frekvenciji alela i genotipova između pacijenata i kontrolnih ispitanika korišćen je  $\chi^2$  test nezavisnosti sa Yates-ovom korekcijom i Fisher-ovim egzaktnim testom. Uzimajući u obzir višestruka poređenja, primenjena je Benjamini-Hochberg korekcija, a prag za otkrivanje lažno pozitivnih rezultata podešen je na 0.1 (Benjamini i Hochberg, 1995). Kao mere asocijacije ispitivanih varijanti u genima *IRAK1* i *miRNK-146a* sa rizikom za nastanak SSc, računat je količnik verovatnoće (eng. *Odds ratio*, OR) sa odgovarajućim 95% intervalom poverenja (eng. *confidence interval*, CI) korišćenjem tabela kontigencije 2x2.

Za statističku obradu nivoa ekspresije odabranih gena u ispitivanim grupama korišćene su mere centralne tendencije (medijana, srednja vrednost, standardna devijacija). Distribucija kontinuiranih veličina je testirana Šapiro-Vilk i Kolmogorov-Smirnov testovima. Razlike u ekspresiji između analiziranih grupa analizirane su neparametrijskim Man-Vitnijev *U* testom za poređenje distribucije između dve grupe. Za poređenje distribucije promenjive između više od dve grupe upotrebljen je Kruskal-Volisov test. Za detekciju optimalne “cutoff” vrednosti korišćen je on-line dostupan program “Cut-off finder” (<http://molpath.charite.de/cutoff>) (Budczies i sar., 2012). Ovaj program koristi ROC analizu (eng. *Receiver Operating Curve*, ROC). Kao mera kvaliteta prediktivnog modela koristi se vrednost površine ispod ROC krive (eng. *The area under the receiver operating curve*, AUC) (Linden, 2006). AUC predstavlja procenjenu verovatnoću da će između dve nasumično odabrane osobe model dodeliti negativan rezultat zdravoj, a pozitivan rezultat bolesnoj osobi. Ova vrednost varira između 0.5 (nasumična klasifikacija) i 1 (savršena klasifikacija), uzimajući vrednost AUC > 0.8 kao praznu vrednost dobre klasifikacije. Korelacija između varijabli unutar grupe SSc pacijenata analizirana je Spearman-ovim testom ranga, a jačina korelacije određivana je korelacionim ( $\rho$ ) i determinacionim ( $r^2$ ) koeficijentima.



Statističke analize urađene su pomoću programa SPSS v. 20.0 (*IBM SPSS Statistics, Čikago, SAD*). Za sve analize nivo statističke značajnosti je bio 0.05, a svi testovi su bili nedirekcionni (dvostrani).

## **4. REZULTATI**

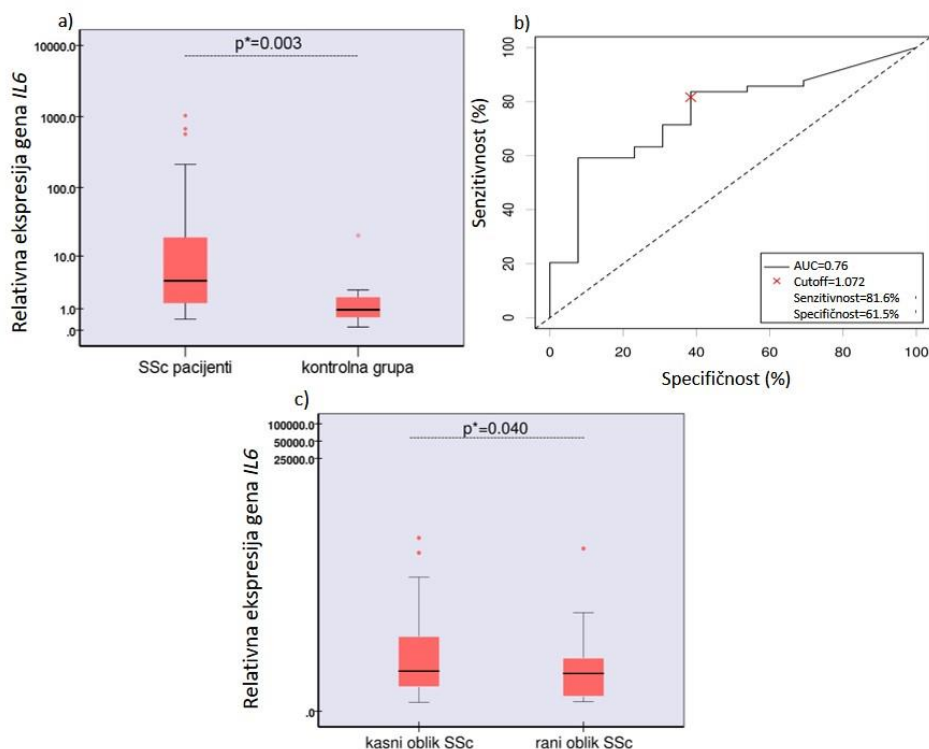
#### 4.1. Kvantifikacija ekspresije gena uključenih u proces inflamacije kod SSc pacijenata

U potrazi za novim molekularnim biomarkerima za SSc, u okviru ove studije analizirana je relativna ekspresija odabranih gena uključenih u proces inflamacije. Osim predikcije nastanka i razvoja SSc, nivoi ekspresije ovih gena ukazivali bi i na molekularne procese uključene u patogenezu SSc na sistemskom nivou. Primenom metode RT-qPCR, u MNČPK 50 SSc pacijenata i 13 kontrolnih ispitanika izvršena je relativna kvantifikacija izabranih gena. Relativni nivo ekspresije određivan je primenom ddCt metode, pri čemu je kao kalibrator korišćena medijana ekspresije zdravih kontrola. Razlike između grupa ispitanika su Man-Vitnijevim  $U$  testom za neparametrijska merenja, a rezultati poređenja predstavljani su  $p$  vrednostima. Uslov za statistički značajnu razliku bio je da je vrednost  $p < 0.05$ . Rezultati ROC analize ukazali bi na graničnu vrednost ekspresije koja diskriminiše bolesne od zdravih ispitanika u našoj studiji. Da bi ispitali povezanost nivoa ekspresije analiziranih gena sa odgovarajućim kliničkim i drugim prognostičkim parametrima, SSc pacijenti su na osnovu kliničke slike podeljeni u različite fenotipske podgrupe. Poređenje fenotipskih podgrupa pacijenata vršeno je  $\chi^2$  testom.

##### 4.1.1. Analiza relativne ekspresije gena *IL6* u MNČPK SSc pacijenata i kontrolnih ispitanika

Nivo ekspresije gena *IL6* kvantifikovan u grupi SSc pacijenata i kontrolnoj grupi prikazan je na Slici 6a. Medijana nivoa *IL6* transkripta kod SSc pacijenata iznosila je 3.957 (0.426–1032.247). Ovaj nivo ekspresije značajno je viši od nivoa ekspresije koji je detektovan u grupi kontrolnih ispitanika (medijana 0.935 (0.112 - 20.443),  $p=0.003$ ). Analizom ROC krive, ustanovljeno je da nivo od 1.072 predstavlja optimalnu “cut-off” vrednost (senzitivnost 0.82 i specifičnost 0.62) za diskriminaciju između pojedinaca sa niskom ekspresijom (*IL6*<sup>nizak</sup>, 9 pacijenata) i pojedinaca sa visokom ekspresijom gena *IL6* (*IL6*<sup>visok</sup>, 41 pacijent) (Slika 6b.). Poređenje ekspresije gena između ovih grupa ukazalo je na

to da je veća ekspresija gena *IL6* bila asocirana sa kasnim oblikom bolesti ( $p = 0.040$ , Slika 6c.).

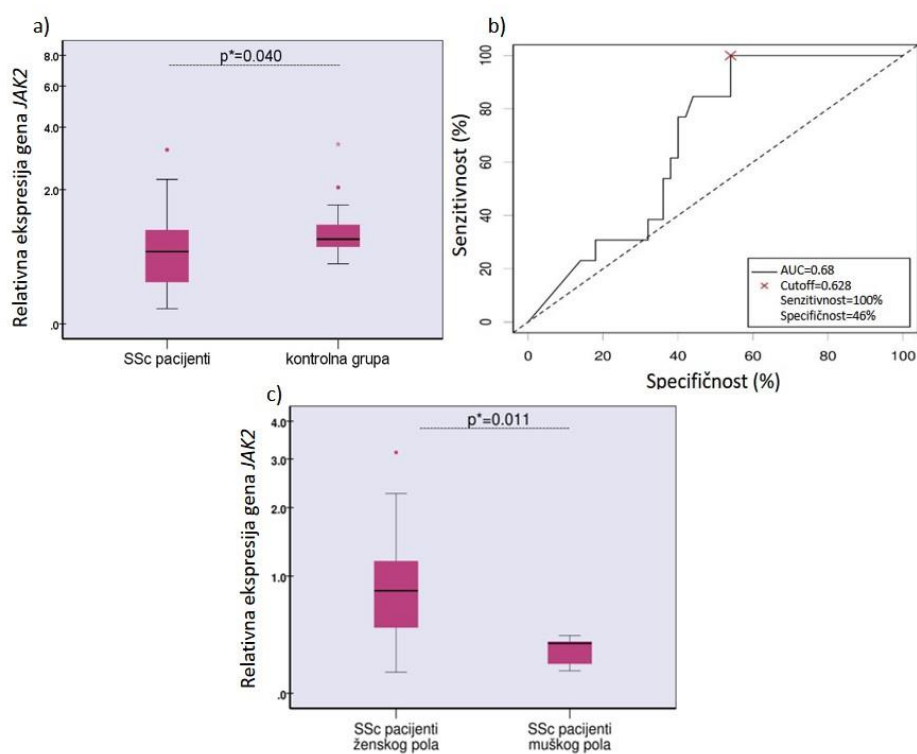


Slika 6. a) Box-plot grafički prikaz relativne ekspresije gena *IL6* u MNČPK SSc pacijenata i kontrolnih ispitanika; b) ROC analiza ekspresionog nivoa gena *IL6* kao pozitivnog markera bolesti; *cut-off* = 1.072; senzitivnost = 0.816; specifičnost = 0.615; OR=1.110, 95% CI 0.940-1.310,  $p = 0.004$ ; c) Box-plot grafički prikaz relativne ekspresije gena *IL6* u MNČPK SSc pacijenata sa kasnim i ranim oblikom bolesti; Nivo ekspresije izražen je u relativnim jedinicama. Horizontalne linije unutar box-a predstavljaju vrednosti medijane. Svaki box prikazuje od 25-75% analiziranih podataka. Kružićima su predstavljene netipične tačke (udaljene 1.5 dužine od ivica pravougaonika), a zvezdicama ekstremne vrednosti (udaljene više od 3 njegove dužine).

#### 4.1.2. Analiza relativne ekspresije gena *JAK2* u MNČPK SSc pacijenata i kontrolnih ispitanika

Poređenje ekspresije gena *JAK2* između grupa pacijenata i kontrolnih ispitanika prikazano je na Slici 7a. Ekspresioni nivo gena *JAK2* bio je značajno niži u grupi pacijenata sa SSc u odnosu na kontrolnu grupu (medijana pacijenata 0.806 (0.133 - 3.158) vs. medijana kontrola 1.000 (0.634 - 3.347),  $p=0.040$ ). Primenjujući optimalnu “*cut-off*” vrednost od 0.628

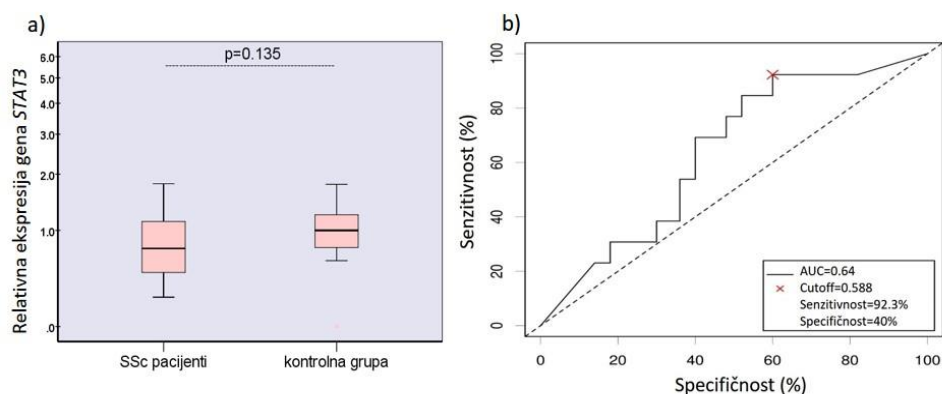
(analiza ROC krive, Slika 7b.), za koju je odnos senzitivnosti (1.00) i specifičnosti (0.46) bio najoptimalniji, SSc pacijenti su stratifikovani u grupu pacijenata sa niskom ekspresijom ( $JAK2^{nizak}$ , 23 pacijenta) i grupu pacijenata sa visokom ekspresijom gena  $JAK2$  ( $JAK2^{visok}$ , 27 pacijenata). Poređenje između ovih grupa ukazalo je na to da su SSc pacijenti ženskog pola imali značajno veću ekspresiju gena  $JAK2$  u odnosu na pacijente muškog pola ( $p = 0.011$ , Slika 7c.).



Slika 7. a) Box-plot grafički prikaz relativne ekspresije gena  $JAK2$  u MNČPK SSc pacijenata i kontrolnih ispitanika; b) ROC analiza ekspresionog nivoa gena  $JAK2$  kao negativnog markera bolesti;  $cut-off = 0.628$ ; senzitivnost = 1.000; specifičnost = 0.460; OR=0.460, 95% CI 0.200-1.110,  $p = 0.002$ ; c) Box-plot grafički prikaz relativne ekspresije gena  $JAK2$  u MNČPK SSc pacijenata ženskog pola u odnosu na pacijente muškog pola; Nivo ekspresije izražen je u relativnim jedinicama. Horizontalne linije unutar box-a predstavljaju vrednosti medijane. Svaki box prikazuje od 25-75% analiziranih podataka. Kružićima su predstavljene netipične tačke dok su zvezdicama prikazane ekstremne vrednosti.

#### 4.1.3. Analiza relativne ekspresije gena *STAT3* u MNČPK SSc pacijenata i kontrolnih ispitanika

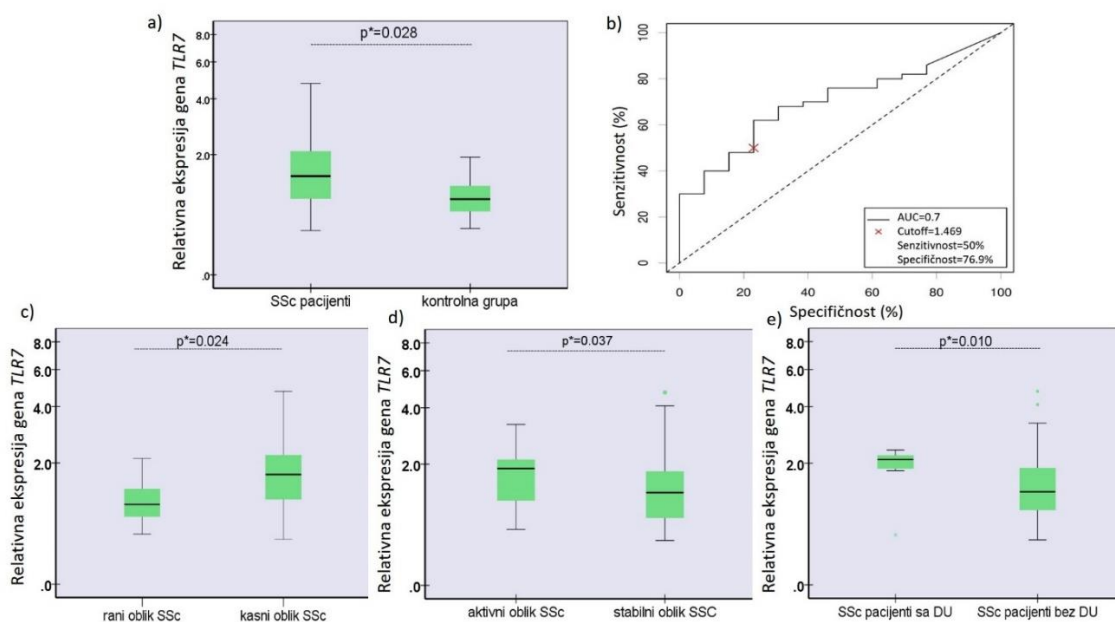
Ekspresioni nivo gena *STAT3* bio je niži kod SSc pacijenata u odnosu na kontrolne ispitanike, ali bez dostizanja statističke značajnosti (medijana pacijenata 0.756 (0.236 - 1.800) vs. medijana kontrola 1.000 (0.000 - 1.788),  $p=0.135$ , Slika 8a.). Analiza ROC krive ukazala je da “cut-off” vrednost od 0.588 je optimalna za razdvajanje SSc pacijenata od ne-SSc subjekata (senzitivnost 0.92 i specifičnost 0.40, Slika 8b.). Nakon stratifikacije, grupa SSc pacijenata sastojala se od 20 *STAT3*<sup>nizak</sup> i 30 *STAT3*<sup>visok</sup> pacijenata. Poređenje unutar grupa *STAT3*<sup>nizak</sup> i *STAT3*<sup>visok</sup> pacijenata nije pokazalo statistički značajne razlike za ispitivane kliničke parametre.



Slika 8. a) Box-plot grafički prikaz relativne ekspresije gena *STAT3* u MNČPK SSc pacijenata i kontrolnih ispitanika. Nivo ekspresije izražen je u relativnim jedinicama. Horizontalne linije unutar box-a predstavljaju vrednosti medijane. Svaki box prikazuje od 25-75% analiziranih podataka; b) ROC analiza ekspresionog nivoa gena *STAT3*; *cut-off* = 0.588; senzitivnost = 0.923; specifičnost = 0.400; OR=0.360, 95% CI 0.080-1.590,  $p = 0.045$ .

#### 4.1.4. Analiza relativne ekspresije gena *TLR7* u MNČPK SSc pacijenata i kontrolnih ispitanika

Poređenje relativne ekspresije gena *TLR7* između uzoraka SSc pacijenata i kontrolnih ispitanika predstavljeno je na Slici 9a. Ekspresioni nivo medijane *TLR7* transkripta kod SSc pacijenata iznosio je 1.469 (u opsegu od 0.501 - 4.744), što je bilo značajno više nego ekspresioni nivo izmeren u okviru grupe kontrolnih ispitanika (medijana 1.000, opseg 0.530 – 1.933,  $p=0.028$ ). Kako bi ispitali uticaj nivoa ekspresije gena *TLR7* na prognozu bolesti, kao i povezanost sa kliničkim i drugim prognostičkim parametrima, podelili smo sve SSc pacijente na one sa niskim (*TLR7<sup>nizak</sup>*) i visokim (*TLR7<sup>visok</sup>*) nivoom ekspresije. Kao “cut-off“ vrednost koristili smo detektovani ekspresioni nivo medijane SSc pacijenata (ROC analiza, slika 9b.). U poređenju sa grupom koja se karakteriše niskim ekspresionim nivoom, grupu SSc pacijenata sa visokim ekspresionim nivoom gena *TLR7* predominantno karakteriše kasni oblik bolesti (40.5% vs. 59.5%,  $p=0.024$ , Slika 9c.). Takođe, povećana ekspresija gena *TLR7* bila je asocirana sa aktivnom formom bolesti, kako 12/17 SSc pacijenata koji su imali aktivnu formu imali su i *TLR7<sup>visok</sup>* status ( $p=0.037$ , Slika 9d.). Grupnu SSc pacijenata sa povećanom ekspresijom gena *TLR7* karakterisalo je i prisustvo digitalnih ulcera (8/9 slučajeva, 89%;  $p=0.010$ , Slika 9e.).



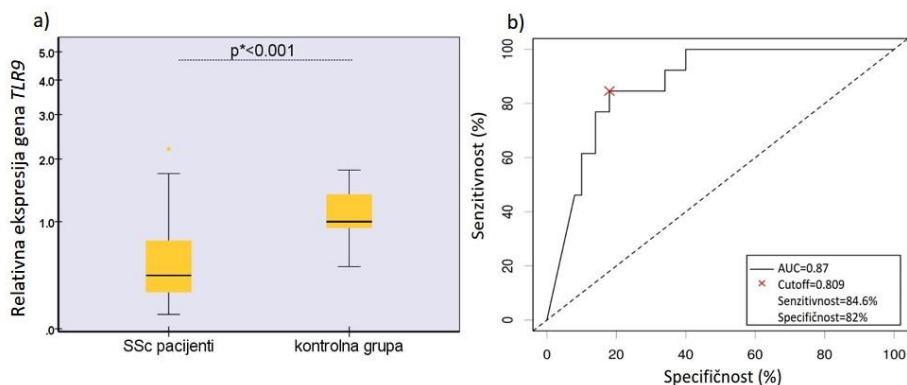
Slika 9. a) Box-plot grafički prikaz relativne ekspresije gena *TLR7* u MNCPK a) SSc pacijenata i kontrolnih ispitanika, c) SSc pacijenata sa ranim i kasnim oblikom bolesti, d) SSc pacijenata sa aktivnim i stabilnim oblikom bolesti, e) SSc pacijenata sa i bez DU. Nivo ekspresije izražen je u relativnim jedinicama. Horizontalne linije unutar box-a predstavljaju vrednosti medijane. Svaki box prikazuje od 25-75% analiziranih podataka; b) ROC analiza ekspresionog nivoa gena *TLR7* kao pozitivnog markera bolesti; *cut-off* = 1.469; senzitivnost = 0.500; specifičnost = 0.769; OR=3.630, 95% CI 1.070-12.360,  $p = 0.024$ ; DU=digitalni ulceri; Kružićima su predstavljene netipične tačke dok su zvezdicama prikazane ekstremne vrednosti.

#### 4.1.5. Analiza relativne ekspresije gena *TLR9* u MNCPK SSc pacijenata i kontrolnih ispitanika

Ekspresioni nivo gena *TLR9* kod SSc pacijenata bio je značajno niži u poređenju sa kontrolnim ispitanicima (medijana pacijenata 0.412 (0.098 - 2.198) vs. medijana kontrola 1.000 (0.494 - 1.790),  $p < 0.001$ , Slika 10a.). Analizom ROC krive, ustanovljeno je da nivo od 0.809 predstavlja optimalnu “cut-off” vrednost (senzitivnost 0.85 i specifičnost 0.82) za diskriminaciju između pojedinaca sa niskom ekspresijom (*TLR9*<sup>nizak</sup>) i pojedinaca sa viskom ekspresijom gena *TLR9* (*TLR9*<sup>visok</sup>) (Slika 10b.). Nakon primene ove granične vrednosti, SSc pacijenti su podeljeni na grupe od 41 *TLR9*<sup>nizak</sup> i 9 *TLR9*<sup>visok</sup> pacijenata. Nakon izvođenja  $\chi^2$



testa, nije pokazano da se ove dve grupe pacijenata značajno međusobno razlikuju u kliničkim slikama.

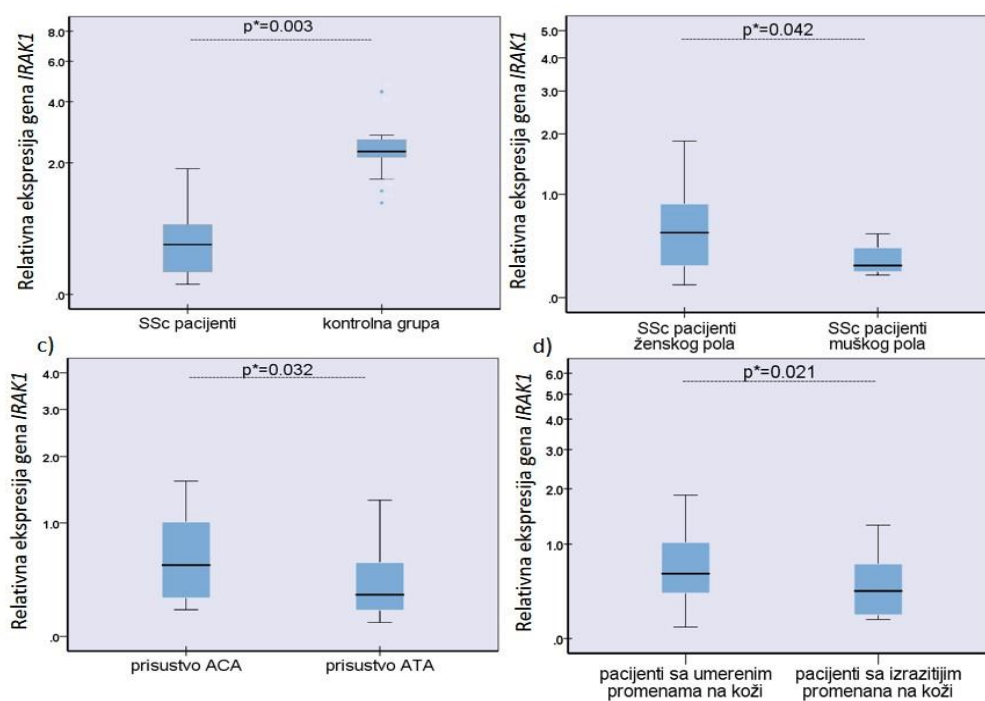


Slika 10. a) Box-plot grafički prikaz relativne ekspresije gena *TLR9* u MNČPK SSc pacijenata i kontrolnih ispitanika. Nivo ekspresije izražen je u relativnim jedinicama. Horizontalne linije unutar box-a predstavljaju vrednosti medijane. Svaki box prikazuje od 25-75% analiziranih podataka; b) ROC analiza ekspresionog nivoa gena *TLR9* kao negativnog markera bolesti; *cut-off* = 0.809; senzitivnost = 0.846; specifičnost = 0.820; OR=0.080, 95% CI 0.020-0.370,  $p < 0.001$ . Kružićem je predstavljena netipična tačka.

#### 4.1.6. Analiza relativne ekspresije gena *IRAK1* u MNČPK SSc pacijenata i kontrolnih ispitanika

Poređenje relativne ekspresije gena *IRAK1* između SSc pacijenata i kontrolnih ispitanika prikazano je na Slici 11a. Rezultati poređenja ukazuju da je ekspresioni nivo ovog gena značajno niži u grupi pacijenata u odnosu na nivo izmeren u grupi kontrolnih ispitanika (medijana pacijenata 0.517, (0.090 – 1.861) vs. medijana kontrola 1.000, (0.449 - 1.936),  $p=0.003$ ). Štaviše, ekspresija gena *IRAK1* kod SSc pacijenata bila je čak za 42% niža u odnosu na kontrolnu grupu. Kod pacijenata muškog pola detektovan je značajno manji nivo *IRAK1* transkripta u poređenju sa pacijentima ženskog pola (muškarci 46% vs. žene 100%,  $p=0.042$ , Slika 11b.). Takođe, grupa SSc pacijenata asocirana sa prisustvom ATA imala je značajno smanjenu ekspresiju gena *IRAK1* za 35% u poređenju sa grupom SSc pacijenata asociranih sa prisustvom ACA ( $p=0.032$ , Slika 11c.). Slični rezultati su dobijeni kada smo uporedili grupu SSc pacijenata koju karakteriše teža klinička slika u smislu intenzivnijih

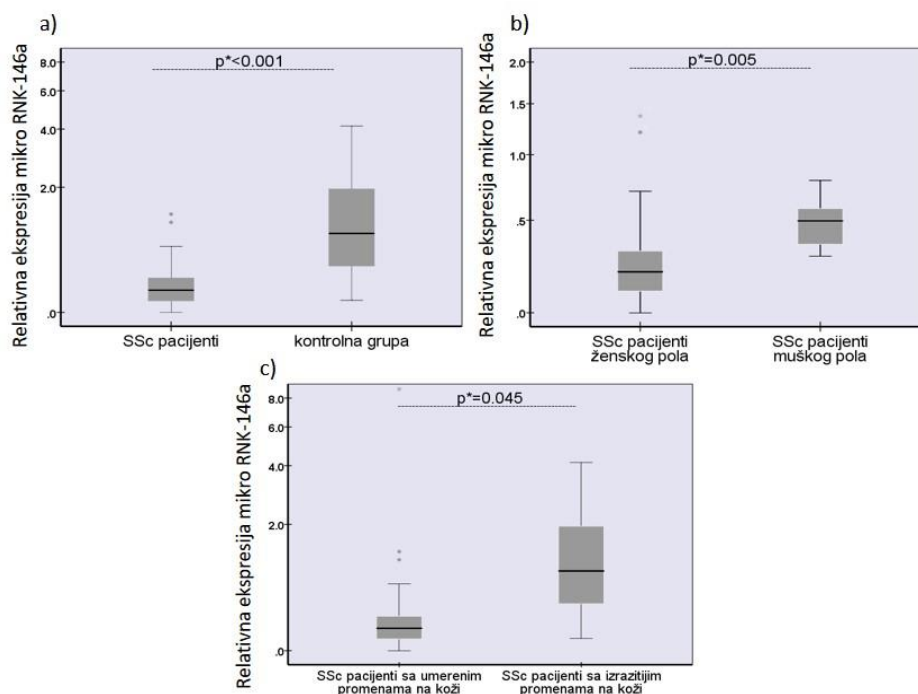
sklerotičnih promena na koži, sa grupom SSc pacijenata sa lakšom kliničkom slikom (teža 37% vs. lakša 100%,  $p=0.021$ , Slika 11d.). Pored toga, kvantifikacija gena *IRAK1* pokazala je još i trend ka smanjenju ekspresije za 30% u grupi SSc pacijenata sa plućnom arterijskom hipertenzijom (PAH) i bubrežnim problemima (sniženje za 23%) u poređenju sa SSc pacijentima kod kojih se ne ispoljavaju ove kliničke manifestacije, ali bez dostizanja statističke značajnosti.



Slika 11. Box-plot grafički prikaz relativne ekspresije gena *IRAK1* u MNCPK a) SSc pacijenata i kontrolnih ispitanika, b) SSc pacijenata ženskog pola u odnosu na pacijente muškog pola, c) SSc pacijenata koje karakteriše prisustvo ACA, odnosno ATA, d) SSc pacijenata sa umerenim i izrazitijim fibrotičnim promenama na koži. Nivo ekspresije izražen je u relativnim jedinicama. Horizontalne linije unutar box-a predstavljaju vrednosti medijane. Svaki box prikazuje od 25-75% analiziranih podataka; ATA=anti-topoizomerazna antitela; ACA=anti-centromerna-antitela; Kružićima su predstavljene netipične tačke.

4.1.7. Analiza relativne ekspresije miRNK-146a u MNČPK SSc pacijenata i kontrolnih ispitanika

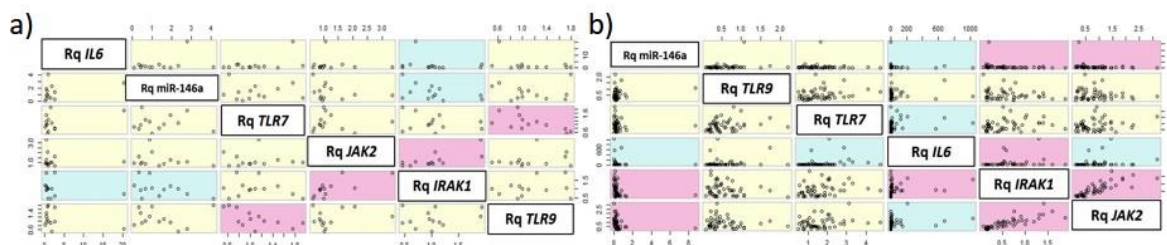
Nivo ekspresije miRNK-146a u uzorcima SSc pacijenata bio je značajno niži u odnosu na nivo izmeren u kontrolnim uzorcima (medijana pacijenata 0.215 (0.000 – 8.730) vs. medijana kontrolne grupe 1.000 (0.113 – 4.138),  $p < 0.001$ , Slika 12a.). Analizom nivoa ekspresije po polovima, ustanovljeno je da je kod SSc pacijenata ženskog pola detektovana značajno manja zastupljenost miRNK-146a u odnosu na pacijente muškog pola ( $p = 0.005$ , Slika 12b.). Nakon podele SSc pacijenata u različite grupe na osnovu prisustva specifičnih kliničkih karakteristika, pronađeno je da kod pacijenata sa umerenijim sklerotičnim promenama na koži (mRSS vrednost  $\leq 10$ ) značajno je manje prisutna miRNK-146a u odnosu na pacijente sa težim stanjem kože (ekspresija je manja za 36%,  $p = 0.045$ , slika 12c.).



Slika 12. Box-plot grafički prikaz relativne zastupljenosti miRNK-146a u MNČPK a) SSc pacijenata i kontrolnih ispitanika, b) SSc pacijenata ženskog pola u odnosu na pacijente muškog pola, c) SSc pacijenata sa umerenim i izrazitijim fibrotičnim promenama na koži. Nivo ekspresije izražen je u relativnim jedinicama. Horizontalne linije unutar box-a predstavljaju vrednosti medijane. Svaki box prikazuje od 25-75% analiziranih podataka. Kružićima su predstavljene netipične tačke dok su zvezdicama prikazane ekstremne vrednosti.

4.1.8. Korelacione analize parova ispitivanih gena na sistemskom nivou u grupi SSc pacijenata i kontrolnoj grupi

Da bi smo utvrdili međusobne odnose ispitivanih gena, urađena je korelaciona analiza Spirmanovim testom ranga u uzorcima MNČPK SSc pacijenata i kontrolnih ispitanika. Za značajnu korelaciju smo smatrali onu kod koje je Spirmanom koeficijent  $\rho > 0.500$  i vrednost  $p < 0.05$ . U grupi kontrolnih ispitanika izdvojile su se dve jake korelacije, jedna pozitivna između *JAK2* i *IRAK1* transkripata ( $\rho = 0.665$ ,  $p = 0.013$ ), a druga negativna između *TLR9* i *TLR7* transkripata ( $r = -0.665$ ,  $p = 0.013$ ). Međusobni odnosi analiziranih gena u grupi kontrolnih ispitanika prikazane su na Slici 13a. U grupi SSc pacijenata iako je očuvana korelacija između *JAK2* i *IRAK1* transkripata ( $\rho = 0.881$ ,  $p < 0.001$ ), izdvojile su se dve nove negativne korelacije, jedna između *JAK2* i *IRAK1* transkripata sa miR-146a ( $\rho = -0.522$ ,  $p < 0.001$ ,  $\rho = -0.517$ ,  $p < 0.001$ , respektivno). Korelaciona analiza ispitivanih gena u grupi kontrolnih ispitanika i SSc pacijenata prikazana je na Slici 13b.



Slika 13. Korelaciona analiza transkripata ispitivanih gena u grupi MNČPK uzoraka a) kontrolnih ispitanika, b) SSc pacijenata. Pravougaonici žute boje ukazuju na slabu ( $\rho = 0.1-0.29$ ), plave boje na srednju ( $\rho = 0.3-0.49$ ), i roze boje na jaku korelaciju ( $\rho = 0.5-1.0$ ) između parova transkripata analiziranih gena.

Sažetak rezultata ekspresionih analiza na sistemskom nivou:

- Relativna kvantifikaciona analiza ekspresije odabranih gena na sistemskom nivou, izdvojila je gen *TLR7* kao marker čija je povišena ekspresija bila asocirana sa SSc. Takođe, visok nivo ekspresije ovog gena u grupi SSc pacijenata, bio je asociran sa kasnim oblikom i aktivnom formom bolesti, kao i prisustvom digitalnih ulcera, te može potencijalno predstavljati i marker koji omogućava bolju klasifikaciju pacijenata.
- Ekspresioni nivoi gena *IRAK1* i *miRNK-146a* pokazuju suprotan trend kod osoba muškog i ženskog pola, kao i kod pacijenata sa različitim intenzitetom fibrotičnih promena na koži. Pozicija gena *IRAK1* na X hromozomu i različita ekspresija kod polova mogla bi ukazati na potencijalan uticaj ovog gena na predominantno ispoljavanje ove bolesti kod osoba ženskog pola. Takođe, značajna razlika u ekspresiji kod pacijenata sa lakšom i težom kliničkom slikom u pogledu zahvaćenosti kože fibrotičnim promenama, ukazuje na mogući izbor ovih gena kao markera za praćenje toka bolesti, ali njihovu bržu i precizniju dijagnostiku.
- Korelaciona analiza parova transkripata na sistemskom nivou, ukazivala je na izmenjene interakcije analiziranih gena u grupi SSc pacijenata u odnosu na grupu kontrolnih ispitanika. Među njima svakako se izdvojila snažnu negativnu korelaciju *IRAK1* i rNK sa *miRNK-146a* kod pacijenata, koja je potvrdila regulatornu ulogu koju ova *miRNK* ima na gen *IRAK1*. Ovakvi rezultati iniciraju da izmenjena ekspresija analiziranih gena i njihove narušene međusobne interakcije svakako mogu doprinositi nastanku i održavanju procesa inflamacije.

## 4.2. Ispitivanje uticaja genetičkih varijanti u genima *IRAK1* i *miRNK-146a* na rizik za nastanak i progresiju SSc

Za ispitivanje asociranosti varijanti u genima *IRAK1* (rs3027898 C>A) i *miRNK-146a* (rs2910164 C>G) sa nastankom SSc, grupa pacijenata je proširena na 102 ispitanika, a kontrolna grupa na 66 zdravih pojedinaca, usklađenih po poreklu, polu i starosti sa pacijentima. Detekcija prisustva odabranih genetičkih varijanti u uzorcima periferne krvi SSc pacijenata i kontrolnih ispitanika, vršena je metodom direktnog sekvenciranja. Za genotipizaciju odabranih varijanti u ove dve grupe ispitanika, upotrebljen je recesivni genetički model. Za testiranje razlika u distribuciji genotipova između pacijenata i kontrolnih ispitanika korišćen je  $\chi^2$  test nezavisnosti sa Yates-ovom korekcijom i Fisher-ov egzaktni test, a u slučaju višestrukih poređenja primenjena je Benjamini-Hochberg korekcija. Kao mera asocijacije ispitivanih varijanti u genima *IRAK1* i *miRNK-146a* sa rizikom za nastanak SSc, računati su OR sa odgovarajućim 95% CI.

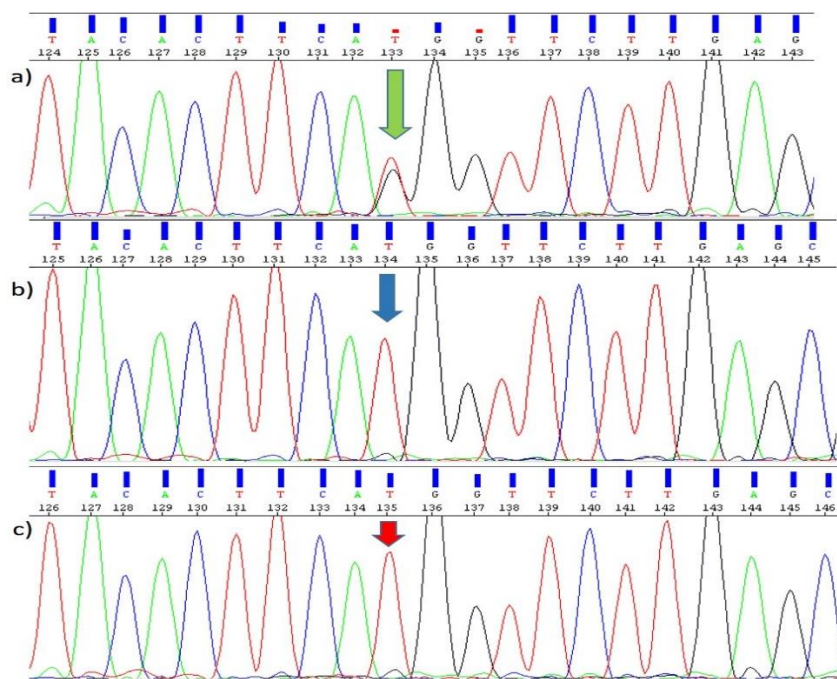
### 4.2.1. Asocijacija genetičke varijante rs3027898 C>A sa rizikom za nastanak SSc

Uzimajući u obzir činjenicu da je gen *IRAK1* pozicioniran na X hromozomu, ispitanici muškog pola su isključeni iz asocijativne studije, usled prisustva samo jedne kopije gena, i stanja hemizigotnosti. Distribucija *IRAK1* rs3027898 genotipova kontrolnih ženskih ispitanika, za razliku od SSc pacijenta ženskog pola ( $\chi^2=6.024$ ,  $p= 0.014$ ), bila je u HWE ( $\chi^2=1.493$ ,  $p= 0.220$ ). Frekvencije genotipova za *IRAK1* rs3027898 varijantu kod SSc pacijenata ženskog pola i ženskih kontrolnih ispitanika, kao i sumirani rezultati studije asocijacije ispitivane genetičke varijante sa SSc prikazani su u Tabeli 8. Grafički prikaz homozgotnih i heterozigotne nosioca ispitivane genetičke varijante dat je na Slici 14.

Tabela 8. Distribucija genotipova kod SSc pacijenata ženskog pola i ženskih kontrolnih ispitanika i sumirani rezultati studije asocijacije ispitivane genetičke varijante *IRAK1* rs3027898 C>A sa SSc

	Grupe ispitanika	Genotip			OR 95%CI	P vrednost*
		AA	CA	CC		
Pacijenti vs kontrolni ispitanici	pacijenti (88)	58	22	8	0.566	0.130
	kontrole (56)	29	25	2	0.280-1.102	
Zahvaćenost kože	limitirana (73)	50	17	6	1.902	0.407
	difuzna (15)	8	5	2	0.616-5.878	
Fibroza pluća	prisutna (22)	14	6	2	1.143	1.000
	nije prisutna (66)	44	16	6	0.417-3.132	
Zahvaćenost bubrega	prisutna (19)	14	4	1	0.629	0.586
	nije prisutna (69)	44	18	7	0.202-1.952	
Aktivnost bolesti	stabilna (62)	39	17	6	0.625	0.501
	aktivna(26)	19	5	2	0.228-1.712	

\*CA+CC vs AA; GeneBank-refseq pristupni broj za upotreblijenu sekvencu kao referetne: NM\_001569.3



Slika 14. Grafički prikaz analiziranih sekvenci a) referentnog homozigotnog, b) heterozigotnog, c) alternativnog homozigotnog nosioca varijante rs3027898 C>A u genu *IRAK1*.

Poređenje učestalosti genotipova za varijantu rs3027898 C>A, pokazalo je da ne postoji značajna razlika u distribuciji između SSc pacijenata i kontrolnih ispitanika ženskog pola, kao ni između analiziranih fenotipskih podgrupa ženskih SSc pacijenata.

4.2.2. Asocijacija genetičke varijante rs2910164 C>G sa rizikom za nastanak SSc

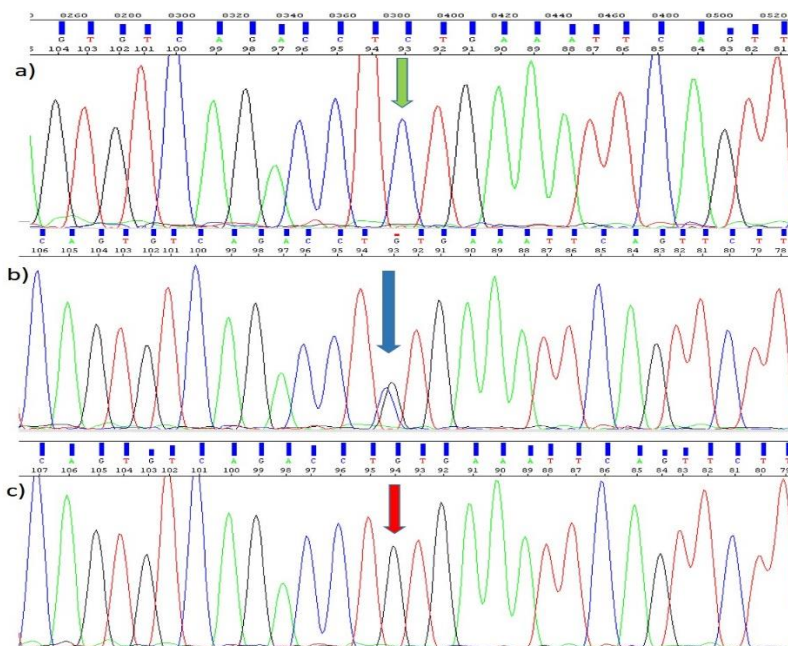
Distribucije *miRNK-146a* rs2910164 genotipova u grupi SSc pacijenata i kontrolnoj grupi bile su u HWE ( $\chi^2=0.364$ ,  $p=0.546$  i  $\chi^2=0.022$ ,  $p=0.883$ , respektivno). Učestalost genotipova za rs2910164 varijantu kod SSc pacijenata i kontrolnih ispitanika i sumirani rezultati studije asocijacije ispitivane genetičke varijante *miRNK-146a* rs2910164 C>G sa SSc predstavljeni su Tabeli 9. Grafički prikaz homozgotnih i heterozigotne nosioca ispitivane genetičke varijante dat je na Slici 15.

Tabela 9. Distribucija genotipova kod SSc pacijenata i kontrolnih ispitanika i sumirani rezultati studije asocijacije ispitivane genetičke varijante *miRNK-146a* rs2910164 C>G sa SSc

	Grupe ispitanika	Genotip			OR 95%CI	P vrednost*
		GG	GC	CC		
<b>Pacijenti vs kontrolni ispitanici</b>	pacijenti (102)	57	40	5	0.606	0.705
	kontrole (66)	46	18	2	0.114-3.220	
<b>Zahvaćenost kože</b>	limitirana(80)	44	32	4	1.105	1.000
	difuzna (22)	13	8	1	0.117-10.423	
<b>Fibroza pluća</b>	prisutna (28)	17	7	4	0.082	<b>0.019</b>
	nije prisutna (74)	40	33	1	0.009-0.772	
<b>Zahvaćenost bubrega</b>	prisutna (22)	14	7	1	1.105	1.000
	nije prisutna (80)	43	33	4	0.117-10.423	
<b>Aktivnost bolesti</b>	stabilna (70)	40	29	1	0.101	<b>0.033</b>
	aktivna (32)	17	11	4	0.011-0.948	

\*GG+GC vs CC; GeneBank-RefSeq pristupni broj za upotrebljene sekvence kao referetnu: NR\_029701.1





Slika 15. Grafički prikaz analiziranih sekvenci a) referentnog homozigotnog, b) heterozigotnog, c) alternativnog homozigotnog nosioca varijante rs2910164 C>G u genu za miRNK-146a.

Nije detektovana statistički značajna razlika između SSc pacijenata i kontrolnih ispitanika u pogledu distribucije genotipova za ispitivani genetički model. Nakon podele pacijenata u fenotipske podgrupe, uočena je značajna razlika u frekvenciji genotipova između SSc pacijenata sa fibrozom pluća i pacijenata kod kojih ona nije prisutna (OR=0.082, 95% CI=0.009-0.772, p=0.019, Tabela 9.). Takođe, poredeći grupu SSc pacijenata sa aktivnim oblikom bolesti u odnosu na grupu pacijenata sa stabilnim oblikom, dobijena je značajna razlika u distribuciji genotipova (OR=0.101, 95% CI= 0.011-0.948, p=0.033, Tabela 9.). Sve p vrednosti su prikazane nakon primene korekcije za višestruka poređenja.

#### 4.2.3. Uticaj genetičkih varijanti u genima *IRAK1* i *miRNK-146a* na njihove ekspresione profile

Analiza uticaja prisustva genetičke varijante rs3027898 na relativnu ekspresiju gena *IRAK1*, nije pokazala postojanje značajne korelacije između nosioca A ili C alela i detektovanog nivoa *IRAK1* iRNK, što ukazuje da ova varijanta nije ključna za detektovanu izmenjenu ekspresiju gena *IRAK1*.

Analiza uticaja prisustva varijante rs2910164 u *miRNK-146a* na produkciju zrele forme ove miRNK, pokazala je trend ka redukciji ekspresionog nivoa kod nosioca C alela u odnosu na nosioce GG genotipa (nosioci CC genotipa imali su 1.307 puta, a nosioci GC genotipa 2.260 puta niži nivo miRNK-146a), ali bez dostizanja statističke značajnosti. Ovi podaci ukazuju da bi C>G varijanta potencijalno mogla uticati na produkciju zrele forme miRNK-146a.

Sažetak rezultata studije asocijacije odabranih genetičkih varijati sa pojavom SSc:

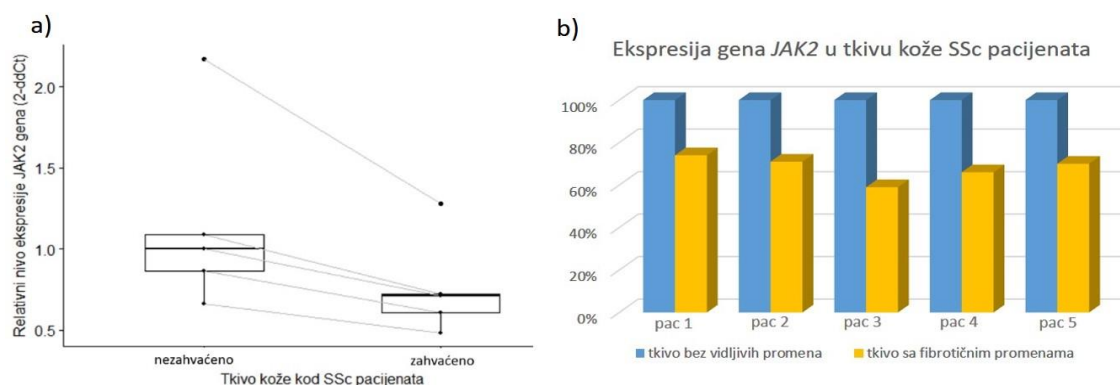
- Studija asocijacije *IRAK1* rs3027898 varijante sa rizikom za nastanak i progresiju SSc kod pacijenata ženskog pola, nije pokazala značajnu asocijaciju ove varijante kako sa SSc, tako ni sa jednim od ispitivanih kliničkih simptoma.
- Rezultati asocijativne studije *miRNK-146a* rs2910164 varijante sa rizikom za SSc, ukazuju da je ova varijanta bila asocirana sa aktivnim oblikom bolesti i fibrozom pluća kod SSc pacijenata.

### 4.3. Preliminarna analiza ekspresije gena uključenih u proces fibroze kod SSc pacijenata

U okviru ovog dela istraživanja preliminarno je analizirana relativna ekspresija odabranih gena uključenih u proces fibroze, *JAK2*, *TLR7*, *TLR9*, *IRAK1* i miRNK-146a na lokalnom nivou, odnosno na uzorcima kože 5 SSc pacijenata. U cilju pronalaženja gena čija bi se ekspresija jasno razlikovala u obolelom tkivu, uzeti su uzorci kože sa dela zahvaćenog fibrotičnim promenama i dela kože bez vidljivih promena na podlaktici ruke istog pacijenta. Kvantifikacija ekspresije izabranih gena urađena je primenom metode RT-qPCR. Relativni nivo ekspresije određivan je primenom ddCt metode, pri čemu je kao kalibrator korišćena medijana ekspresije uzoraka tkiva bez vidljivih fibrotičnih promena.

#### 4.3.1. Analiza relativne ekspresije gena *JAK2* u uzorcima biopsije kože SSc pacijenata

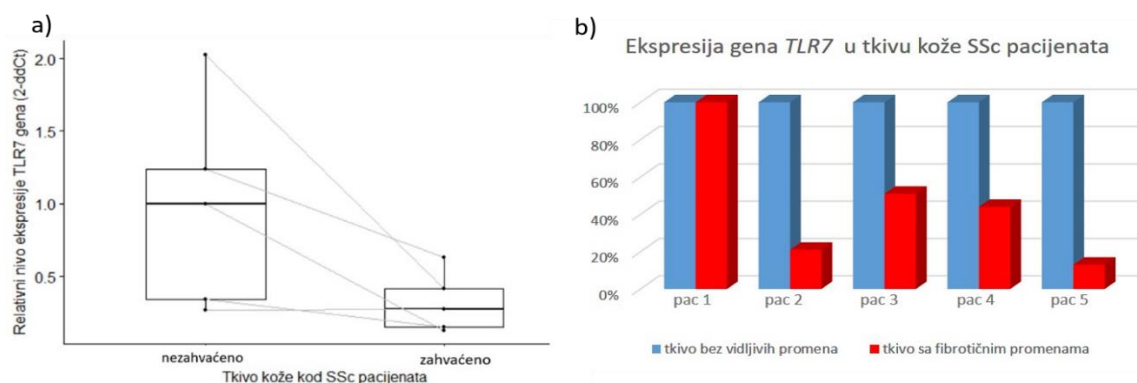
Kvantifikaciona analiza relativne ekspresije gena *JAK2* u uzorcima tkiva kože kod svih SSc pacijenata pokazala je sniženje ekspresionog nivoa u grupi uzoraka tkiva kože zahvaćenih promenama u odnosu na nezahvaćeno tkivo, i da je to sniženje bilo u opsegu od 26% do 41%, sa prosekom 32% (Slika 16.).



Slika 16. a) Nivoi *JAK2* iRNK izmereni metodom RT-qPCR i predstavljeni u relativnim jedinicama dobijenim metodom ddCt. Horizontalne linije predstavljaju medijane ekspresije ispitivanih grupa uzoraka. Vrednosti ekspresije u uzorcima tkiva kože sa i bez fibrotičnih promena poreklom od istog ispitanika su povezane linijom; b) Odnos relativne ekspresije gena *JAK2* u uzorku tkiva kože zahvaćenog fibrotičnim promenama izraženim u % u odnosu na tkivo nezahvaćeno promenama (100%) za svakog SSc pacijenta zasebno.

#### 4.3.2. Analiza relativne ekspresije gena *TLR7* u uzorcima biopsije kože SSc pacijenata

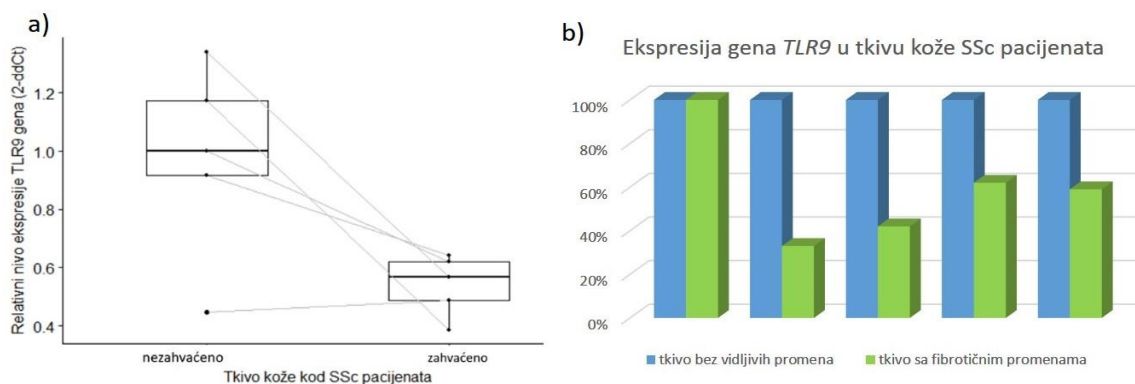
Relativna kvantifikacija ekspresije gena *TLR7* na lokalnom nivou kod SSc pacijenata pokazala je snažan trend ka redukciji ekspresije ovog gena u uzorcima bioptiranog tkiva kože sa fibrotičnim promenama u odnosu na uzorke bez promena kod 4/5 SSc pacijenata. U proseku to sniženje iznosilo je oko 75% (opseg 49-87%). Kod 1 SSc pacijenta detektovano je neznatno povećanje ekspresije gena *TLR7* za 3% (Slika 17.).



Slika 17. Nivoi *TLR7* iRNK izmereni metodom RT-qPCR i predstavljeni u relativnim jedinicama dobijenim metodom ddCt. Horizontalne linije predstavljaju medijane ekspresije ispitivanih grupa uzoraka. Vrednosti ekspresije u uzorcima tkiva kože sa i bez fibrotičnih promena poreklom od istog ispitanika su povezane linijom; b) Odnos relativne ekspresije gena *TLR7* u uzorku tkiva kože zahvaćenog fibrotičnim promenama izraženim u % u odnosu na tkivo nezahvaćeno promenama (100%) za svakog SSc pacijenta zasebno.

#### 4.3.3. Analiza relativne ekspresije gena *TLR9* u uzorcima biopsije kože SSc pacijenata

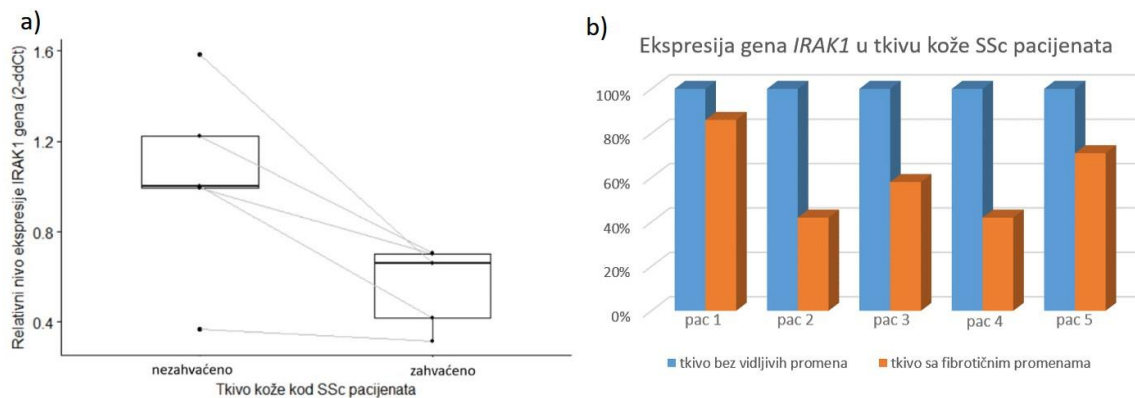
Poređenje ekspresije gena *TLR9* između uzoraka tkiva kože sa i bez fibrotičnih promena kod 4/5 SSc pacijenata, pokazalo je da je smanjenje ekspresije ovog gena u uzorcima fibrotičnog dela kože u odnosu na deo kože bez promena iznosilo u proseku 63% (u granicama od 38% do 67%), dok je kod 1 SSc pacijenta bilo nešto povišeno, tj. ekspresija gena *TLR9* bila je za 9% viša (Slika 18.).



Slika 18. Box-plot grafički prikaz ekspresije gena *TLR9* izmerene metodom RT-qPCR i predstavljenom u relativnim jedinicama dobijenim metodom  $\Delta\Delta Ct$ . Horizontalne linije predstavljaju ekspresioni nivo medijana ispitivanih grupa uzoraka. Vrednosti ekspresije u uzorcima tkiva kože sa i bez fibrotičnih promena poreklom od istog ispitanika su povezane linijom; b) Odnos relativne ekspresije gena *TLR9* u uzorku tkiva kože zahvaćenog fibrotičnim promenama izraženim u % u odnosu na tkivo nezahvaćeno promenama (100%) za svakog SSc pacijenta zasebno.

#### 4.3.4. Analiza relativne ekspresije gena *IRAK1* u uzorcima biopsije kože SSc pacijenata

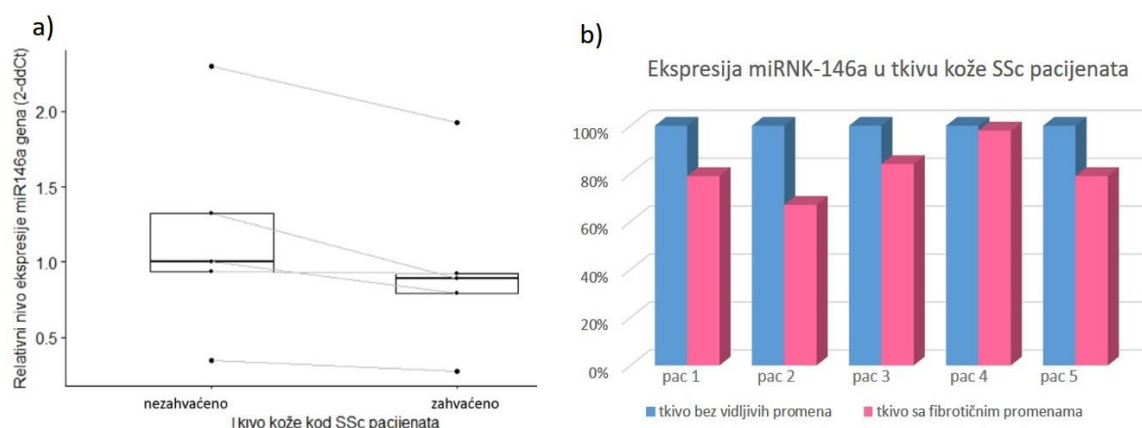
Rezultati kvantifikacione analize relativne ekspresije gena *IRAK1* ukazuju na nižu zastupljenost *IRAK1* transkripta u uzorcima fibrotičnog tkiva kože u odnosu na uzorke kože bez fibrotičnih promena kod svih SSc pacijenata. Sniženje ekspresionog nivoa ispitivanog gena u proseku iznosilo je 40%, tj. nalazilo se u opsegu 14-58% (Slika 19.).



Slika 19. Box-plot grafički prikaz ekspresije gena *IRAK1* izmerene metodom RT-qPCR i predstavljenom u relativnim jedinicama dobijenim metodom  $\Delta\Delta Ct$ . Horizontalne linije predstavljaju ekspresioni nivo medijana ispitivanih grupa uzoraka. Vrednosti ekspresije u uzorcima tkiva kože sa i bez fibrotičnih promena poreklom od istog ispitanika su povezane linijom; b) Odnos relativne ekspresije gena *IRAK1* u uzorku tkiva kože zahvaćenog fibrotičnim promenama izraženim u % u odnosu na tkivo nezahvaćeno promenama (100%) za svakog SSc pacijenta zasebno.

#### 4.3.5. Analiza relativne ekspresije miRNK-146a u uzorcima biopsije kože SSc pacijenata

Analiza relativnog nivoa miRNK-146a u uzorcima biopsije kože SSc pacijenata, ukazala je na to da je zastupljenost zrele miRNK-146a bila manja u proseku 18% (opseg 2-23%, Slika 20.) u svim uzorcima fdela kože sa promenama u odnosu na deo kože bez promena kod SSc pacijenata.

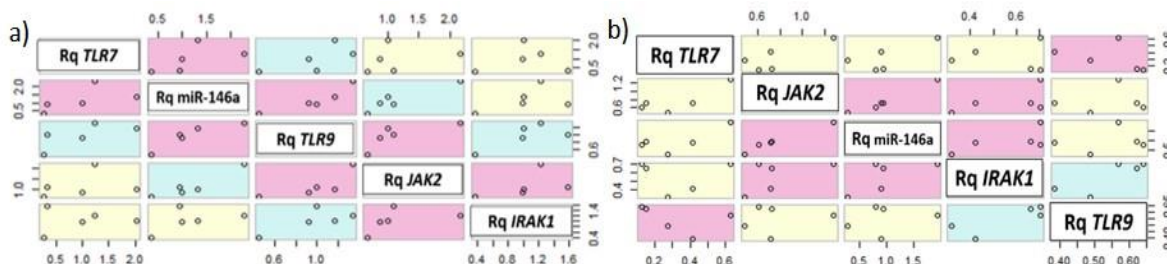


Slika 20. Box-plot grafički prikaz nivoa zastupljenosti miRNK-146a izmerene metodom RT-qPCR i predstavljenom u relativnim jedinicama dobijenim metodom ddCt. Horizontalne linije predstavljaju medijane ekspresije ispitivanih grupa uzoraka. Vrednosti ekspresije u uzorcima tkiva kože sa i bez fibrotičnih promena poreklom od istog ispitanika su povezane linijom; b) Odnos relativne ekspresije miRNK-146a u uzorku tkiva kože zahvaćenog fibrotičnim promenama izraženim u % u odnosu na tkivo nezahvaćeno promenama (100%) za svakog SSc pacijenta zasebno.

#### 4.3.6. Korelacione analize parova ispitivanih gena na lokalnom nivou, u uzorcima kože SSc pacijenata

Kako bismo ispitali međusobni odnos transkripata analiziranih gena u uzorcima tkiva kože SSc pacijenta, uradili smo preliminarnu analizu korelacije parova transkripata u ove dve grupe. U grupi uzoraka tkiva kože bez vidljivih fibrotičnih promena, koju smo smatrali za referentnu grupu, opažale su se pozitivne korelacije *TLR9* transkripta sa *JAK2* transkriptom i miRNK-146a, dok je sa druge strane miRNK-146a korelisala sa *TLR7* transkriptom. Takođe, uočavale se i pozitivna korelacija između *JAK2* i *IRAK1* transkripata. Preliminarne

korelacione analize transkripata analiziranih gena u referentnoj grupi uzoraka tkiva SSc pacijenata prikazane su na Slici 21a. Nasuprot ovim opažanjima, korelacioni odnosi u grupi uzoraka tkiva kože zahvaćenog fibrotičnim promenama, zasnivali su se na pozitivnom međusobnom odnosu miRNK-146a sa *JAK2* i *IRAK1* transkriptima, koji se nije opažao u referentnoj grupi (Slika 21b.).



Slika 21. Preliminarna korelaciona analiza transkripata analiziranih gena u grupi uzoraka bioptiranog tkiva kože SSc pacijenata a) bez fibrotičnih promena, b) zahvaćenog fibrotičnim promenama. Pravougaonici žute boje ukazuju na slabu ( $\rho= 0.1-0.29$ ), plave boje na srednju ( $\rho= 0.3-0.49$ ) i roze boje na jaku korelaciju ( $\rho= 0.5-1.0$ ).

Sažetak rezultata relativnih ekspresionih analiza na lokalnom nivou:

- Analiza relativne ekspresije odabranih gena pokazala je snažan trend ka redukciji ekspresije svih analiziranih gena u uzorcima bioptiranog tkiva kože sa fibrotičnim promenama u odnosu na uzorke bez vidljivih promena kod svih SSc pacijenata.
- Korelaciona analiza na lokalnom nivou, ukazivala je na moguće izmenjene interakcije između transkripata analiziranih gena. Korelacije koje su se opažale u referentnoj grupi uzoraka, zamenjuju se novim u grupi uzoraka sa fibrotičnim promenama. Ovi preliminarni rezultati bi mogli da iniciraju da izmenjena ekspresija analiziranih gena i njihove izmenjene međusobne interakcije svakako bi mogle doprinostiti nastanku i održavanju procesa fibroze.

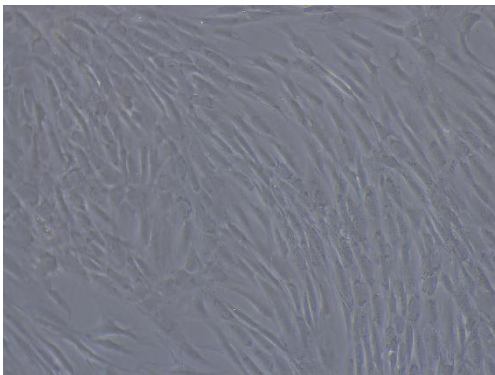


#### 4.4. Izolacija i fenotipska karakterizacija MMC izolovanih iz masnog tkiva pacijenata

Mezenhimske matične ćelije izolovane iz subkutanog masnog tkiva predstavljaju veliku nadu za lečenje mnogih oboljenja. Stoga je ćelijska terapija postala opcija za lečenje bolesti hrskavičavog tkiva, uključujući i artritичne promene. Međunarodno društvo za ćelijsku terapiju definisalo je kriterijume fenotipsku karakterizaciju ovih ćelija (Dominici i sar., 2006), a koji podrazumevaju: 1) uočavanje fenotipa sličnog fibroblastima i sposobnosti ćelija da adheriraju na površinu plastičnog suda u kojem se gaje, 2) detekciju prisustva specifičnih mezenhimskih i odsustva endotelijalnih, hematopoetskih i leukocitnih površinskih markera, i 3) sposobnost diferencijacije u osteoblaste, hondroците i adipocite.

##### 4.4.1. Vizuelizacija fenotipa aMMC

Nakon izolacije aMMC iz uzoraka masnog tkiva 4 pacijenta, ćelije su zasejane u odogovarajući medijum i posmatrane pod fazno-kontrastnim invertnim mikroskopom *Olympus LH50A (Olympus Corporation, Japan)*. Uočena je postepena promena njihovog izgleda, od nepravilno okruglastog u trenutku zasejavanja do izduženog izgleda koji je sličan fibroblastima kada adheriraju na zidove suda u kome se gaje (Slika 22.).

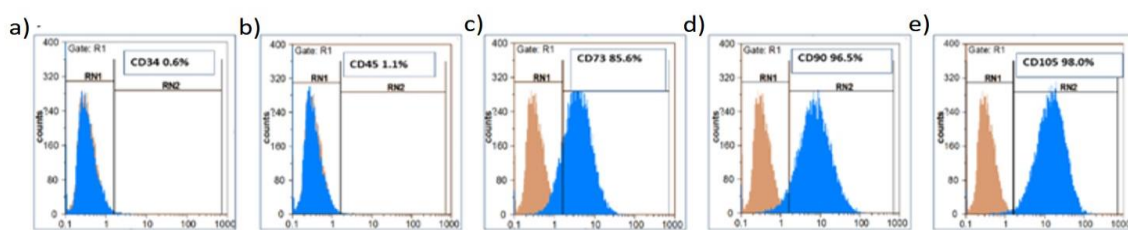


Slika 22. Prikaz fenotipa sličnog fibroblastima i sposobnosti adhezije na zidove suda u kome se gaje aMMC. Fazno-kontrastnim invertnim mikroskopom, uveličanje 20X.



#### 4.4.2. Detekcija specifičnih površinskih markera protočnom citofluorimetrijom

Imunofenotipizacija aMMĆ izvršena je metodom protočne citofluorimetrije upotrebom monoklonskih antitela specifičnih za određene površinske markere na ćelijama. Ćelije su ispitane na prisustvo površinskih markera karakterističnih za mezenhimske ćelijske linije (CD73, CD90 i CD105) i površinskih hematopoetskih i leukocitnih markera (CD34 i CD45). Dobijeni rezultati su pokazali da su markeri CD73, CD90 i CD105 bili eksprimirani i prisutni na više od 82.7%, 92.7% i 96.5% ćelija u populaciji, dok su, u skladu sa očekivanjima, površinski markeri CD34 i CD45 bili prisutni na manje od 1.3% i 1.2% ćelija. Rezultati analize ekspresije specifičnih površinskih markera na aMMĆ prikazani su na Slici 23.



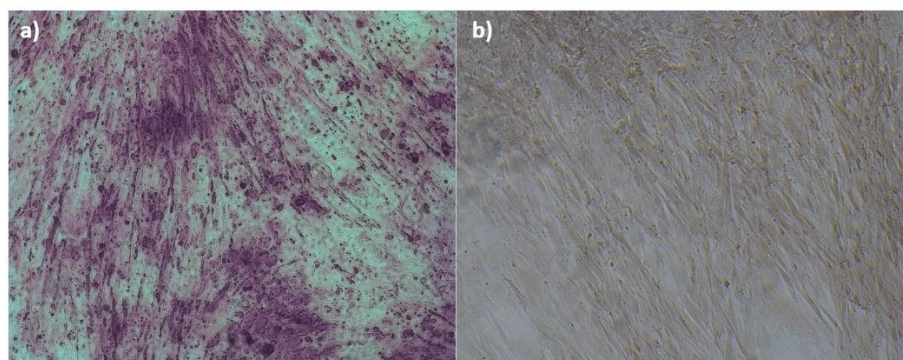
Slika 23. Reprezentativni dijagram analize prisustva površinskih markera a) CD34, b) CD45, c) CD73, d) CD90 i e) CD105 na aMMĆ protočnom citofluorimetrijom. Procenat ekspresije datog markera na dijagramu predstavlja prosečni broj ćelija u populaciji koje ekprimiraju dati marker kod svih analiziranih pacijenata.

#### 4.4.3. Potencijal aMMĆ za diferencijaciju

Adultne MMĆ su multipotentne, odnosno imaju sposobnost da se diferenciraju u različite ćelije mezodermalnog porekla (adipocite, miocite, osteoblaste i hondrocite), ali i u ćelije drugih klicinih listova (nervne, epitelijalne). Kako bi ispitali njihov potencijal za diferencijaciju, izvršena je njihova *in vitro* transformacija u hondrocite i osteoblaste.

#### 4.4.3.1. Osteogena diferencijacija aMMĆ

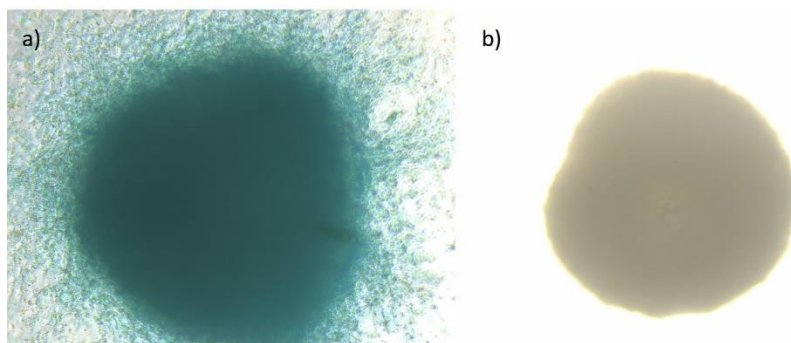
Pod osteogenim potencijalnom aMMĆ podrazumevamo njihovu sposobnost da se diferenciraju u pravcu funkcionalnih osteoblasta. Sama osteogena diferencijacija aMMĆ je proces koji se odvija u nekoliko faza: prva podrazumeva fazu osteoprogenitora koji daljom diferencijacijom omogućavaju drugu, fazu sazrevanja koja se karakteriše prisustvom preosteoblasta i sintezom organskih materija, nakon čega sledi treća, faza mineralizacije koja se karakteriše osteoblastima i njihovom proizvodnjom i vanćelijskim deponovanjem soli kalcijuma i neorganskih fosfata (Birmingham i sar., 2012). Pokazali smo da *in vitro* kultivacijom aMMĆ u osteogenom medijumu, nakon tri nedelje one deponuju soli kalcijuma u međucelijski prostor, koje se detektuju specifičnim bojenjem rastvorom Alizarin S crvenog. Vanćelijski agregati kalcijum-fosfata su se tom prilikom bojili u crveno, dok uzorci koji su gajeni u kontrolnom medijumu, bez induktora osteogene diferencijacije, ostali su nebojeni (Slika 24.).



Slika 24. Specifično bojenje vanćelijskih depoa soli kalcijuma Alizarin S crvenim. a) aMMĆ gajene u medijumu za osteogenu diferencijaciju, b) aMMĆ gajene u kontrolnom medijumu.

#### 4.4.3.2. Hondrogena diferencijacija aMMĆ

Da bi se utvrdio potencijal izolovanih matičnih ćelija iz masnog tkiva pacijenata da se diferenciraju u hondrocite, aMMĆ su gajene u medijumu koji podstiče hondrogenu diferencijaciju i kontrolnom medijumu, u trajanju od tri nedelje. Ćelije gajene u medijumu za hondrogenu diferencijaciju formirale su 3D sferoidne strukture, koji je jedan od neophodnih preduslova za diferencijaciju ovih ćelija u hondrocite. Ovim se, ćelijama obezbeđuju optimalni uslovi za hondrogenu diferencijaciju, u kojima one imaju sposobnost da sintetišu i ekskretuju komponente VCM hrskavice, na prvom mestu sulfatizovane glikozaminoglikane. Prisustvo agrekana, jednog od najzastupljenijih glikozaminoglikana u matricu hrskavice, detektovano je specifičnim bojenjem rastvorom Alcain plavog, čime je potvrđeno prisustvo funkcionalnih hondrocita. Ćelije gajene u kontrolnom medijumu, iako su zauzele sferoidni oblik, ostale su nebojene usled odsustva funkcionalnih hondrocita i produkata njihove aktivnosti (Slika 25.).



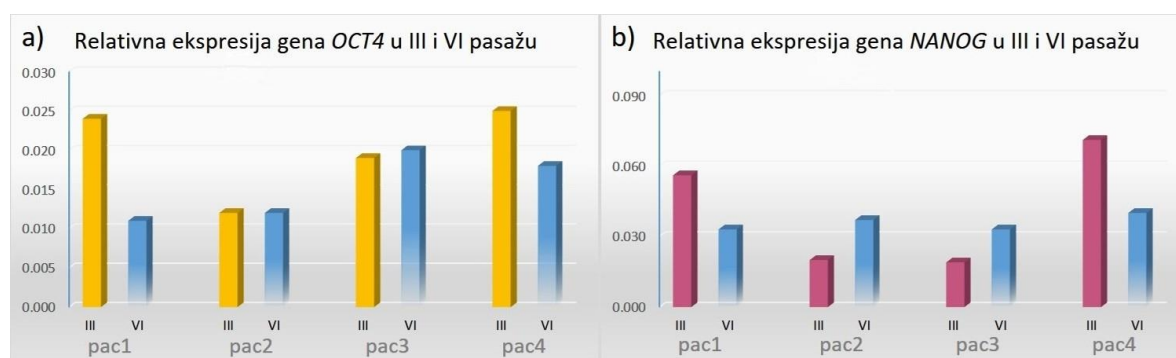
Slika 25. Specifično bojenje agrekana kao komponente VCM hrskavice, Alcain plavim. a) aMMĆ gajene u medijumu za hondrogenu diferencijaciju, b) aMMĆ gajene u kontrolnom medijumu.

#### 4.5. Utvrđivanje ekspresionih profila gena matičnosti i gena uključenih u hondrogenezu tokom dugotrajne *in vitro* propagacije aMMĆ

Da bi se ispitaio uticaj dugotrajne propagacije aMMĆ u *in vitro* uslovima na njihovu potentnost i sposobnost hondrogene diferencijacije, praćena je relativna ekspresija gena matičnosti i gena uključenih u najranije faze hondrogeneze u ranom i kasnom pasažu primenom RT-qPCR metode.

##### 4.5.1. Utvrđivanje ekspresionih profila gena matičnosti OCT4 i NANOG

Da bi se ispitaio uticaj produžene *in vitro* kultivacije aMMĆ na njihovu sposobnost samoobnavljanja, praćena je relativna ekspresija gena *OCT4* i *NANOG*, kao molekularnih markera matičnosti koji su neophodni za održavanje nediferenciranog stanja ćelija i njihove potentnosti. Mezenhimske matične ćelije izolovane iz masnog tkiva 4 donora koje su gajene *ex vivo*, za potrebe ekspresionih analiza su prikupljene u 3. (ranom) i 6. (kasnom) pasažu. Dobijeni rezultati su ukazali na postojanje međusobnih razlika u potentnosti aMMĆ poreklom iz različitih donora (Slika 26.).



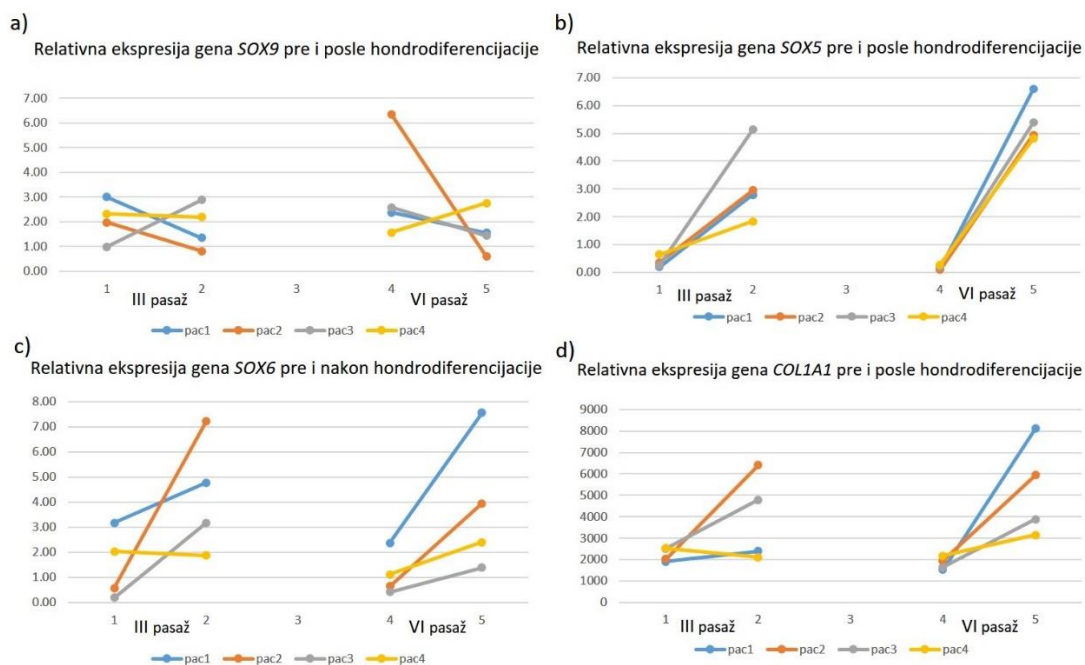
Slika 26. Grafički prikaz relativne ekspresije gena a) *OCT4* i b) *NANOG* u aMMĆ poreklom iz 4 pacijenta. III-označava rani pasaž; VI-označava kasni pasaž;

Naime kod pacijenata označenih pod rednim brojem 1. i 4. detektovano je da sa propagacijom ćelija u kulturi dolazi do sniženja ekspresije gena *OCT4* (za 54%, odn. 28%, Slika 26a.) i *NANOG* (za 45%, odn. 44%, Slika 26b.), što bi svakako ukazivalo da dolazi do

slabljenja njihovog potencijala za samoobnavljanjem kako raste broj pasaža. Za razliku od njih, kod pacijenata sa rednim brojem 2. i 3., detektovano je povećanje samo ekspresije gena *NANOG* sa povećanjem broja pasaža (za 85%, odn. 58%, Slika 26b.), dok je ekspresija gena *OCT4* ostala nepromenjena (Slika 26a.). Pored toga što ovi rezultati ukazuju kako se potentnost menja sa povećanjem ćelijskih ciklusa za svakog pacijenta posebno, oni ukazuju i na postojanje razlika u sposobnosti samoobnavljanja aMMĆ između pacijenata.

4.5.2. Utvrđivanje ekspresionih profila gena uključenih u hondrogenu diferencijaciju i sintezu komponenti VĆM hrskavice pre i nakon diferencijacije aMMĆ u hondrocite

Veoma malo se zna o uticaju broja ćelijskih ciklusa aMMĆ na njihovu sposobnost da se diferenciraju u hondrocite i produkuju komponente VĆM hrskavice. Stoga, analizirani su nivoi ekspresije gena *SOX5*, *SOX6* i *SOX9*, kao markera hondrogene diferencijacije kao i ekspresioni nivo gena *COL1A1* čiji produkt ulazi u početni sastav VĆM hrskavice, metodom RT-qPCR. Za potrebe kvantifikacionih analiza, aMMĆ poreklom iz 3. i 6. pasaža su indukovane da se diferenciraju u hondrocite i formiraju 3D sferoidnu kulturu. Dobijeni rezultati ekspresionih analiza prikazani su Slici 27.



Slici 27. Grafički prikaz relativne ekspresije gena a) *SOX9*, b) *SOX5*, c) *SOX6* i d) *COL1A1* u aMMC poreklom iz 4 pacijenta pre i nakon njihove diferencijacije u funkcionalne hondroците u ranom i kasnom pasažu.

Ekspresija gena *SOX9* se pokazala kao izuzetno varijabilna kako između pacijenata tako i u pogledu ranog i kasnog pasaža istog pacijenta. Sa grafika na Slici 27a., jasno se vidi da ne postoji univerzalan obrazac promene ekspresije ovog gena. Kako je ovaj gen jedan od najranijih markera hondrogene diferencijacije, očekivano je da se njegova ekspresija smanjuje tokom diferencijacije. Međutim, kod 2/4 pacijenta je detektovano povećanje ekspresije gena *SOX9* u jednom od ispitivanih pasaža (Slika 27a., kod pacijenta broj 3. u 3., i pacijenta broj 4. u 6. pasažu). Stoga, ekspresija gena *SOX9* svakako ne bi bila adekvatni marker koji bi tačno oslikavao potencijal ovih ćelija za hondrogenezu.

Utvrđivanjem ekspresionih profila gena *SOX5*, *SOX6* i *COL1A1* tokom diferencijacije aMMC u hondroците iz ranog i kasnog pasaža uočava se isti trend povećanja ekspresije (Slika 27b., 27c. i 27d.). Izuzetak je pacijent br 4. kod koga geni *SOX6* i *COL1A1* pokazuju smanjenje ekspresije u ranom pasažu (sniženje za 8%, odn. 17%). Ćelije svih ispitivanih pacijenata, u 6. pasažu, zadržavaju sposobnost hondrogene diferencijacije, dok

kod pacijenata 1. i 4. pokazuju čak i veći potencijal za diferencijaciju u hondroците u kasnom pasažu, detekcijom povećane ekspresije ispitivanih gena u odnosu na rani pasaž. Naime, kod pacijenta br. 1. izmerno povećanje ekspresije za gen *SOX6* iznosilo je 58%, za gen *SOX5* 136%, a za gen *COL1A1* čak 241%, dok je kod pacijenta br. 4. detektovano povećanje bilo 28%, 162% i 49%, respektivno. Dobijeni podaci ukazuju na to da bi ovi geni mogli biti potencijalno dobri markeri za praćenje uspešnosti hondrogene diferencijacije tokom produženog gajenja ćelija u kulturi.

Sažetak rezultata fenotipske karakterizacije i relativnih ekspresionih analiza odabranih gena kod aMMĆ:

- Fenotipska karakterizacija aMMĆ pokazala je njihov fenotip sličan fibroblastima, sposobnost adhezije za površinu suda u kojem se gaje, prisustvo specifičnih mezenhimskih i odsustvo leukocitnih i hematopoetskih površinskih markera, kao i sposobnost da se diferenciraju u osteoblaste i hondroците.
- Utvrđivanjem ekspresionih profila gena matičnosti *OCT4* i *NANOG*, dobijen je uvid u razlike u potentnosti aMMĆ između različitih pacijenata. Upoređivanjem ekspresionih profila ovih gena u ranom i kasnom pasažu kod svakog pacijenta posebno, pokazali smo da se potentnost menja sa propagacijom ovih ćelija u kulturi.
- Utvrđivanjem ekspresionih profila gena markera hondrogeneze, dobili smo uvid u razlike aMMĆ poreklom iz različitih pacijenata, kao i informacije kako se njihov hondrogeni potencijal menja sa propagacijom ovih ćelija u kulturi. Analizirani ekspresioni nivoi gena *SOX5*, *SOX6* i *COL1A1* izdvojili su se kao potencijalno prognostički markeri efikasnosti hondrogeneze.

## **5. DISKUSIJA**



Autoimune bolesti, u koje spada i SSc, grupa su složenih poremećaja iniciranih gubitkom tolerancije na sopstvene antigene, što dovodi do hronične inflamacije i oštećenja tkiva posredovano reakcijama imunog sistema (Marrack i sar., 2001). Karakteriše ih predominantno ispoljavanje kod osoba ženskog pola (Quintero i sar., 2012). Precizni molekularni mehanizmi u osnovi ovih poremećaja još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni. Dobro je poznato da mnoge AB imaju sličnu etiologiju što ukazuje na zajedničku genetičku osnovu (Cho i Gregersen, 2011; Zhernakova i sar., 2009). Na primjer, većina genetičkih asocijacija opisanih u SSc, kao fibrotičnom autoimunom oboljenju kože i unutrašnjih organa, takođe su prijavljene da imaju značajnu ulogu i u predispoziciji za nastanak RA (16 lokusa), SLE (13 lokusa), MS (9 lokusa), IBD (8 lokusa) i primarnoj bilijarnoj cirozi (8 lokusa, takođe) (Farh i sar., 2015; Martin i sar., 2012; Ramos i sar., 2015). Smatra se da brojni geni kandidati kroz interakciju sa epigenetičkim i sredinskim činiocima dovode do predispozicije za nastanak i progresiju ovih bolesti i da se u osnovi njihove patogeneze nalaze kako bolest-specifični tako i zajednički molekularni putevi (Cho i Gregersen, 2011; Zhernakova i sar., 2009).

Napredak u uspostavljanju preciznije i brže dijagnostike SSc, kao i u razvoju efikasnih terapeutika otežan je velikom heterogenošću ove bolesti i nepoznavanjem u potpunosti procesa koji se nalaze u osnovi njene patofiziologije. Otkrivanje novih molekularnih biomarkera i bolje razumevanje puteva i procesa uključenih u patogenezu ove bolesti od presudne je važnosti za bolju stratifikaciju pacijenata i korelaciju sa određenim kliničkim simptomima, kao i za praćene aktivnosti i predviđanje toka bolesti. Analiza ekspresije određenih gena u MNČPK prisutnim u cirkulaciji i u ćelijama tkiva kože pogođenim fibrotičnim promenama, značajna je kao pristup u identifikaciji potencijalnih molekularnih biomarkera na sistemskom i lokalnom nivou, uključenih u značajne procese kao što su prepoznavanje patogena, inflamacija i fibroza.

## 5.1. Uloga signalnog puta JAK2/STAT3 u SSc i značaj analize ekspresionog profila gena *IL6*, *JAK2* i *STAT3* na sistemskom nivou

Signalni put JAK2/STAT3 jedan je od glavnih signalnih mehanizama preko kojih deluje širok spektar citokina i faktora rasta regulišući ključne procese u organizmu, kao što su razviće, hematopoeza, adipogeneza i razvoj imunog sistema (Rawlings i sar., 2004). Neadekvatno funkcionisanje ove signalne transdukcije asocirano sa metaboličkim i inflamatornim bolestima, kao i sa nekim tipovima karcinoma (Karin i Greten, 2005; Thomas i sar., 2015; Yang i sar., 2017a).

### 5.1.1. Ekspresioni profil gena *IL6* na sistemskom nivou

Postoji veliki broj potencijalno relevantnih citokina i faktora rasta sa različitim efektima u zavisnosti od ciljnih ćelija na koje deluju, a koji mogu biti važni za patogenezu ili mogu biti korisni kao markeri patobiologije SSc. Naime *IL6* je citokin sa nekoliko potencijalno važnih uloga u patogenezi SSc. Prethodne studije pokazale su njegovu ulogu u aktivaciji endotelnih ćelija, preko trans-signalizacije koja rezultuje povećanjem ekspresije molekula *ICAM1*, *VCAM1*, *IL8*, *MCP1* kao i *IL6*, koja predhodi infiltraciji inflamatornih ćelija, prvenstveno monocita i leukocita (Jones i sar., 2005; Kaplanski i sar., 2003; Romano i sar., 1997). *IL6* je uključen i u razvoj autoimunosti. Naime istraživanja na pacijentima sa Kronovom bolešću pokazuju da autoreaktivne T ćelije izbegavaju apoptozu aktivacijom signalnog puta koji uključuje *STAT3* putem *IL6* trans-signalizacije (Atreya i sar., 2000). Oni su takođe demonstrirali na modelu autoimunog artritisa da je *IL6* trans-signalizacija odgovorna za vođenje lokalnih inflamatornih odgovora (Lissilaa i sar., 2010). Pokazano je i da *IL6* utiče na B ćelije, promovišući njihovu diferencijaciju u plazma ćelije i podstičući proizvodnju antitela (Jones i sar., 2005). *IL6* je i profibrogeni citokin. Delovanjem na fibroblaste, reguliše njihovu proliferaciju, povećava sintezu kolagena, glikozaminoglikana i tkivnog inhibitora metaloproteinaza-1 i povećava produkciju *MCP1* i *IL6*, lokalno stimulišući proces fibroze (Duncan i Berman, 1991; Irwin i sar., 2002).

U istraživanjima Khan i sar., i Sato i sar. pokazano je IL6 bio povišen u serumu SSc pacijenata u odnosu na kontrolne ispitanike i da je njegov nivo korelirao sa stepenom zahvaćenosti kože fibrotičnim promenama kao i sa lošijim ishodom kod SSc pacijenata (Khan i sar., 2012; Sato i sar., 2001). Scala i sar. pokazali su da je povišen nivo IL6 u serumu SSc pacijenata bio asociran sa nastankom plućne fibroze (Scala i sar., 2004). Rezultati Gourch i sar., su pokazali da plazma nivo IL6 bio veći kod ATA pozitivnih pacijenata u odnosu na ACA pozitivne SSc pacijenata (Gourch i sar., 2009). Naši rezultati ukazali su da je izmereni nivo ekspresije gena *IL6* kod SSc pacijenata bio značajno viši od nivoa ekspresije koji je detektovan u grupi kontrolnih ispitanika. Poređenje ekspresije gena između fenotipskih podgrupa SSc pacijenata, ukazalo je na to da je veća ekspresija ovog gena bila asocirana sa kasnim oblikom bolesti. Ovaj rezultat ukazuje da nivo *IL6* iRNK utvrđen na sistemskom nivou ima potencijal da postane dijagnostički biomarker kasnog oblika bolesti, što bi moglo da utiče i na bolji terapijski odabir. Naime, povišen detektovani nivo IL6 mogao bi da održava lokalnu inflamaciju, da indukuje odgovor endotelijalnih ćelija i fibroblasta, stoga uvođenje ciljane terapije za signalni put IL6 svakako bi bilo od velike koristi za SSc pacijente. Predloženo je nekoliko terapijskih strategija kojima bi se ili kompletno blokirali putevi zavisni od IL6, ili specifično trans-signalizacija (Jones i sar., 2011). Trenutna klinička ispitivanja su usmerena na Tocilizumab i kakvu korist SSc pacijentima donosi ovakav pristup ciljane terapije. Tocilizumab predstavlja monoklonsko antitelo usmereno protiv IL6R, čime blokira kako klasičnu tako i trans-signalizaciju putem IL6, potencijalno inhibirajući procese infamacije i fibroze (O'Reilly i sar., 2013).

#### 5.1.2. Ekspresioni profil gena *JAK2* na sistemskom nivou

Kod sisara, signalni put JAK/STAT jedan je od glavnih signalnih mehanizama preko kojih deluje širok spektar citokina i faktora rasta regulišući proliferaciju ćelija, diferencijaciju, ćelijsku migraciju i apoptozu. Ovi ćelijski događaji ključni su za procese kao što su razviće, adipogeneza, hematopoeza, imunološki razvoj i mnogi drugi procesi (Rawlings i sar., 2004). Nasuprot tome, mutacije koje konstitutivno aktiviraju ili ne uspevaju

da regulišu pravilno signalizaciju putem JAK molekula uzrokuju inflamatorne bolesti, eritrocitozu, gigantizam i neke leukemije (Igaz i sar., 2001; O'Shea i sar., 2002). Iako je mehanizam JAK/STAT signalizacije sam po sebi veoma značajan, biološke posledice njegove deregulacije su znatno veće iz razloga što ovaj signalni put ostvaruje brojne interakcije sa drugim važnim signalnim putevima kao što RAS/MAPK/PI3K signalnim putevi (Rane i Reddy, 2000; Shuai, 2000).

Studije Pendergrass i sar. i Christmann i sar. (Christmann i sar., 2011; Pendergrass i sar., 2010) pokazale su veću ekspresiju gena *JAK2* u MNČPK, ali samo u podgrupi ISSc pacijenata sa PAH-om u poređenju sa kontrolnim ispitanicima i ISSc pacijentima bez PAH-a. Mi nismo uočili značajnu razliku u ekspresiji gena *JAK2* između ISSc pacijenata sa i bez PAH-a. Interesantno, naši rezultati pokazali su značajnu sniženu ekspresiju gena *JAK2* na celoj grupi SSc pacijenata u poređenju sa kontrolnom grupom. Jedno od objašnjenja za sniženu ekspresiju gena *JAK2* moglo bi biti i njegova post-transkripciona regulacija sa miRNK-135a. Naime, gen *JAK2* ima 3'-UTR region od 1256-bp u okviru koga se nalazi 8-merno vezujuće mesto za miR-135a. Studija Navarra i sar. (Navarro i sar., 2009), pruža snažne dokaze da različite miRNK regulišu signalni put JAK/STAT i da posebno miR-135a može funkcionisati kao potencijalni supresor ovog puta, upravo delujući na *JAK2* iRNK. Stoga bi u budućim studijama svakako trebalo posvetiti pažnju na analizu zastupljenosti miRNK-135a i interakcije sa *JAK2* iRNK. Takođe, u poređenju sa SSc pacijentima muškog pola, ženski SSc pacijenti imali su značajno veći nivo ovog gena. Na osnovu naših rezultata možemo zaključiti da smanjenje ekspresije gena *JAK2* možemo smatrati za potencijalni marker za SSc, ali ne i za marker kliničkih podtipova ove bolesti. Kako je razlika u ispoljavanju ove bolesti kod polova jedna od njenih osnovnih obeležja, potrebna su dodatna istraživanja koja bi precizirala tačnu ulogu diferencijalne ekspresije gena *JAK2* kod pacijenata različitih polova u patogenezi ove bolesti.

### 5.1.3. Ekspresioni profil gena *STAT3* na sistemskom nivou

Nedavni dokazi pokazuju da aktivnost većine inflamatornih citokina konvergira ka transkripcionim regulatorima NF- $\kappa$ B i *STAT3* (Yu i sar., 2009). *STAT3*, poznat je i kao posrednik zapaljenja delujući nizvodno od velikog broja citokina uključujući IL6, IL10, IL17, IL21, IL23 i VEGF, prenoseći signale kroz citoplazmu i modulišući odgovor imunog sistema kroz regulaciju ekspresije ciljnih gena u jedru (Vang i sar., 2004; Iu i sar., 2007).

U patogenezi IBD-a i asociranog kolorektalnog karcinoma, prijavljena je aberantna signalna kaskada koja uključuje IL6, IL10 i *STAT3* (Karin i Greten, 2005). Takođe gen *STAT3* identifikovan je kao jedan od lokusa asociranih sa predispozicijom za pojavu Kronove bolesti (Barrett i sar., 2008) i MS (Jakkula i sar., 2010). Ipak, naši rezultati nisu pokazali statističku razliku u ekspresiji gena *STAT3* u MNČPK SSc pacijenata u poređenju sa kontrolnim ispitanicima, kao ni između analiziranih fenotipskih podgrupa SSc pacijenata.

## **5.2. Uloga signalnog puta NF- $\kappa$ B u SSc i značaj analize ekspresionog profila gena *TLR7*, *TLR9* i *IRAK1* i miRNK-146a na sistemskom nivou**

Urođen imunitet predstavlja prvu liniju odbrane organizma od invazivnih patogena. Porodica Toll-like receptora, deluje kao primarni senzor za otkrivanje širokog spektra mikrobioloških komponenti i pokretanje reakcija urođenog imuniteta. Svi putevi signalizacije pokrenuti aktiviranjem TLR-ova, vode aktivaciji transkripcionog regulatora NF- $\kappa$ B, koji reguliše ekspresiju brojnih gena, između ostalog i onih koji kodiraju proinflamatorne citokine, faktore rasta i adhezivne molekule, a koji su neophodni za odgovore imunog sistema u odbrani domaćina (Kawai i Akira, 2007).

### 5.2.1. Ekspresioni profil gena *TLR7* na sistemskom nivou

Intracelularni TLR-ovi prepoznavanjem stranih NK u endozomskim kompartmentima, pokreću signalnu kaskadu koja dovodi do produkcije proinflamatornih molekula od strane makrofaga i konvencionalnih dendritičnih ćelija (DC), kao i interferona tipa I od strane plazma DC, koji su neophodni za pravilno funkcionisanje imunog odgovora (Blasius i Beutler, 2010a). Iako, TLR-ovi predstavljaju prvu liniju odbrane od invazivnih patogena i održavaju normalnu homeostazu organizma (Goutagny i sar., 2012), ovi članovi TLR porodice takođe su uključeni u patogenezu nekih AB, hroničnu inflamaciju i razvoj fibroze (Ospelt i sar., 2008). Naime, u slučaju enormnog oštećenja ćelija ili nepotpunog uklanjanja ćelijskog debrisa, može doći do oslobađanja sopstvenih antigena koji postaju dostupni komponentama imunog sistema (Rifkin i sar., 2005). Ovi autoantigeni bivaju prepoznati od strane autoantitela sa kojima formiraju imune komplekse. Autoantitela poreklom su od samoreaktivnih B ćelija, koje su u malom procentu prisutne kod većine pojedinaca (Wardemann i sar., 2003). Višestruke *in vitro* studije kako na mišjim tako i na ljudskim ćelijama pokazale su da ovi IK mogu biti internalizovani uz pomoć B ćelijskog receptora u B limfocite (Lau i sar., 2005a) ili preko Fc- $\gamma$  površinskog receptora u DC, plazma DC, makrofage i neutrofile (Boule i sar., 2004; Garcia-Romo i sar., 2011; Vollmer i sar., 2005b). U osnovi patogeneze SLE pokazano je da ovi IK bivaju usmereni ka endozomskom kompartmentu i aktiviraju TLR9 i TLR7 koji posledično dovode do povećane ekspresije gena indukovanih IRF, produkcije IL1, TNF- $\alpha$  i IL6, prezentacije sopstvenih antigena, sazrevanja autoreaktivnih B ćelija i produkcije autoantitela (Means i sar., 2005; Shrivastav i Niewold, 2013). Kako SSc pokazuje velike sličnosti sa SLE, prirodno se nameće da bi ovo mogao biti jedan od mehanizamima u osnovi njene patofiziologije. Konkretno, obe bolesti povezane su sa prisustvom autoantitela koje prepoznaju nukleoproteinske komplekse, i obe ove bolesti karakteriše povećana ekspresija gena koji su regulisani IRF u MNČPK (Leadbetter i sar., 2002; Tan i sar., 2006). Kako je jedna od osnovnih karakteristika SSc upravo vaskularno oštećenje koje se manifestuje kao Raynaudov fenomen i ishemija kože, upravo ono može predstavljati način na koji dolazi do oslobađanja endogenih TLR liganda.

Naši rezultati pokazuju značajno veću ekspresiju gena *TLR7* u MNČPK pacijenata sa SSc u poređenju sa ekspresionim nivoom ovog gena detektovanim kod kontrolnih ispitanika. Nakon diskriminacije pacijenata na one sa *TLR7<sup>visok</sup>* i *TLR7<sup>nizak</sup>* ekspresionim statusom, pokazana je asociranost povećanog nivoa gena *TLR7* sa podgrupama SSc pacijenata sa kasnim i aktivnim oblikom bolesti, kao i prisustvom digitalnim ulcera. Naši rezultati su u saglasnosti sa rezultatima koje su dobili Komatsuda i sar. (Komatsuda i sar., 2008). Njihova studija je pokazala povećanu ekspresiju gena *TLR7* kod SLE pacijenata u odnosu na kontrolne ispitanike koja je korelirala sa ekspresijom *IFN $\alpha$* , dok Chauhan i sar. pokazali su i da je nivo ekspresije *TLR7* korelirao i sa nivoom anti-RNK antitelima izmerenim u serumu SLE pacijenata (Chauhan i sar., 2013). Takođe, povećana ekspresija gena *TLR7* detektovana je u MNČPK i kod pacijenata sa SS (Zheng i sar., 2010), MS (Derkow i sar., 2013) i psorijazom (Kim i sar., 2016) u odnosu na kontrolne ispitanike. Ovi navodi svakako ukazuju na značajnu ulogu gena *TLR7* u zajedničkim procesima koji se nalaze u osnovi patogeneze velikog broja AB, a koji bi na prvom mestu podrazumevali indukciju proliferacije i diferencijacije B ćelija u plazma ćelije, proizvodnju autoantitela, izmenjenu prezentaciju antigena, sekreciju citokina i regulaciju T ćelijskih funkcija (Lanzavecchia i Sallusto, 2007; Meyer-Bahlburg i Rawlings, 2008).

Naši rezultati ukazuju na potencijalnu ulogu gena *TLR7* kao markera za bolju stratifikaciju SSc pacijenata prema kliničkim manifestacijama i predviđanje toka bolesti, ali kao i potencijalnog terapijskog targeta. Nekoliko modulatora signalnog puta TLR već je u okviru kliničkih ispitivanja (Li i sar., 2013). Svakako najveći izazov je supresija ovog signalnog puta bez narušavanja urođenog imunog odgovora ili remećenja drugih signalnih kaskada. Inhibiranje aktivacije signalnog puta *TLR7* moglo bi da se odigra na više nivoa, uključujući promenu pH endozomalne sredine koja je neophodna za aktivaciju *TLR7*, blokiranje vezivanja liganda, kao i inhibicija nizvodnih signalnih adapternih molekula (Kandimalla i sar., 2013; Sacre i sar., 2012). Takođe terapeutici zasnovani na upotrebi miRNK koje mogu da suprimiraju *TLR7* iRNK, a koji su još u okviru kliničkih ispitivanja, predstavljaju nov i zanimljiv pristup u lečenju AB (Deng i sar., 2013).

### 5.2.2. Ekspresioni profil gena *TLR9* na sistemskom nivou

Analiza ekspresije gena *TLR9* u MNČPK naše grupe pacijenata pokazala je da su, u poređenju sa kontrolnim ispitanicima, SSc pacijenti imali znatno niži nivo ekspresije ovog gena. Rezultati *TLR9* ekspresionih analiza na modelima različitih AB veoma su kontradiktorni. Naime, studije rađene na RA (Lacerte i sar., 2016) i psorijazi (Kim i sar., 2016), ukazale su na značajno veću zastupljenost *TLR9* iRNK u MNČPK pacijenata u odnosu na kontrolne ispitanike. Ispitivanje pak ekspresionog nivoa ovog gena na MS pacijentima pokazalo je znatno nižu ekspresiju u grupi pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu (Derkow i sar., 2013). Istraživanja rađena na SS i SLE pacijentima dala su oprečne rezultate. Dok su Zheng i sar. (Zheng i sar., 2010) pokazali povećanu ekspresiju, Karlesen i sar. (Karlsen i sar., 2017) detektovali su sniženu ekspresiju gena *TLR9* u grupi SS pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu. Što se tiče istraživanja na SLE, Komatsuda i sar. (Komatsuda i sar., 2008), pokazali su povišenu ekspresiju *TLR9* u MNČPK SLE pacijenata u odnosu na kontrolne ispitanike, koja je i korelisala sa ekspresijom *IFN $\alpha$*  i zastupljenošću anti-DNK antitelima, sa jasnom ulogom *TLR9* u patogenezi ove bolesti prvenstveno kroz aktivaciju DČ, B i T ćelija, sekreciju citokina i produkcije autoantitela (Barrat i sar., 2005). Za razliku od ovih nalaza, postoje brojne studije na SLE modelima miševa (Wu i Peng, 2006; Yu i sar., 2006), koje pak ukazuju na protektivnu ulogu *TLR9*, i da je snižavanje ekspresije ovog gena povezano sa razvojem SLE. Takođe smatra se da je aktivacija *TLR9* neophodna da spreči nastanak zapaljenja sluzokože i da inicira zarastanje rana na modelu ulceroznog kolitisa (Obermeier i sar., 2005). Na *in vivo* modelu *TLR9*-deficijentnih miševa pokazano je da nedostatak ovog molekula vodi povećanoj osetljivosti ka intestinalnom oštećenju i slabijoj efikasnosti primenjene terapije za IBD (Rose i sar., 2012).

Iako *TLR9* ne bi bio molekul izbora za razlikovanje kliničkih podgrupa SSc pacijenata, prema našim rezultatima nizak nivo ekspresije gena *TLR9* predstavlja jedan od faktora rizika za pojavu SSc. Postoje podaci koji ukazuju da je signalni put *TLR7* regulisan od strane *TLR9* (Santiago-Raber i sar., 2010; Wang i sar., 2006), stoga gubitak ove regulacije, usled smanjene ekspresije gena *TLR9* mogao bi voditi povećanoj inflamaciji i nastanku SSc.



### 5.2.3. Ekspresioni profil gena *IRAK1* na sistemskom nivou

U ovom delu teze našu pažnju smo usmerili na gen *IRAK1*, uzimajući u obzir sa jedne strane njegovu poziciju u okviru genomskog regiona Xq28 i predominantnog ispoljavanja SSc kod osoba ženskog pola, a sa druge strane njegovu biološku funkciju kao učesnika signalnog puta NF- $\kappa$ B. Naime, *IRAK1* zajedno sa TRAF6 predstavlja ključni nizvodni adaptorni molekul ovog signalnog puta koji vodi od TIR kompleksa i rezultira aktivacijom transkripcionog regulatora NF- $\kappa$ B i regulacijom produkcije brojnih proinflamatornih citokina, hemokina i adhezivnih molekula (Dunne i O'Neill, 2003; Ghosh i Hayden, 2008; Ringwood i Li, 2008). Nepravilnosti u ovom signalnom putu dovode do narušavanja citokinskog balansa, poremećene prezentacije antigena, sazrevanja imunih ćelija i apoptoze, i pokazano je da su u vezu sa nastankom nekih AB, kao što su dijabetes tip 2, Kronova bolest, SS i SSc (Baldwin, 1996; Dale i sar., 2006). Između ostalog, *IRAK1* je zanimljiv i zbog njegovog učešća u sintezi IFN $\alpha$  i IFN $\gamma$ , za koje je već pokazano da imaju ulogu u SSc patogenezi (Eloranta i sar., 2010; Radstake i sar., 2009).

Uzimajući u obzir *IRAK1* ekspresione analize, svega nekoliko studija u kojima je određivan ekspresioni profil ovog gena u AB su objavljene. Rezultati ovih studija veoma su kontradiktorni. Analiza ekspresionog profila gena *IRAK1* na RA pacijentima nije pokazala nikakve značajne razlike između *IRAK1* ekspresionog nivoa kod pacijenata u odnosu na kontrolne ispitanike (Pauley i sar., 2008), dok je studija na pacijentima sa psorijazom pokazala značajno veću ekspresiju gena *IRAK1* kod pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu (Sanmiguel i sar., 2009). Slično našoj studiji, Zilahi i sar. pokazali su da je ekspresija gena *IRAK1* bila značajno snižena i u grupi SS pacijenata (Zilahi i sar., 2012). Naša relativna ekspresiona analiza pokazala je na sniženje ekspresionog nivoa za 42% kod SSc pacijenata u odnosu na kontrolne ispitanike. Dobijeni rezultati ukazuju da izmenjena ekspresija gena *IRAK1* mogla bi se smatrati za potencijalni biomarker SSc. Kada smo uporedili SSc pacijente ženskog pola sa pacijentima muškog pola, pronađena je znatno niža ekspresija ovog gena kod muških SSc pacijenata, ukazujući da je *IRAK1* ekspresija zavisna od pola. Kako je redukovani nivo ovog gena asociran i sa nekim specifičnim kliničkim karakteristikama, kao

što je prisustvo ATA ili izrazitijim fibrotičnim promenama na koži, mogao bi poslužiti kao marker za bolju stratifikaciju pacijenata.

#### 5.2.4. Ekspresioni profil miRNK-146a na sistemskom nivou

U normalnoj homeostazi, miRNK igraju značajnu ulogu u regulaciji ćelijske diferencijacije, proliferacije, metabolizma, apoptoze, hematopoeze i inflamatornih odgovora asociranih sa urođenim i stečenim imunim sistemom (Pritchard i sar., 2012). Izmenjena post-transkripciona regulacija ciljnih gena sa miRNK rezultira brojnim patološkim stanjima (Singh i sar., 2013). Što se tiče miRNK-146a, jedna od njenih uloga svakako je fina regulacija IRAK1 i TRAF6, RNK interferencijom (Taganov i sar., 2006). Posledica nepravilnosti u njenom funkcionisanju može rezultirati različitim tipovima karcinoma (Xu i sar., 2011; Yue i sar., 2011) i AB (Stanczyk i sar., 2008; Zhou i sar., 2014).

Ekspresione analize naše studije, pokazale su značajno smanjenje miRNK-146a novoa od 67% u grupi SSc pacijenata u odnosu na grupu kontrolnih ispitanika. Kada smo uporedili SSc pacijente ženskog pola u odnosu na pacijente muškog pola, pronašli smo znatno viši nivo miRNK-146a kod muških SSc pacijenata, što je u skladu sa rezultatom niže ekspresije gena *IRAK1* u istoj grupi pacijenata, što ukazuje na direktnu interakciju ova dva molekula. Takođe, izmenjena ekspresija miRNK-146a korelisala je sa lakšom kliničkom slikom u pogledu zahvaćenosti kože fibrotičnim promenama. Brojne studije na AB pokazale su kontradiktorne nalaze u pogledu miRNK-146a ekspresionih profila. Naime, povišena miRNK-146a ekspresija detektovana je u sinovijalnom tkivu, serumu i MNČPK RA pacijenata, i korelisala je sa aktivnošću bolesti (Murata i sar., 2010; Pauley i sar., 2008; Stanczyk i sar., 2008). Slični rezultati su objavljeni i za druge AB, kao što su SS (Zilahi i sar., 2012), i psorijaza u kojoj je povećana ekspresija miRNK-146a detektovana u koži sa skvamoznim promenama kod pacijenata (Sonkoly i sar., 2008b; Sonkoly i sar., 2007). Naši rezultati u skladu sa nalazima istraživanja na pacijentima sa dijabetesom tip 2 i SLE, kod kojih je detektovana redukovana ekspresija miRNK-146a (Balasubramanyam i sar., 2011; Tang i sar., 2009). Uzimajući u obzir i studiju Lu i sar. (Lu i sar., 2010), u kojoj je pokazano

da ablacija miRNK-146a u Treg ćelijama u "knock-out" modelu miša dovodi do narušavanja imunološke tolerancije i razvoja AB koje karakteriše prisustvo imuno-posredovanih lezija na različitim unutrašnjim organima, mogli bismo smatrati da redukovani nivo miRNK-146a predstavlja faktor rizika za nastanak i razvoj SSc.

#### 5.2.5. Korelacione analize parova ispitivanih gena na sistemskom nivou

Korelacione analize gena na sistemskom nivou u grupi kontrolnih ispitanika i grupi SSc pacijenta ukazale su da pored nekih očuvanih interakcija, kao što je pozitivan odnos između *JAK2* i *IRAK1* transkripta, postoje i izmenjene interakcije između transkripata analiziranih gena. Dok je u grupi MNČPK uzoraka kontrolnih ispitanika dominirao negativan odnos između *TLR9* i *TLR7* transkripata, u grupi MNČPK uzoraka SSc pacijenata, izdvojile su se pak dve snažne negativne korelacije, jedna između *JAK2* transkripta, a druga između *IRAK1* transkripta sa miRNK-146a, koje nisu postojale u kontrolnoj grupi uzoraka. Štaviše, rezultati korelacije ekspresionog nivoa *IRAK1* sa miRNK-146a ukazali su da se ekspresionim nivoom ove miRNK može objasniti skoro 27% varijanse ekspresije gena *IRAK1*. Ovi nalazi su u saglasnosti sa činjenicom koja je poznata iz literature, da pored *TRAF6* iRNK, *IRAK1* iRNK je najvažniji ciljni molekul za ovu miRNK, koja na taj način učestvuje finoj regulaciji signalnog puta NF-kB (Taganov i sar., 2006). Za alteracije u ovom signalnom putu već je pokazano da posreduju u procesu nastanka nekih inflamatornih bolesti (Liu i sar., 2017a).

Ovi rezultati iniciraju da izmenjena ekspresija analiziranih gena i njihove narušene međusobne interakcije svakako mogu doprinositi nastanku i održavanju procesa inflamacije. Dodatne studije na većem broju uzoraka su neophodne, da se utvrdi tačan doprinos izmenjenih korelacija u mehanizmu nastanka bolesti.

### 5.3. Studija asocijacije genetičkih varijanti u genima *IRAK1* i *miRNK-146a* sa rizikom za nastanak i progresiju SSc

Dobro je poznato da mnoge AB imaju sličnu etiologiju koja ukazuje na učešće zajedničkih gena kandidata. Nedavna istraživanja sugerisala su da se mnogi od njih upravo odnose na gene za miRNK, čija funkcija može biti narušena prisustvom varijanti kako u sopstvenim sekvencama (Duan i sar., 2007; Gottwein i sar., 2006), tako i u njihovim ciljnim sekvencama koje prepoznaju na osnovu komplementarnosti (Saunders i sar., 2007). Stoga, u okviru ovog dela istraživanja, fokusirali smo se na gen *IRAK1*, i na njegov post-transkripcioni regulator miRNK-146a, kako bismo detaljnije ispitali njihovu potencijalnu ulogu u patogenezi SSc i predominantnom ispoljavanju ove bolesti kod osoba ženskog pola. U cilju analize povezanosti genetičke varijante rs3027898 C>A u genu *IRAK1*, kao i genetičke varijante rs2910164 C>G u *miRNK-146a* sa rizikom za nastanak i razvoj SSc sprovedena je studija asocijacije na 102 SSc pacijenta i 66 kontrolnih ispitanika.

#### 5.3.1. Asocijacija genetičke varijante rs3027898 C>A sa rizikom za nastanak SSc

*IRAK1* rs3027898 C>A varijanta nalazi se u 3'-graničnom regionu gena, 68 bp od mesta završetka transkripcije, u blizini mesta vezivanja post-transkripcionog regulatora miRNK-146a. Pokazana je asociranost ove varijante sa nastankom nekih AB. Naime, Song i sar. (Song i sar., 2015) pokazali su povezanost inflamatornog artritisa sa rs3027898 CC genotipom, dok u studiji Yang-a i sar. (Yang i sar., 2017b) na uzorcima RA pacijenata poreklom iz Kine, pokazano je da nosioci *IRAK1* rs3027898 C alela imaju povećani rizik od nastanka RA. Takođe, u grupi SLE pacijenata, Li i sar. pronašli su povećan rizik od nastanka bolesti kod nosioca C alela (Li i sar., 2015).

Rezultati naše asocijativne studije ukazali su da *IRAK1* rs3027898 A alel nije faktor rizika za pojavu SSc kod osoba ženskog pola.

### 5.3.2. Asocijacija genetičke varijante rs2910164 C>G sa rizikom za nastanak SSc

U okviru ovog dela teze, proučavali smo uticaj *miRNK-146a* rs2910164 varijante na predispoziciju za nastanak SSc. Ova varijanta je locirana na poziciji +60 u odnosu na prvi nukleotid u pre-*miRNK-146a* sekvenci, i povezana je sa povećanom verovatnoćom nastanka papilarnog karcinoma štitne žlezde (Jazdzewski i sar., 2008), karcinoma grudi/jajnika (Shen i sar., 2008), hepatocelularnog carcinoma (Xu i sar., 2008), ali i koronarne bolesti srca (Liu i sar., 2017b) i metaboličkog sindroma (Mehanna i sar., 2015). Brojne studije asocijacije fokusirale su se na analizu distribucije *miRNK-146a* rs2910164 varijante u različitim AB, pokušavajući da definišu genotip koji predstavlja faktor rizika za nastanak određene bolesti. Na primer, u studijama Chatzikyriakidou i sar. i Yang i sar., nije detektovana razlika u distribuciji genotipova za ovu varijantu između RA pacijenata i kontrolnih ispitanika, ni u azijskoj ni u kavkaskoj populaciji (Chatzikyriakidou i sar., 2010a; Yang i sar., 2011). Takođe, rezultati Ji-a i sar. (Ji i sar., 2014) ne podržavaju asocijaciju između *miRNK-146a* rs2910164 varijante i predispozicije za SLE. Slični rezultati su dobijeni i u studiji na PsA (Chatzikyriakidou i sar., 2010b). U skladu sa ovim tvrdnjama, naša studija nije pokazala vezu između varijante u *miRNK-146a* i predispozicije za SSc. S druge strane, detektovali smo značajno veću zastupljenost CC genotipa kod SSc pacijenata sa fibrozom pluća i aktivnim oblikom bolesti, sugerišući da nosioci ovog genotipa imaju 10 x više šansi da razviju ove specifične kliničke manifestacije. Stoga, ovaj genotip može biti potencijalni faktor rizika za pojavu ovih specifičnih kliničkih manifestacija i u drugim AB.

### 5.3.3. Uticaj odabranih genetičkih varijanti u genima *IRAK1* i *miRNK-146a* na njihove ekspresione profile

Kako se varijanta rs3027898 u genu *IRAK1* nalazi 3'-UTR gena *IRAK1* u blizini vezivanja *miRNK-146a*, i kako se sumnja da ona može uticati na pravilno savijanje regiona DNK gde je lociran ovaj gen, a samim tim i na afinitet vezivanja ove *miRNK*, analizirali smo da li prisustvo ove varijante utiče na ekspresioni nivo *IRAK1* transkripta. Nije pronađena

nikakva korelacija od značaja između određenog genotipa i detektovanog nivoa *IRAK1* iRNK, što ukazuje da ova varijanta nije ključna za izmenjenu ekspresiju gena *IRAK1*, detektovanu u grupi SSc pacijenata. Na osnovu nalaza naše studije, ali i drugih studija, smatramo da su neophodna dodatna istraživanja koja bi uzela u razmatranje i prisustvo nekih drugih varijanti, kao i međusobne interakcije gena, ali i gena i činioca spoljašnje sredine.

Prisustvo *miRNK-146a* rs2910164 varijante, koja podrazumeva zamenu C>G, u kojoj zapravo dolazi do zamene para C:U u par G:U u okviru stem regiona pre-miRNK-146a sekvence, i promene predviđenog statusa slobodne energije sa -43.1 kcal/mol na -40.3 kcal/mol, može redukovati stabilnost pri-miRNK, efikasnost obrade pri-miRNK u pre-miRNK, stabilnost pre-miRNK i njen transport u citoplazmu, i konačno efikasnost obrade pre-miRNK u zreli miRNK (Dai i sar., 2007; Rehmsmeier i sar., 2004). U studijama Jazdzewski i sar. (Jazdzewski i sar., 2008), i Rehmsmeieru i sar. (Rehmsmeier i sar., 2004), pokazano je da zamena C>G u pre-miRNK-146a rezultira u njenoj smanjenoj efikasnosti obrade u zreli miRNK, što posledično dovodi do smanjenog nivoa ekspresije miRNK-146a. Nasuprot ovome, rezultati studija urađenih od strane Yue-a i sar. (Yue i sar., 2011) i Shen-a i sar. (Shen i sar., 2008), pokazali su da ova varijanta utiče na veću zastupljenost zrele miRNK-146a. Analiza uticaja prisustva *miRNK-146a* rs2910164 varijante na produkciju zrele miRNK-146a u grupi naših ispitanika, pokazala je trend ka smanjenju nivoa ekspresije ove miRNK kod nosioca C alela, u poređenju sa nosiocima GG genotipa. Kako postoji očigledan nedostatak konzistentnosti nalaza, ostaje da se u narednim istraživanjima razjasni kako ova genetička varijanta u pre-miRNK-146a može uticati na količinu zrele miRNK-146a, i stoga doprinositi genetičkoj predispoziciji za SSc.

#### **5.4. Ekspresioni profili gena *JAK2*, *TLR7*, *TLR9*, *IRAK1* i miRNK-146a na lokalnom nivou**

Kod SSc pacijenata u tkivu kože postoji jaka veza između inflamacije i fibroze koja je poduprta povećanom produkcijom kako proinflamatornih tako i profibrotičnih medijatora (Affandi i sar., 2015). U cilju otkrivanja tkivno specifičnih razlika u nivou ekspresije gena,

izvedena je preliminarna analiza ekspresije odabranih gena *JAK2*, *TLR7*, *TLR9* i *IRAK1* kao i nivoa miRNK-146a, u uzorcima tkiva kože SSc pacijenata. Analizirano je tkivo zahvaćeno fibrotičnim promenama i tkivo koje nije pokazivalo znake fibroze poreklom iz istog pacijenta.

TGF- $\beta$  molekul jedan je od centralnih molekula kada se govori o procesu fibroze. TGF- $\beta$  ima stimulatorni efekat aktivirajući signalizaciju posredovanu STAT3 molekulom, koja može indukovati fibrotični odgovor kroz aktivaciju gena asociranih sa fibrozom (Zhang i sar., 2015). Ovaj stimulatorni efekat TGF- $\beta$  na STAT3 nije samo ograničen na fibroblaste u koži i plućima, već je primećen i u drugim ćelijskim tipovima kao što su folikularne T-pomoćničke i hepatične zvezdaste ćelije (Chaudhry i sar., 2009; Xu i sar., 2014). Svi ovi podaci zajedno ukazuju da bi STAT3 mogao delovati kao nekanonični nizvodni medijator TGF- $\beta$  signalizacije i centralni integrator višestrukih profibrotičnih signala (Chakraborty i sar., 2017).

Sa druge strane, JAK2 kao receptor-asocirana tirozin kinaza ima centralnu ulogu u signalnim kaskadama iniciranim citokinima i faktorima rasta i predstavlja jednog od glavnih aktivatora transkripcionog regulatora STAT3 (Valentino i Pierre, 2006). Međutim, Dees i sar. ukazuju na to da je aktivacija JAK2 zavisna i od TGF- $\beta$  i da bi mogla takođe posredovati u stimulatornim efektima ovog medijatora na fibroblaste (Dees i sar., 2012). Stoga, u cilju utvrđivanja da li je JAK2 predstavlja ključni molekul preko koga profibrotični signali konvergraju ka STAT3, urađena je kvantifikaciona analiza relativne ekspresije gena *JAK2* u uzorcima tkiva kože kod 5 SSc pacijenata. Rezultati ekspresionih analiza kod svih ispitanika pokazali su uniformno sniženje ekspresionog nivoa ovog gena u grupi uzoraka tkiva kože zahvaćenog fibrotičnim promenama u odnosu na tkivo kože bez promena poreklom iz istih SSc pacijenata. Relativno sniženje ekspresija gena *JAK2* kretalo se u opsegu od 26% do 41% u zavisnosti od pacijenta, sa prosekom od 32%. Naši preliminarni rezultati ukazuju da promena ekspresije gena *JAK2* nije presudna za transmisiju profibrotičnih signala i razvoj fibroze u tkivu kože. Naši rezultati su donekle u saglasnosti sa rezultatima Dees i sar., koji su pokazali da stimulacija TGF- $\beta$  povećava nivo pJAK2 forme, bez promene u ekspresiji samog gena u dermalnim fibroblastima SSc pacijenata gajenim u kulturi (Dees i sar., 2012).

Smatra se da povećanje nivoa fosforilacije JAK2, a ne nužno ekspresije samog gena, predstavlja jedan od mehanizama delovanja TGF- $\beta$ . Nedavni nalazi Pechkovsky i Pedroza sa sar., ukazali su na povećanu fosforilaciju STAT3 u plućnim fibroblastima kod pacijenata sa idiopatskom plućnom fibrozom (IPF), preko Smad2/3 zavisnog puta, nezavisno od JAK2 (Pechkovsky i sar., 2012; Pedroza i sar., 2016). Iako je JAK2 jedan od glavnih regulatora fosforilacije STAT3, pokazano je da nekoliko drugih kinaza takođe imaju sposobnost da fosforilišu i aktiviraju STAT3 na način nezavistan od JAK2 (Reich i sar., 2012; Skhirtladze i sar., 2008; Wang i sar., 2007). Zapravo, studija Chakraborty i sar. pokazala je i da SRC, c-ABL i JNK kinaze značajno doprinose fosforilacionom statusu STAT3 u fibroblastima gajenim u kulturi. Takođe je pokazano da ove kinaze karakterše hiperaktivnost i da zajedničkim delovanjem mogu doprinostiti aberatnoj aktivaciji STAT3 signalnog puta u fibrozi (Chakraborty i sar., 2017).

Signalni put TLR receptora ima važnu ulogu u promovisanju normalnog procesa zarastanja rana. Izmenjena TLR signalizacija mogla bi doprineti nekontrolisanom i hipertrofičnom procesu zarastanju rana i posledičnom nastanku fibroze (Kluwe i sar., 2009). Istraživanje Trujillo i sar. demonstriralo je da TLR9, može promovisati diferencijaciju plućnih fibroblasta gajenih u kulturi poreklom iz biopsije pluća pacijenata sa IPF u miofibroblaste. Ovi autori ukazuju i na to da bi TLR9 mogao funkcionisati kao i senzor za detekciju patogenih molekula i kao profibrotični signal u veoma progresivnoj IPF (Trujillo i sar., 2010). Naime Meneghin i sar. prijavili su da povećana ekspresija gena *TLR9* u plućnim fibroblastima pokreće *in vitro* diferencijaciju u miofibroblaste u odgovoru na CpG (Meneghin i sar., 2008). Druge studije ukazuju da u prisustvu molekula koji se oslobađaju iz ćelija koje podležu apoptozi ili molekula koje oslobađaju aktivirane makrofage na mestu povrede i/ili zapaljenja može biti dominantan način na koji TLR9 promoviše fibrozu (Gabele i sar., 2008; Watanabe i sar., 2007). Sa druge strane Balmelli i sar. pokazali su da je izmenjena ekspresija gena *TLR7*, ali ne i *TLR9*, odgovorna za proces aktivacije i transformacije fibrocita (Balmelli i sar., 2007).

Stoga, izvedena je relativna kvantifikacija ekspresije gena *TLR7* i *TLR9*, kao i centranog molekula na kome se susstiču ovi signalni putevi, gena *IRAK1* i njegovog post-



transkripcionog regulatora miRNK-146a, na lokalnom nivou kod SSc pacijenata. Rezultati ekspresionih analiza pokazali su snažan trend ka redukciji ekspresije ovih gena u uzorcima bioptiranog tkiva kože sa fibrotičnim promenama u odnosu na uzorke bez vidljivih promena. Ovo sniženje ekspresije gena *TLR7* i *TLR9* detektovano je kod 4/5 SSc pacijenata. U proseku ovo sniženje za gen *TLR7* iznosilo je oko 75% (opseg 49% - 87%), dok je za gen *TLR9* bilo u proseku 63% (opseg 38% - 67%). Povećanje ekspresije kod 1/5 SSc pacijenata bilo je neznatno ~ 3% za gen *TLR7*, odn. ~9% za gen *TLR9* u odnosu na nezahvaćeno tkivo kože istog pacijenta.

Analiza relativnog nivoa gena *IRAK1* i miRNK-146a ukazala je na manju zastupljenost *IRAK1* transkripta i miRNK-146a u uzorima fibrotičnog tkiva kože u odnosu na uzorke kože bez promena kod svih SSc pacijenata. Sniženje ekspresionog nivoa za gen *IRAK1* u proseku iznosilo je 40%, i nalazilo se u opsegu 14% - 58%, dok za miRNK-146a u proseku iznosilo 18% (opseg 2-23%).

Svega nekoliko studija proučavalo je odnos između nivoa miRNK-146a i procesa fibroze. Rezultati koji su dobijeni u okviru ovih istraživanja veoma su kontradiktorni. Naime istraživanje Zhu i sar. pokazalo je da ekspresija miRNK-146a je povećana u dermalnim fibroblastima kože kod SSc pacijenata u odnosu na kontrolne ispitanike, dok su Sakoguchi i sar. pokazali da je nivo ove miRNK korelisao sa pojavom vaskularnih abnormalnosti kod SSc pacijenata, kao što su telangiektazije (Sakoguchi i sar., 2013; Zhu i sar., 2012). Sonkoly i sar. takođe su detektovali značajno veću ekspresiju miRNK-146a u kožnim lezijama pacijenata obolelih od psorijaze, kao dobro poznate fibrotične kožne bolesti, u poređenju sa kožom kontrolnih ispitanika (Sonkoly i sar., 2007). Sa druge strane Morishita i sar. prijavili su ulogu miRNK-146a u inhibiciji bubrežne fibroze suprimiranjem profibrotičnih (TGF- $\beta$ -Smad4) i proinflamatornih (TRAF6-NF-kB) signalnih puteva, sugerišući da miRNK-146a može biti potencijalno nova terapijska opcija za bubrežnu bolest u završnoj fazi (Morishita i sar., 2015). Takođe He i sar. naveli su da je miRNK-146a inhibirala TGF- $\beta$  indukovanu aktivaciju hepatičnih zvezdastih ćelija i time onemogućila razvoj hepatične fibroze kroz direktnu supresiju translacije Smad4 (He i sar., 2012). Smatra se i da je transdiferencijacija humanih dermalnih fibroblasta u miofibroblaste u koži takođe negativno regulisana sa

miRNK-146a, i da ova miRNK obavlja svoju funkciju upravo inhibicijom translacije proteina Smad4, sugerišući da upravo ova miRNK predstavlja kritični modulator TGF- $\beta$  regulisane diferencijacije fibroblasta (Liu i sar., 2012; Zhu i sar., 2012). U studiji Jang i sar. demonstrirano je da, administracijom molekula koji imitiraju miRNK-146a, dolazi do smanjenja produkcije fibronektina, kolagena I i  $\alpha$ SMA indukovanih TGF- $\beta$ , i to mehanizmom koji podrazumeva direktno targetovanje proteina Smad4 i TRAF6. Stoga ovi autori smatraju da miRNK-146a ima ulogu negativnog regulatora sinteze fibrotičnih markera indukovanih TGF- $\beta$ , i da je na taj način uključena u regulaciju fibroze u orbitalnim fibroblastima kod pacijenata sa Gravesovom orbitopatijom (Jang i sar., 2018).

Svi do sada objavljeni podaci dalje ukazuju na to da miRNK molekuli pored toga što su potencijalni izvor dijagnostičkih i prognostičkih biomarkera za fibrotične bolesti, mogu predstavljati i atraktivne ciljne molekule za razvoj novih modaliteta lečenja dizajniranih u cilju sprečavanja daljeg širenja profibrotičnog fenotipa na nezahvaćene delove tela, čime bi se usporilo dalje napredovanje samih bolesti. Kako je naša preliminarna studija ukazala na sniženje ekspresije miRNK-146a, kao negativnog regulatora pojačane TGF- $\beta$  signalizacije uključene u mehanizam nastanka fibroze, u uzorcima kože sa promenama u odnosu na delove kože bez promena kod SSc pacijenata, dodatne studije su potrebne da bi se detaljnije ispitao potencijal analoga miRNK-146a kao potencijalno novog terapijskog pristupa u SSc.

Preliminarna analiza korelacije parova transkripata u uparenim uzorcima kože, ukazala je na moguće izmenjene interakcije između transkripata analiziranih gena. Naime, analiza odnosa transkripata ispitivanih gena u referentnoj grupi uzoraka tkiva kože bez fibrotičnih promena, pokazala je pozitivnu korelaciju između miRNK-146a sa transkriptima gena *TLR9*, *JAK2* i *TLR7*, kao i između transkripata gena *IRAK1* i *JAK2*. Nasuprot ovim opažanjima, korelacioni odnosi u grupi uzoraka tkiva kože zahvaćenog fibrotičnim promenama, zasnivali su se na pozitivnom međusobnom odnosu miRNK-146a sa *JAK2* i *IRAK1* transkriptima koji se nisu opažali u referentnoj grupi.

Ovakvi preliminarni rezultati analize relativne ekspresije odabranih gena i njihovih korelacionih odnosa mogli bi da ukazuju na to su detektovana izmenjena ekspresija

odabranih gena i njihove izmenjene međusobne interakcije uključene u patološki proces zarastanja rana i posledični nastanak fibroze. Buduće studije na većem broju pacijenata su neohodne kako bi pojasnila specifična uloga pojedinačnih komponenti odabranih signalnih puteva i njihove interakcije sa članovima drugih signalnih kaskada u mehanizmu nastanka i/ili napredovanja fibroze i ispitao potencijal ovih molekula kao novih, validnih biomarkera koji bi omogućili pouzdanije i ranije uspostavljanje dijagnoze, bolju procenu aktivnosti i toka bolesti i prognozu samog preživaljavanja pacijenata i finalnog ishoda.

### 5.5. Mezenhimske matične ćelije poreklom iz masnog tkiva

Primena MMĆ u regenerativnoj medicini koštano-mišićnog sistema, izuzetno je atraktivna iz razloga što ove ćelije, pored toga što vrše zamenu oštećenih ili izgubljenih ćelija svojom proliferacijom i diferencijacijom, imaju i imunomodulatorna svojstva, suprimirajući lokalne zapaljenske reakcije i promovišući vaskularizaciju. Stoga, upotreba aMMĆ, jedan je od potencijalno novih terapijskih pristupa u lečenju artritisa malih zglobova prisutnih kod velikog broja SSc pacijenata, u cilju olakšavanja simptoma i poboljšanja kvaliteta njihovog života.

#### 5.5.1. Fenotipska karakterizacije MMĆ poreklom iz masnog tkiva

Nakon izolacije aMMĆ, urađena je njihova fenotipska karakterizacija. Utvrđeno je da one imaju oblik sličan fibroblastima i sposobnost adhezije za zidove suda u kojem se gaje. Imunofenotipizacija aMMĆ protočnom citofluorimetrijom pokazala je da su površinski markeri karakteristični za mezenhimske ćelije, CD70, CD93 i CD105 prisutni na više od 82.7%, 92.7% i 96.5% ćelija u populaciji, dok su leukocitni i hematopoetski marker, CD34 i CD45, bili eksprimirani svega na manje od 1.3% i 1.2% ćelija. Ovi rezultati su u skladu sa literaturom u kojoj se navodi da je za relativno čistu i homogenu populaciju aMMĆ neophodno detektovati CD73, 90 i 105  $\geq$  85%, a CD34 i 45 na svega  $\leq$  2-3% ćelija u ispitivanoj populaciji

(Camilleri i sar., 2016). Takođe pokazana je i multipotentnost ovih ćelija, njihovom *in vitro* diferencijacijom u hondrocite i osteoblaste u prisustvu medijuma sa indukujućim faktorima, čime su zadovoljeni svi preporučeni kriterijumi za potvrdu fenotipa ovih ćelija.

#### 5.5.2. Uticaj dužine gajenja aMMĆ u kulturi na njihovu potentnost i sposobnost hondrogene diferencijacije

Zbog svoje sposobnosti samoobnavljanja i diferencijacije u različite ćelijske tipove, matične ćelije se smatraju obećavajućim izvorima novih terapijskih pristupa u oblasti regenerativne medicine koja se veoma brzo razvija. Međutim, kako zbog male zastupljenosti, tako i zbog visoke heterogenosti tek izolovanih MMĆ, neophodna je *in vitro* propagacija ovih ćelija u cilju dobijanja adekvatnog broja ćelija za potrebe kliničke prakse. Poznato je da se ove ćelije dele na 26-30h, kao i da mogu da opstanu u kulturi i više od 20 pasaža (Izadpanah i sar., 2008). Dugotrajna kultivacija ćelija u laboratorijskim uslovima može biti praćena njihovim starenjem koje potencijalno utiče na karakteristike i funkcionalnost MMĆ (Baxter i sar., 2004). Starenje ćelija u *in vitro* uslovima obično podrazumeva, što se morfološkog aspekta tiče, postepeni gubitak uniformnog, tipičnog vretenastog oblika sličnog fibroblastima i porast dimenzija samih ćelija, koje na kraju formiraju morfološki nehomogenu i rasutu populaciju ćelija (Tsai i sar., 2012). Pokazano je da se tokom kultivacije ćelija menja njihov proliferativni kapacitet, sposobnost za formiranje kolonija i njihov diferencioni potencijal (Chen i sar., 2015; Gruber i sar., 2012). Takođe, Yang i sar. pokazali su da adipogeni potencijal ovih ćelija tokom starenja ostaje bolje očuvan u odnosu na njihov osteogeni potencijal koji je značajno narušen senescencijom. Za osteogenu indukciju, navode autori da bi svakako trebalo uzeti u razmatranje MMĆ iz ranijih pasaža (Yang i sar., 2018).

Iz navedenih razloga važno je pronaći adekvatne molekularne markere koji bi bili dobri pokazatelji statusa ovih ćelija u određenom pasažu i koji bi jasno određivali njihov potencijal za hondrogenu diferencijaciju. Time bi se, na najbolji način, ove ćelije okarakterisale i bile upotrebljene za treman obolelih u momentu njihove maksimalne efikasnosti.

### 5.5.2.1. Ekspresioni profil gena *OCT4* i *NANOG* tokom *in vitro* propagacije aMMĆ

Razumevanje molekularnih mehanizama uključenih u održavanje karakteristika matičnih ćelija, kao što je sposobnost samoobnavljanja, omogućilo bi još veći napredak u primeni ovih ćelija kao terapeutika. Geni matičnosti, *OCT4* i *NANOG*, zajedno sa genom *SOX2* (eng. *SRY-related HMG-box genes*, *SOX2*) čine glavnu regulatornu mrežu koja suprimira ekspresiju gena asociiranih sa diferencijacijom, čime se održava pluripotentnost ovih ćelija i njihovo nediferencirano stanje. Naime Tsai i sar., pokazali su da supresijom gena *OCT4* i *NANOG* dolazi do smanjenja proliferativnog kapaciteta i potencijala za osteogenu, adipogenu i hondrogenu diferencijaciju. Takođe dolazi do povećanja ekspresije tkivno specifičnih gena, koja vodi spontanoj diferencijaciji i gubitku nediferenciranog stanja ovih ćelija (Tsai i sar., 2012). Svi ovi podaci zajedno ukazuju na funkcionalnu ulogu gena *OCT4* i *NANOG* u održavanju osobina matičnih ćelija, koja se ostvaruje kroz regulaciju ekspresije ciljnih gena bilo direktnim kooperativnim vezivanjem za njihov promotor (Boyer i sar., 2005) ili indirektnom kontrolom njihove ekspresije preko regulacije ekspresije gena *DNMT1* (eng. *DNA Methyltransferase 1*, *DNMT1*) (Tsai i sar., 2012).

Međutim veoma malo se zna kako se menja ekspresija ovih gena sa propagacijom ćelija u kulturi i kakav uticaj ima na njihovu potentnost. Stoga su aMMĆ poreklom iz masnog tkiva 4 ispitanika gajene u *in vitro* uslovima, a ekspresioni profil odabranih gena markera matičnosti određivan je u 3. i 6. pasažu. Odabrani pasaži odslikavaju stanje ćelija u tzv. ranom i kasnom pasažu, i izabrani su kao relevantni za praćenje promena stanja ćelija koje za to vreme prođu još 3-4 ćelijske deobe. Dobijeni rezultati su ukazali na postojanje razlika u ekspresionim profilima odabranih gena u aMMĆ poreklom iz različitih donora. Naime, kod 2/4 pacijenta detektovano je sniženje ekspresije gena markera matičnosti sa dužom propagacijom ćelija u kulturi. Kod druga dva pacijenta, sa ekspanzijom ćelija u kulturi dolazi do povećanja ekspresije gena *NANOG*, bez promene u ekspresiji gena *OCT4*. Ovakvi rezultati ukazuju na međusobne razlike u osobinama matičnih ćelija poreklom iz različitih pacijenata, kao i da se njihova potentnost menja tokom produžene kultivacije. Praćenje ekspresije ovih gena u kombinaciji sa markerima za hondrogenu diferencijaciju mogu da

pruže informacije o pasažu koji bi bio najadekvatniji za primenu ovih ćelija u terapijske svrhe, u cilju povećanja efikasnosti lečenja artritisa malih zglobova kod SSc pacijenata.

#### 5.5.2.2. Ekspresioni profil gena *SOX5*, *SOX6*, *SOX9* i *COL1A1* tokom *in vitro* diferencijacije aMMĆ u hondroците

Uprkos rastućem znanju i upotrebi aMMĆ u ćelijskoj terapiji, veoma malo se zna kako produženo gajenje ovih ćelija u laboratorijskim uslovima utiče na njihovu sposobnost za hondrogenu diferencijaciju i potencijal za regeneraciju hrskavice. Poznato je da geni *SOX5*, *SOX6* i *SOX9*, kao i gen *COL1A1* učestvuju u najranijim fazama hondrogene diferencijacije.

Sam proces hondrogeneze sastoji se iz nekoliko faza. Prva faza podrazumeva kondenzaciju MMĆ i njihovu diferencijaciju u hondroprogenitore. U ovoj fazi, MMĆ počinju da eksprimiraju gen *SOX9*, koji ostaje aktivan sve do hipertrofičnog stadijuma. *SOX9*, kao transkripcioni regulator, neophodan je za početne procese hondrogeneze i učestvuje u regulaciji ekspresije gena *COL1A1* i *COL2A1* (eng. *Collagen type II alpha 1 chain*, *COL2A1*) (Alshammari i sar., 2015). Druga faza obuhvata diferencijaciju hondroprogenitora u hondroците. U ovoj fazi *SOX9* stimuliše ekspresiju gena *SOX5* i *SOX6*, čiji produkti, takođe transkripcioni regulatori, formiraju homo- i heterodimere, ulazeći u sastav transkripcionog kompleksa zajedno sa *SOX9* (Akiyama i sar., 2002; Lefebvre i sar., 1998). Ovaj kompleks podstiče ekspresiju gena za *COL2*, *COL9*, *COL11*, agrekana i različitih adhezivnih molekula, istovremeno inhibirajući procese mineralizacije i vaskularizacije VĆM hrskavice. Treća faza podrazumeva fazu proliferacije hondrocita, u kojoj se uočava povećana ekspresija gena *SOX5* i *SOX6*, ali istovremeno i inhibicija ekspresije gena *SOX9* (Smits i sar., 2001). Četvrtu fazu, fazu hipertrofije hondrocita karakteriše se pojačanom sintezom komponenti VĆM hrskavice i adhezivnih molekula.

Proučavanje ekspresije izabranih gena markera hondrogeneze tokom propagacije aMMĆ u ćelijskoj kulturi, moglo bi da pruži odgovor na pitanje da li se potencijal ovih ćelija

da daju funkcionalne hondroците menja sa povećanjem broja ćelijskih deoba, i da li postoje međusobne razlike u potencijalu za regeneraciju hrskavice između različitih pacijenata.

Za potrebe ovih analiza, aMMĆ poreklom iz 4 pacijenta su prikupljene u ranom i kasnom pasažu, i gajene u medijumu koji podstiče hondrogenu diferencijaciju u trajanju od tri nedelje. Ćelije su formirale 3D sferoidne kulture i imale su sposobnost da sintetišu i ekskretuju komponente VCM hrskavice, na prvom mestu sulfatizovane glikozaminoglikane, čije prisustvo se detektuje specifičnim bojenjem.

Kvantifikacija ekspresije gena *SOX9* u aMMĆ, nije pokazala očekivani trend ka redukciji ekspresije kod svih ispitivanih pacijenata. Stoga, ovaj gen, kao najraniji marker hondrogeneze, nije se pokazao kao stabilan marker za praćenje procesa hondrogene diferencijacije, tokom produžene *in vitro* propagacije ovih ćelija u laboratorijskim uslovima.

Poređenjem ekspresionih profila gena *SOX5*, *SOX6* i *COL1A1* tokom diferencijacije aMMĆ u hondroците, dobija se trend ka povećanju ekspresije za sve analizirane gene za oba analizirana pasaža, ukazujući takođe da ekspresioni nivoi ovih gena predstavljaju validne markere uspešnosti hondrogene diferencijacije. Utvrđivanjem finih razlika u ekspresionim nivoima analiziranih gena pre i nakon hondrogene diferencijacije, dobija se uvid u međusobne razlike aMMĆ poreklom iz različitih pacijenata. Naime kod 2/4 pacijenta, kasni pasaž se pokazao potentniji za diferencijaciju u hondroците, obzirom da je povećanje ekspresije u 6. pasažu bilo izraženije, dok kod jednog pacijenta kao potentniji pokazao se rani pasaž. Takođe, kod jednog od analiziranih pacijenata nije postojala razlika između ranog i kasnog pasaža u ekspresiji ispitivanih gena.

Dobijeni rezultati ukazuju da ekspresioni profil gena *SOX9*, iako je najraniji marker hondrogeneze, nije pouzdan marker za određivanje potencijala aMMĆ gajenih u kulturi za reparaciju hrskavice. Ekspresioni nivoi gena *SOX5*, *SOX6* i *COL1A1* pokazali su se kao daleko informativniji, tako da ih možemo smatrati i za potencijalne prognostičke parametre efikasnosti terapije. Naime, merenjem ekspresionih profila ovih gena zajedno sa genima matičnosti, može se dobiti podatak o tome u kom pasažu bi ćelije ispoljile svoju maksimalnu

terapijsku efikasnost za svakog pacijenta posebno, čime bi se doprinelo optimizaciji ovog već peronalizovanog terapijskog pristupa.



## **6. ZAKLJUČCI**

1. Na osnovu dobijenih rezultata ekspresionih analiza izabranih gena na sistemskom nivou kod pacijenata sa sistemskom sklerozom (SSc) moguće je izvesti sledeće zaključke:

a) Povišena ekspresija gena *IL6* detektovana kod SSc pacijenata, može se smatrati potencijalnim markerom za bolju stratifikaciju obolelih, usled asociranosti sa kasnim oblikom ove bolesti.

b) Izmerena snižena ekspresija gena *JAK2* može predstavljati potencijalno nepovoljan prognostički faktor za SSc, naročito kod pacijenata muškog pola.

c) Nije potvrđena veza između ekspresije gena *STAT3* i predispozicije za razvoj SSc.

d) Relativna kvantifikacija gena *TLR7* pokazala je da povišena ekspresija ovog gena kod obolelih predstavlja nepovoljan prognostički faktor, ali istovremeno i marker koji bi omogućio bolju stratifikaciju pacijenata, jer je povećana ekspresija ovog gena asocirana sa povećanim rizikom od pojave aktivne i kasne forme bolesti, kao i digitalnih ulcera u grupi SSc pacijenata.

e) Detektovani snižen ekspresioni nivo gena *TLR9* kod SSc pacijenata, predstavljao bi potencijalno nepovoljan prognostički faktor za SSc.

f) Rezultati ekspresionih analiza ukazali su da sniženi ekspresioni nivo gena *IRAK1* predstavlja nepovoljan prognostički faktor, usled asociranosti sa težom kliničkom slikom u pogledu zahvaćenosti kože fibrotičnim promenama i prisustvom ATA kod SSc pacijenata. Pored toga što može predstavljati potencijalno novi biomarker za SSc, izmenjena ekspresija ovog gena omogućava i bolju klasifikaciju pacijenata. Takođe ekspresija gena *IRAK1* kod SSc pacijenata muškog pola bila je niža u odnosu na pacijente ženskog pola, ukazujući da ova polno zavisna ekspresija potencijalno može biti uključena u mehanizam predominantnog ispoljavanja SSc kod osoba ženskog pola.

g) Sniženi ekspresioni nivo miRNK-146a može se smatrati potencijalno nepovoljnim prognostičkim faktorom za SSc, naročito za pacijente ženskog pola. Takođe, merenjem ekspresije ove miRNK može se omogućiti bolja stratifikacija pacijenata, jer je sniženi ekspresioni nivo bio asociiran sa SSc pacijentima koje je karakterisala umerena zahvaćenost kože fibrotičnim promenama.

h) Korelacione analize gena na sistemskom nivou ukazale su da pored nekih očuvanih interakcija, kao što je pozitivan odnos između *JAK2* i *IRAK1* transkripta, postoje i izmenjene interakcije između transkripata analiziranih gena u grupi SSc pacijenata. Na prvom mestu, to se odnosi na pojavu dve jake negativne korelacije *JAK2* i *IRAK1* transkripta sa miRNK-146a koje nisu postojale u kontrolnoj grupi uzoraka. Štaviše, koralaciona analiza nivoa ekspresije gena *IRAK1* i miRNK-146a u grupi pacijenata obolelih od SSc ukazala je da je zastupljenost *IRAK1* iRNK značajno regulisana ovom miRNK. Ovi rezultati ukazuju na to da su izmenjena ekspresija analiziranih gena i njihove narušene međusobne interakcije uključene u mehanizam nastanka i održavanja procesa inflamacije na sistemskom nivou u SSc.

2. Na osnovu dobijenih rezultata asocijativne studije odabranih genetičkih varijati sa SSc moguće je izvesti sledeće zaključke:

a) Studija asocijacije varijante *IRAK1* rs3027898 sa SSc kod pacijenata ženskog pola, nije pokazala značajnu asocijaciju sa rizikom za razvoj i progresiju SSc.

b) Studija asocijacije varijante *miRNK-146a* rs2910164 sa rizikom od SSc, ukazala je da ova varijanta nije faktor predispozicije za SSc, ali je faktor rizika za razvoj aktivnog oblika bolesti i fibroze pluća kod SSc pacijenata.

3. Na osnovu dobijenih rezultata ekspresionih analiza izabranih gena kod pacijenata sa SSc na lokalnom nivou moguće je izvesti sledeće zaključke:

a) Preliminarna analiza relativnih ekspresija gena *JAK2*, *TLR7*, *TLR9*, *IRAK1* i miRNK-146a u uzorcima biopsije kože SSc pacijenata pokazala je snažan trend ka redukciji ekspresije svih ispitivanih gena u grupi uzoraka tkiva kože sa fibrotičnim promenama u odnosu na one bez promena. Ovakvi rezultati ukazuju na to da je izmenjena ekspresija odabranih gena uključena u nastanak fibroze, najverovatnije kroz istu signalnu kaskadu koja je uključena u proces zarastanja rana.

b) Preliminarna analiza korelacije parova transkripata analiziranih gena, ukazala je na moguće izmenjene interakcije između transkripata u uzorcima tkiva kože sa fibrotičnim promenama u odnosu na tkivo kože bez promena. Ovakvi preliminarni rezultati impliciraju da bi izmenjena ekspresija analiziranih gena i njihove izmenjene međusobne interakcije na lokalnom nivou mogle doprinositi procesu nastanka i održavanja fibroze. Međutim za utvrđivanje tačnog doprinosa izmenjenih korelacija u patofiziološkom mehanizmu procesa fibroze, neophodne su dodatne studije na većem broju uzoraka.

4. Na osnovu dobijenih rezultata fenotipske karakterizacije mezenhimskih matičnih ćelija poreklom iz adipoznog tkiva (aMMĆ) i analize uticaja dužine gajenja aMMĆ u kulturi na njihovu potentnost i sposobnost hondrogene diferencijacije, moguće je izvesti sledeće zaključke:

a) Morfološkom i fenotipskom karakterizacijom MMĆ poreklom iz masnog tkiva pacijenata, uočili smo ćelije oblika sličnog fibroblastima, sa sposobnošću adhezije za zidove suda, i dokazali multipotentni potencijal ovih ćelija, njihovom *in vitro* diferencijacijom u hondrocite i osteoblaste. Imunofenotipizacija je pokazala prisustvo specifičnih mezenhimskih, a odsustvo leukocitnih i hematopoetskih površinskih markera, čime su zadovoljeni svi preporučeni kriterijumi za potvrdu fenotipa ovih ćelija.

b) Merenjem ekspresije gena markera matičnosti, *OCT4* i *NANOG*, u ranom i kasnom pasažu aMMĆ tokom njihove *in vitro* propagacije u kulturi, dobijene su informacije da se potentnost aMMĆ menja sa dužinom gajenja individualno, kod svakog pacijenta pojedinačno. Tako se stiče uvid u međusobne razlike u sposobnosti samoobnove matičnih ćelija poreklom iz različitih pacijenata.

c) Analiza ekspresije gena ključnih za ranu fazu hondrogeneze jasno je pokazala da potencijal matičnih ćelija ostaje očuvan i u kasnim pasažima. Štaviše, kvantifikaciona analiza relativnih ekspresija gena u aMMĆ, tokom hondrogene diferencijacije u *in vitro* uslovima, pokazala je da su ekspresioni nivoi gena *SOX5*, *SOX6* i *COL1A1* potencijalni prognostički markeri efikasnosti hondrogene diferencijacije.

d) Merenjem ekspresionih profila odabranih gena markera hondrogeneze zajedno sa genima matičnosti, uz dodatna istraživanja, mogao bi se dobiti podatak o tome u kom pasažu bi ćelije ispoljile svoju maksimalnu terapijsku efikasnost za svakog pacijenta posebno, čime bi se doprinelo optimizaciji i individualizaciji ovog peronalizovanog terapijskog pristupa.

# **7. SPISAK LITERATURE**

Abe, R, Donnelly SC, Peng T et al. (2001). Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. *J Immunol* 166(12): 7556-62.

Abraham, DJ, Eckes B, Rajkumar V et al. (2007). New developments in fibroblast and myofibroblast biology: implications for fibrosis and scleroderma. *Curr Rheumatol Rep* 9(2): 136-43.

Abraham, DJ and Varga J (2005). Scleroderma: from cell and molecular mechanisms to disease models. *Trends Immunol* 26(11): 587-95.

Affandi, AJ, Radstake TR and Marut W (2015). Update on biomarkers in systemic sclerosis: tools for diagnosis and treatment. *Semin Immunopathol* 37(5): 475-87.

Akimoto, S, Hayashi H and Ishikawa H (1992). Disaccharide analysis of the skin glycosaminoglycans in systemic sclerosis. *Br J Dermatol* 126(1): 29-34.

Akiyama, H, Chaboissier MC, Martin JF et al. (2002). The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev* 16(21): 2813-28.

Alshammari, A, Salman M and Umran M (2015). IN VITRO Effect of Differentiation Factors on Accumulation of COL1A1, COL2A1 and CRTAC1 for Chondrogenesis of Mice Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *International Journal of Research Studies in Biosciences* 3(4): 45-56.

Arcaroli, J, Silva E, Maloney JP et al. (2006). Variant IRAK-1 haplotype is associated with increased nuclear factor-kappaB activation and worse outcomes in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 173(12): 1335-41.

Atreya, R, Mudter J, Finotto S et al. (2000). Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat Med* 6(5): 583-8.

Attisano, L and Wrana JL (2002). Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science* 296(5573): 1646-7.

Au, K, Mayes MD, Maranian P et al. (2010). Course of dermal ulcers and musculoskeletal involvement in systemic sclerosis patients in the scleroderma lung study. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 62(12): 1772-8.

Au, K, Singh MK, Bodukam V et al. (2011). Atherosclerosis in systemic sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Arthritis Rheum* 63(7): 2078-90.

Avouac, J, Clements PJ, Khanna D et al. (2012). Articular involvement in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 51(8): 1347-56.

Avouac, J, Mogavero G, Guerini H et al. (2011). Predictive factors of hand radiographic lesions in systemic sclerosis: a prospective study. *Ann Rheum Dis* 70(4): 630-3.

Avouac, J, Walker U, Tyndall A et al. (2010). Characteristics of joint involvement and relationships with systemic inflammation in systemic sclerosis: results from the EULAR Scleroderma Trial and Research Group (EUSTAR) database. *J Rheumatol* 37(7): 1488-501.

Baechler, EC, Batliwalla FM, Karypis G et al. (2003). Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(5): 2610-5.

Balasubramanyam, M, Aravind S, Gokulakrishnan K et al. (2011). Impaired miR-146a expression links subclinical inflammation and insulin resistance in Type 2 diabetes. *Mol Cell Biochem* 351(1-2): 197-205.

Baldwin, AS, Jr. (1996). The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 14: 649-83.

Balint, Z, Farkas H, Farkas N et al. (2014). A three-year follow-up study of the development of joint contractures in 131 patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 32(6 Suppl 86): S-68-74.

Balmelli, C, Alves MP, Steiner E et al. (2007). Responsiveness of fibrocytes to toll-like receptor danger signals. *Immunobiology* 212(9-10): 693-9.

Baluchamy, S, Sankar N, Navaraj A et al. (2007). Relationship between E1A binding to cellular proteins, c-myc activation and S-phase induction. *Oncogene* 26(5): 781-7.

Banchereau, J and Pascual V (2006). Type I interferon in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *Immunity* 25(3): 383-92.



Barnes, TC, Anderson ME and Moots RJ (2011). The many faces of interleukin-6: the role of IL-6 in inflammation, vasculopathy, and fibrosis in systemic sclerosis. *Int J Rheumatol* 2011: 721608.

Barrat, FJ, Meeker T, Gregorio J et al. (2005). Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 202(8): 1131-9.

Barrett, JC, Hansoul S, Nicolae DL et al. (2008). Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet* 40(8): 955-62.

Bartel, DP (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116(2): 281-97.

Basseres, DS and Baldwin AS (2006). Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression. *Oncogene* 25(51): 6817-30.

Bataller, R and Brenner DA (2005). Liver fibrosis. *J Clin Invest* 115(2): 209-18.

Baum, J and Duffy HS (2011). Fibroblasts and myofibroblasts: what are we talking about? *J Cardiovasc Pharmacol* 57(4): 376-9.

Baxter, MA, Wynn RF, Jowitt SN et al. (2004). Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. *Stem Cells* 22(5): 675-82.

Begon, E, Michel L, Flageul B et al. (2007). Expression, subcellular localization and cytokinic modulation of Toll-like receptors (TLRs) in normal human keratinocytes: TLR2 up-regulation in psoriatic skin. *Eur J Dermatol* 17(6): 497-506.

Benjamini, Y and Hochberg Y (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 57(1): 289-300.

Bhattacharyya, S, Wei J and Varga J (2011). Understanding fibrosis in systemic sclerosis: shifting paradigms, emerging opportunities. *Nat Rev Rheumatol* 8(1): 42-54.

Birmingham, E, Niebur GL, McHugh PE et al. (2012). Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche. *Eur Cell Mater* 23: 13-27.

Blasius, AL and Beutler B (2010a). Intracellular toll-like receptors. *Immunity* 32(3): 305-15.

Blasius, AL and Beutler B (2010b). Intracellular toll-like receptors. *Immunity* 32(3): 305-15.

Bogunia-Kubik, K, Wysoczanska B, Piatek D et al. (2016). Significance of Polymorphism and Expression of miR-146a and NFkB1 Genetic Variants in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 64(Suppl 1): 131-6.

Boule, MW, Broughton C, Mackay F et al. (2004). Toll-like receptor 9-dependent and -independent dendritic cell activation by chromatin-immunoglobulin G complexes. *J Exp Med* 199(12): 1631-40.

Boyer, LA, Lee TI, Cole MF et al. (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 122(6): 947-56.

Brajuskovic, G (2012). Molekularna biologija 2. *Savremena Administracija*, Beograd.  
Bucala, R, Spiegel LA, Chesney J et al. (1994). Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med* 1(1): 71-81.

Budczies, J, Klauschen F, Sinn BV et al. (2012). Cutoff Finder: a comprehensive and straightforward Web application enabling rapid biomarker cutoff optimization. *PLoS One* 7(12): e51862.

Camilleri, ET, Gustafson MP, Dudakovic A et al. (2016). Identification and validation of multiple cell surface markers of clinical-grade adipose-derived mesenchymal stromal cells as novel release criteria for good manufacturing practice-compliant production. *Stem Cell Res Ther* 7(1): 107.

Cao, Z, Xiong J, Takeuchi M et al. (1996). TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* 383(6599): 443-6.

Caplan, AI (2015). Adult Mesenchymal Stem Cells: When, Where, and How. *Stem Cells Int* 2015: 628767.

Castro, SV and Jimenez SA (2010). Biomarkers in systemic sclerosis. *Biomark Med* 4(1): 133-47.

Celhar, T and Fairhurst AM (2014). Toll-like receptors in systemic lupus erythematosus: potential for personalized treatment. *Front Pharmacol* 5: 265.

Chakraborty, D, Sumova B, Mallano T et al. (2017). Activation of STAT3 integrates common profibrotic pathways to promote fibroblast activation and tissue fibrosis. *Nat Commun* 8(1): 1130.

Chatzikyriakidou, A, Voulgari PV, Georgiou I et al. (2010a). A polymorphism in the 3'-UTR of interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK1), a target gene of miR-146a, is associated with rheumatoid arthritis susceptibility. *Joint Bone Spine* 77(5): 411-3.

Chatzikyriakidou, A, Voulgari PV, Georgiou I et al. (2010b). The role of microRNA-146a (miR-146a) and its target IL-1R-associated kinase (IRAK1) in psoriatic arthritis susceptibility. *Scand J Immunol* 71(5): 382-5.

Chatzikyriakidou, A, Voulgari PV, Georgiou I et al. (2012). miRNAs and related polymorphisms in rheumatoid arthritis susceptibility. *Autoimmun Rev* 11(9): 636-41.

Chaudhry, A, Rudra D, Treuting P et al. (2009). CD4+ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner. *Science* 326(5955): 986-91.

Chauhan, SK, Singh VV, Rai R et al. (2013). Distinct autoantibody profiles in systemic lupus erythematosus patients are selectively associated with TLR7 and TLR9 upregulation. *J Clin Immunol* 33(5): 954-64.

Chen, JY, Mou XZ, Du XC et al. (2015). Comparative analysis of biological characteristics of adult mesenchymal stem cells with different tissue origins. *Asian Pac J Trop Med* 8(9): 739-46.

Chen, K, See A and Shumack S (2003). Epidemiology and pathogenesis of scleroderma. *Australas J Dermatol* 44(1): 1-9.

Cheng, Y, Ji R, Yue J et al. (2007). MicroRNAs are aberrantly expressed in hypertrophic heart: do they play a role in cardiac hypertrophy? *Am J Pathol* 170(6): 1831-40.

Chiang, EY, Yu X and Grogan JL (2011). Immune complex-mediated cell activation from systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients elaborate different requirements for IRAK1/4 kinase activity across human cell types. *J Immunol* 186(2): 1279-88.

Chiffлот, H, Fautrel B, Sordet C et al. (2008). Incidence and prevalence of systemic sclerosis: a systematic literature review. *Semin Arthritis Rheum* 37(4): 223-35.

Chin, LJ, Ratner E, Leng S et al. (2008). A SNP in a let-7 microRNA complementary site in the KRAS 3' untranslated region increases non-small cell lung cancer risk. *Cancer Res* 68(20): 8535-40.

Cho, JH and Gregersen PK (2011). Genomics and the multifactorial nature of human autoimmune disease. *N Engl J Med* 365(17): 1612-23.

Chomczynski, P and Sacchi N (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc* 1(2): 581-5.

Christmann, RB, Hayes E, Pendergrass S et al. (2011). Interferon and alternative activation of monocyte/macrophages in systemic sclerosis-associated pulmonary arterial hypertension. *Arthritis Rheum* 63(6): 1718-28.

Ciechomska, M, Cant R, Finnigan J et al. (2013a). Role of toll-like receptors in systemic sclerosis. *Expert Rev Mol Med* 15: e9.

Ciechomska, M, Cant R, Finnigan J et al. (2013b). Role of toll-like receptors in systemic sclerosis. *Expert Rev Mol Med* 15: e9.

Clancy, RM, Alvarez D, Komissarova E et al. (2010). Ro60-associated single-stranded RNA links inflammation with fetal cardiac fibrosis via ligation of TLRs: a novel pathway to autoimmune-associated heart block. *J Immunol* 184(4): 2148-55.

Clark, JP, Munson KW, Gu JW et al. (2008). Performance of a single assay for both type III and type VI TMPRSS2:ERG fusions in noninvasive prediction of prostate biopsy outcome. *Clin Chem* 54(12): 2007-17.

Clements, PJ, Hurwitz EL, Wong WK et al. (2000). Skin thickness score as a predictor and correlate of outcome in systemic sclerosis: high-dose versus low-dose penicillamine trial. *Arthritis Rheum* 43(11): 2445-54.

Crincoli, V, Fatone L, Fanelli M et al. (2016). Orofacial Manifestations and Temporomandibular Disorders of Systemic Scleroderma: An Observational Study. *Int J Mol Sci* 17(7).

Curtale, G, Citarella F, Carissimi C et al. (2010). An emerging player in the adaptive immune response: microRNA-146a is a modulator of IL-2 expression and activation-induced cell death in T lymphocytes. *Blood* 115(2): 265-73.

Czirjak, L, Foeldvari I and Muller-Ladner U (2008). Skin involvement in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 47 Suppl 5: v44-5.

Dai, Y, Huang YS, Tang M et al. (2007). Microarray analysis of microRNA expression in peripheral blood cells of systemic lupus erythematosus patients. *Lupus* 16(12): 939-46.

Dale, E, Davis M and Faustman DL (2006). A role for transcription factor NF-kappaB in autoimmunity: possible interactions of genes, sex, and the immune response. *Adv Physiol Educ* 30(4): 152-8.

De Langhe, E and Lories R (2015). Fibrogenesis, novel lessons from animal models. *Semin Immunopathol* 37(5): 565-74.

Dees, C, Tomcik M, Palumbo-Zerr K et al. (2012). JAK-2 as a novel mediator of the profibrotic effects of transforming growth factor beta in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 64(9): 3006-15.

Deng, Y, Zhao J, Sakurai D et al. (2013). MicroRNA-3148 modulates allelic expression of toll-like receptor 7 variant associated with systemic lupus erythematosus. *PLoS Genet* 9(2): e1003336.

Denton, CP and Black CM (2005). Targeted therapy comes of age in scleroderma. *Trends Immunol* 26(11): 596-602.

Derkow, K, Bauer JM, Hecker M et al. (2013). Multiple sclerosis: modulation of toll-like receptor (TLR) expression by interferon-beta includes upregulation of TLR7 in plasmacytoid dendritic cells. *PLoS One* 8(8): e70626.

Deswal, A and Follansbee WP (1996). Cardiac involvement in scleroderma. *Rheum Dis Clin North Am* 22(4): 841-60.

Diebold, SS, Kaisho T, Hemmi H et al. (2004). Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303(5663): 1529-31.

Doench, JG and Sharp PA (2004). Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev* 18(5): 504-11.

Dominici, M, Le Blanc K, Mueller I et al. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8(4): 315-7.

Duan, R, Pak C and Jin P (2007). Single nucleotide polymorphism associated with mature miR-125a alters the processing of pri-miRNA. *Hum Mol Genet* 16(9): 1124-31.

Duncan, MR and Berman B (1991). Stimulation of collagen and glycosaminoglycan production in cultured human adult dermal fibroblasts by recombinant human interleukin 6. *J Invest Dermatol* 97(4): 686-92.

Dunne, A and O'Neill LA (2003). The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci STKE* 2003(171): re3.

Eisenberg, I, Eran A, Nishino I et al. (2007). Distinctive patterns of microRNA expression in primary muscular disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(43): 17016-21.

Eloranta, ML, Franck-Larsson K, Lovgren T et al. (2010). Type I interferon system activation and association with disease manifestations in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 69(7): 1396-402.

Farh, KK, Marson A, Zhu J et al. (2015). Genetic and epigenetic fine mapping of causal autoimmune disease variants. *Nature* 518(7539): 337-43.

Fenoglio, C, Cantoni C, De Riz M et al. (2011). Expression and genetic analysis of miRNAs involved in CD4+ cell activation in patients with multiple sclerosis. *Neurosci Lett* 504(1): 9-12.

Filipowicz, W, Bhattacharyya SN and Sonenberg N (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 9(2): 102-14.

Fischer, P and Hilfiker-Kleiner D (2007). Survival pathways in hypertrophy and heart failure: the gp130-STAT axis. *Basic Res Cardiol* 102(5): 393-411.

Fleischmajer, R, Gay S, Meigel WN et al. (1978). Collagen in the cellular and fibrotic stages of scleroderma. *Arthritis Rheum* 21(4): 418-28.

Fullard, N and O'Reilly S (2015). Role of innate immune system in systemic sclerosis. *Semin Immunopathol* 37(5): 511-7.

Gabbiani, G (2003). The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol* 200(4): 500-3.

Gabele, E, Muhlbauer M, Dorn C et al. (2008). Role of TLR9 in hepatic stellate cells and experimental liver fibrosis. *Biochem Biophys Res Commun* 376(2): 271-6.

Gabrielli, A, Avvedimento EV and Krieg T (2009). Scleroderma. *N Engl J Med* 360(19): 1989-2003.

Garcia-Romo, GS, Caielli S, Vega B et al. (2011). Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med* 3(73): 73ra20.

Generini, S, Kahaleh B, Matucci-Cerinic M et al. (1996). Raynaud's phenomenon and systemic sclerosis. *Ann Ital Med Int* 11(2): 125-31.

Ghosh, S and Hayden MS (2008). New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nat Rev Immunol* 8(11): 837-48.

Gottipati, S, Rao NL and Fung-Leung WP (2008). IRAK1: a critical signaling mediator of innate immunity. *Cell Signal* 20(2): 269-76.

Gottwein, E, Cai X and Cullen BR (2006). A novel assay for viral microRNA function identifies a single nucleotide polymorphism that affects Drosha processing. *J Virol* 80(11): 5321-6.

Gourh, P, Arnett FC, Assassi S et al. (2009). Plasma cytokine profiles in systemic sclerosis: associations with autoantibody subsets and clinical manifestations. *Arthritis Res Ther* 11(5): R147.

Goutagny, N, Estornes Y, Hasan U et al. (2012). Targeting pattern recognition receptors in cancer immunotherapy. *Target Oncol* 7(1): 29-54.

Grotendorst, GR (1997). Connective tissue growth factor: a mediator of TGF-beta action on fibroblasts. *Cytokine Growth Factor Rev* 8(3): 171-9.

Gruber, HE, Somayaji S, Riley F et al. (2012). Human adipose-derived mesenchymal stem cells: serial passaging, doubling time and cell senescence. *Biotech Histochem* 87(4): 303-11.

Hachulla, E and Launay D (2011). Diagnosis and classification of systemic sclerosis. *Clin Rev Allergy Immunol* 40(2): 78-83.

Hamaguchi, Y (2010). Autoantibody profiles in systemic sclerosis: Predictive value for clinical evaluation and prognosis. *J Dermatol* 37(1): 42-53.

Hao, H, Gabbiani G, Camenzind E et al. (2006). Phenotypic modulation of intima and media smooth muscle cells in fatal cases of coronary artery lesion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26(2): 326-32.

He, Y, Huang C, Sun X et al. (2012). MicroRNA-146a modulates TGF-beta1-induced hepatic stellate cell proliferation by targeting SMAD4. *Cell Signal* 24(10): 1923-30.

Heil, F, Hemmi H, Hochrein H et al. (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303(5663): 1526-9.

Heinrich, PC, Behrmann I, Haan S et al. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 374(Pt 1): 1-20.

Heinrich, PC, Behrmann I, Muller-Newen G et al. (1998). Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 334 ( Pt 2): 297-314.

Hemmi, H, Kaisho T, Takeuchi O et al. (2002). Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* 3(2): 196-200.



Hemmi, H, Takeuchi O, Kawai T et al. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408(6813): 740-5.

Hinz, B, Celetta G, Tomasek JJ et al. (2001). Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol Biol Cell* 12(9): 2730-41.

Hinz, B, Phan SH, Thannickal VJ et al. (2007). The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol* 170(6): 1807-16.

Ho, YY, Lagares D, Tager AM et al. (2014). Fibrosis--a lethal component of systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol* 10(7): 390-402.

Horiuchi, S, Koyanagi Y, Zhou Y et al. (1994). Soluble interleukin-6 receptors released from T cell or granulocyte/macrophage cell lines and human peripheral blood mononuclear cells are generated through an alternative splicing mechanism. *Eur J Immunol* 24(8): 1945-8.

Huang, QQ and Pope RM (2009). The role of toll-like receptors in rheumatoid arthritis. *Curr Rheumatol Rep* 11(5): 357-64.

Huang, YS, Misiar A and Li LW (2005). Novel role and regulation of the interleukin-1 receptor associated kinase (IRAK) family proteins. *Cell Mol Immunol* 2(1): 36-9.

Huebener, P and Schwabe RF (2013). Regulation of wound healing and organ fibrosis by toll-like receptors. *Biochim Biophys Acta* 1832(7): 1005-17.

Iborra, M, Bernuzzi F, Invernizzi P et al. (2012). MicroRNAs in autoimmunity and inflammatory bowel disease: crucial regulators in immune response. *Autoimmun Rev* 11(5): 305-14.

Igaz, P, Toth S and Falus A (2001). Biological and clinical significance of the JAK-STAT pathway; lessons from knockout mice. *Inflamm Res* 50(9): 435-41.

Ihle, JN and Gilliland DG (2007). Jak2: normal function and role in hematopoietic disorders. *Curr Opin Genet Dev* 17(1): 8-14.

Invernizzi, P (2007). The X chromosome in female-predominant autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci* 1110: 57-64.

Invernizzi, P, Pasini S, Selmi C et al. (2009). Female predominance and X chromosome defects in autoimmune diseases. *J Autoimmun* 33(1): 12-6.

Irwin, CR, Myrillas TT, Traynor P et al. (2002). The role of soluble interleukin (IL)-6 receptor in mediating the effects of IL-6 on matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression by gingival fibroblasts. *J Periodontol* 73(7): 741-7.

Iudici, M, Moroncini G, Cipriani P et al. (2015). Where are we going in the management of interstitial lung disease in patients with systemic sclerosis? *Autoimmun Rev* 14(7): 575-8.

Iyer, SS and Cheng G (2012). Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Crit Rev Immunol* 32(1): 23-63.

Izadpanah, R, Kaushal D, Kriedt C et al. (2008). Long-term in vitro expansion alters the biology of adult mesenchymal stem cells. *Cancer Res* 68(11): 4229-38.

Jacob, CO, Zhu J, Armstrong DL et al. (2009). Identification of IRAK1 as a risk gene with critical role in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(15): 6256-61.

Jakkula, E, Leppä V, Sulonen AM et al. (2010). Genome-wide association study in a high-risk isolate for multiple sclerosis reveals associated variants in STAT3 gene. *Am J Hum Genet* 86(2): 285-91.

Jang, SY, Park SJ, Chae MK et al. (2018). Role of microRNA-146a in regulation of fibrosis in orbital fibroblasts from patients with Graves' orbitopathy. *Br J Ophthalmol* 102(3): 407-14.

Janssens, S and Beyaert R (2003). Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members. *Mol Cell* 11(2): 293-302.

Jazdzewski, K, Murray EL, Franssila K et al. (2008). Common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(20): 7269-74.

Ji, JD, Cha ES and Lee WJ (2014). Association of miR-146a polymorphisms with systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Lupus* 23(10): 1023-30.

Jimenez, SA and Derk CT (2004). Following the molecular pathways toward an understanding of the pathogenesis of systemic sclerosis. *Ann Intern Med* 140(1): 37-50.

Johnson, ME, Pioli PA and Whitfield ML (2015). Gene expression profiling offers insights into the role of innate immune signaling in SSc. *Semin Immunopathol* 37(5): 501-9.

Johnstone, EM, Hutchinson CE, Vail A et al. (2012). Acro-osteolysis in systemic sclerosis is associated with digital ischaemia and severe calcinosis. *Rheumatology (Oxford)* 51(12): 2234-8.

Jones, NF, Imbriglia JE, Steen VD et al. (1987). Surgery for scleroderma of the hand. *J Hand Surg Am* 12(3): 391-400.

Jones, SA, Richards PJ, Scheller J et al. (2005). IL-6 transsignaling: the in vivo consequences. *J Interferon Cytokine Res* 25(5): 241-53.

Jones, SA, Scheller J and Rose-John S (2011). Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling. *J Clin Invest* 121(9): 3375-83.

Jurk, M, Heil F, Vollmer J et al. (2002). Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat Immunol* 3(6): 499.

Kalluri, R and Neilson EG (2003). Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* 112(12): 1776-84.

Kamimura, D, Ishihara K and Hirano T (2003). IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 149: 1-38.

Kandimalla, ER, Bhagat L, Wang D et al. (2013). Design, synthesis and biological evaluation of novel antagonist compounds of Toll-like receptors 7, 8 and 9. *Nucleic Acids Res* 41(6): 3947-61.

Kanecki, K, Gorynski P, Tarka P et al. (2017). Incidence and prevalence of Systemic Sclerosis (SSc) in Poland - differences between rural and urban regions. *Ann Agric Environ Med* 24(2): 240-4.

Kaplanski, G, Marin V, Montero-Julian F et al. (2003). IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol* 24(1): 25-9.

Kapsimali, M, Kloosterman WP, de Bruijn E et al. (2007). MicroRNAs show a wide diversity of expression profiles in the developing and mature central nervous system. *Genome Biol* 8(8): R173.

Karin, M and Greten FR (2005). NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol* 5(10): 749-59.

Karlsen, M, Jakobsen K, Jonsson R et al. (2017). Expression of Toll-Like Receptors in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Patients with Primary Sjogren's Syndrome. *Scand J Immunol* 85(3): 220-6.

Kawai, T and Akira S (2006). TLR signaling. *Cell Death Differ* 13(5): 816-25.

Kawai, T and Akira S (2007). Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med* 13(11): 460-9.

Kawane, K, Ohtani M, Miwa K et al. (2006). Chronic polyarthritis caused by mammalian DNA that escapes from degradation in macrophages. *Nature* 443(7114): 998-1002.

Ke, XS, Liu CM, Liu DP et al. (2003). MicroRNAs: key participants in gene regulatory networks. *Curr Opin Chem Biol* 7(4): 516-23.

Khalifa, O and Balandraud N (2017). TMEM187-IRAK1 Polymorphisms Associated with Rheumatoid Arthritis Susceptibility in Tunisian and French Female Populations: Influence of Geographic Origin. 2017: 4915950.

Khan, K, Xu S, Nihtyanova S et al. (2012). Clinical and pathological significance of interleukin 6 overexpression in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 71(7): 1235-42.

Kim, HJ, Kim SH, Je JH et al. (2016). Increased expression of Toll-like receptors 3, 7, 8 and 9 in peripheral blood mononuclear cells in patients with psoriasis. *Exp Dermatol* 25(6): 485-7.

Kim, JH, Lee SC, Ro J et al. (2010). Jnk signaling pathway-mediated regulation of Stat3 activation is linked to the development of doxorubicin resistance in cancer cell lines. *Biochem Pharmacol* 79(3): 373-80.

Kloosterman, WP, Lagendijk AK, Ketting RF et al. (2007). Targeted inhibition of miRNA maturation with morpholinos reveals a role for miR-375 in pancreatic islet development. *PLoS Biol* 5(8): e203.

Kluwe, J, Mencin A and Schwabe RF (2009). Toll-like receptors, wound healing, and carcinogenesis. *J Mol Med (Berl)* 87(2): 125-38.

Kolb, M, Margetts PJ, Anthony DC et al. (2001). Transient expression of IL-1beta induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 107(12): 1529-36.

Kollewe, C, Mackensen AC, Neumann D et al. (2004). Sequential autophosphorylation steps in the interleukin-1 receptor-associated kinase-1 regulate its availability as an adapter in interleukin-1 signaling. *J Biol Chem* 279(7): 5227-36.

Komatsuda, A, Wakui H, Iwamoto K et al. (2008). Up-regulated expression of Toll-like receptors mRNAs in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 152(3): 482-7.

Krampera, M, Pasini A, Pizzolo G et al. (2006). Regenerative and immunomodulatory potential of mesenchymal stem cells. *Curr Opin Pharmacol* 6(4): 435-41.

Kutty, RK, Nagineni CN, Samuel W et al. (2013). Differential regulation of microRNA-146a and microRNA-146b-5p in human retinal pigment epithelial cells by interleukin-1beta, tumor necrosis factor-alpha, and interferon-gamma. *Mol Vis* 19: 737-50.

Lacerte, P, Brunet A, Egarnes B et al. (2016). Overexpression of TLR2 and TLR9 on monocyte subsets of active rheumatoid arthritis patients contributes to enhance responsiveness to TLR agonists. *Arthritis Res Ther* 18: 10.

Lafyatis, R and York M (2009). Innate immunity and inflammation in systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 21(6): 617-22.

Lanzavecchia, A and Sallusto F (2007). Toll-like receptors and innate immunity in B-cell activation and antibody responses. *Curr Opin Immunol* 19(3): 268-74.

Lau, CM, Broughton C, Tabor AS et al. (2005a). RNA-associated autoantigens activate B cells by combined B cell antigen receptor/Toll-like receptor 7 engagement. *J Exp Med* 202(9): 1171-7.

Lau, CM, Broughton C, Tabor AS et al. (2005b). RNA-associated autoantigens activate B cells by combined B cell antigen receptor/Toll-like receptor 7 engagement. *J Exp Med* 202(9): 1171-7.

Leadbetter, EA, Rifkin IR, Hohlbaum AM et al. (2002). Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* 416(6881): 603-7.

Lefebvre, V, Li P and de Crombrughe B (1998). A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *Embo j* 17(19): 5718-33.

LeRoy, EC and Medsger TA (2001). Criteria for the classification of early systemic sclerosis. *J Rheumatol* 28(7): 1573-6.

Li, C, Huang S, Mo S et al. (2015). Susceptibility of autoimmune diseases in three polymorphisms of infection-associated gene IRAK1. *J Infect Dev Ctries* 9(6): 614-23.

Li, J, Wang X, Zhang F et al. (2013). Toll-like receptors as therapeutic targets for autoimmune connective tissue diseases. *Pharmacol Ther* 138(3): 441-51.

Libert, C, Dejager L and Pinheiro I (2010). The X chromosome in immune functions: when a chromosome makes the difference. *Nat Rev Immunol* 10(8): 594-604.

Lim, LP, Lau NC, Garrett-Engle P et al. (2005). Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 433(7027): 769-73.

Linden, A (2006). Measuring diagnostic and predictive accuracy in disease management: an introduction to receiver operating characteristic (ROC) analysis. *J Eval Clin Pract* 12(2): 132-9.

Lindsay, MA (2008). microRNAs and the immune response. *Trends Immunol* 29(7): 343-51.

Lissilaa, R, Buatois V, Magistrelli G et al. (2010). Although IL-6 trans-signaling is sufficient to drive local immune responses, classical IL-6 signaling is obligate for the induction of T cell-mediated autoimmunity. *J Immunol* 185(9): 5512-21.

Liu, T, Zhang L, Joo D et al. (2017a). NF-kappaB signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther* 2.

Liu, X, You L, Zhou R et al. (2017b). Significant association between functional microRNA polymorphisms and coronary heart disease susceptibility: a comprehensive meta-analysis involving 16484 subjects. *Oncotarget* 8(4): 5692-702.

Liu, Z, Lu CL, Cui LP et al. (2012). MicroRNA-146a modulates TGF-beta1-induced phenotypic differentiation in human dermal fibroblasts by targeting SMAD4. *Arch Dermatol Res* 304(3): 195-202.

Livak, KJ and Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods* 25(4): 402-8.

Lu, J, Getz G, Miska EA et al. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435(7043): 834-8.

Lu, LF, Boldin MP, Chaudhry A et al. (2010). Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses. *Cell* 142(6): 914-29.

Lund, J, Sato A, Akira S et al. (2003). Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 198(3): 513-20.

Lund, JM, Alexopoulou L, Sato A et al. (2004). Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(15): 5598-603.

Makino, T and Jinnin M (2016). Genetic and epigenetic abnormalities in systemic sclerosis. *J Dermatol* 43(1): 10-8.

Marangoni, RG, Korman BD, Wei J et al. (2015). Myofibroblasts in murine cutaneous fibrosis originate from adiponectin-positive intradermal progenitors. *Arthritis Rheumatol* 67(4): 1062-73.

Marrack, P, Kappler J and Kotzin BL (2001). Autoimmune disease: why and where it occurs. *Nat Med* 7(8): 899-905.

Marshak-Rothstein, A (2006). Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol* 6(11): 823-35.

Martin, JE, Bossini-Castillo L and Martin J (2012). Unraveling the genetic component of systemic sclerosis. *Hum Genet* 131(7): 1023-37.

Martin, MU and Wesche H (2002). Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family. *Biochim Biophys Acta* 1592(3): 265-80.

Massague, J and Wotton D (2000). Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *Embo j* 19(8): 1745-54.

Mau, W, Listing J, Huscher D et al. (2005). Employment across chronic inflammatory rheumatic diseases and comparison with the general population. *J Rheumatol* 32(4): 721-8.

Mayes, MD, Lacey JV, Jr., Beebe-Dimmer J et al. (2003). Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population. *Arthritis Rheum* 48(8): 2246-55.

Means, TK, Latz E, Hayashi F et al. (2005). Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. *J Clin Invest* 115(2): 407-17.

Medsger, TA, Jr. (2003). Natural history of systemic sclerosis and the assessment of disease activity, severity, functional status, and psychologic well-being. *Rheum Dis Clin North Am* 29(2): 255-73, vi.

Mehanna, ET, Ghattas MH, Mesbah NM et al. (2015). Association of MicroRNA-146a rs2910164 Gene Polymorphism with Metabolic Syndrome. *Folia Biol (Praha)* 61(1): 43-8.

Meier, FM, Frommer KW, Dinser R et al. (2012). Update on the profile of the EUSTAR cohort: an analysis of the EULAR Scleroderma Trials and Research group database. *Ann Rheum Dis* 71(8): 1355-60.



Meirelles Lda, S, Fontes AM, Covas DT et al. (2009). Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev* 20(5-6): 419-27.

Melief, SM, Zwaginga JJ, Fibbe WE et al. (2013). Adipose tissue-derived multipotent stromal cells have a higher immunomodulatory capacity than their bone marrow-derived counterparts. *Stem Cells Transl Med* 2(6): 455-63.

Meneghin, A, Choi ES, Evanoff HL et al. (2008). TLR9 is expressed in idiopathic interstitial pneumonia and its activation promotes in vitro myofibroblast differentiation. *Histochem Cell Biol* 130(5): 979-92.

Meyer-Bahlburg, A and Rawlings DJ (2008). B cell autonomous TLR signaling and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 7(4): 313-6.

Meyer, OC, Fertig N, Lucas M et al. (2007). Disease subsets, antinuclear antibody profile, and clinical features in 127 French and 247 US adult patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 34(1): 104-9.

Miao, CG, Xiong YY, Yu H et al. (2015). Critical roles of microRNAs in the pathogenesis of systemic sclerosis: New advances, challenges and potential directions. *Int Immunopharmacol* 28(1): 626-33.

Miggin, SM and O'Neill LA (2006). New insights into the regulation of TLR signaling. *J Leukoc Biol* 80(2): 220-6.

Miska, EA (2005). How microRNAs control cell division, differentiation and death. *Curr Opin Genet Dev* 15(5): 563-8.

Morishita, Y, Imai T, Yoshizawa H et al. (2015). Delivery of microRNA-146a with polyethylenimine nanoparticles inhibits renal fibrosis in vivo. *Int J Nanomedicine* 10: 3475-88.

Mullberg, J, Schooltink H, Stoyan T et al. (1993). The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. *Eur J Immunol* 23(2): 473-80.

Murata, K, Yoshitomi H, Tanida S et al. (2010). Plasma and synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 12(3): R86.

Murdaca, G, Spano F, Contatore M et al. (2014). Potential use of TNF-alpha inhibitors in systemic sclerosis. *Immunotherapy* 6(3): 283-9.

Navarro, A, Diaz T, Martinez A et al. (2009). Regulation of JAK2 by miR-135a: prognostic impact in classic Hodgkin lymphoma. *Blood* 114(14): 2945-51.

Nietert, PJ and Silver RM (2000). Systemic sclerosis: environmental and occupational risk factors. *Curr Opin Rheumatol* 12(6): 520-6.

Nikpour, M, Stevens WM, Herrick AL et al. (2010). Epidemiology of systemic sclerosis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 24(6): 857-69.

O'Neill, LA (2006). How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. *Curr Opin Immunol* 18(1): 3-9.

O'Reilly, S, Cant R, Ciechomska M et al. (2013). Interleukin-6: a new therapeutic target in systemic sclerosis? *Clin Transl Immunology* 2(4): e4.

O'Reilly, S, Ciechomska M, Cant R et al. (2012). Interleukin-6, its role in fibrosing conditions. *Cytokine Growth Factor Rev* 23(3): 99-107.

O'Shea, JJ, Gadina M and Schreiber RD (2002). Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell* 109 Suppl: S121-31.

Obermeier, F, Dunger N, Strauch UG et al. (2005). CpG motifs of bacterial DNA essentially contribute to the perpetuation of chronic intestinal inflammation. *Gastroenterology* 129(3): 913-27.

Okubo, M, Tahara T, Shibata T et al. (2011). Association study of common genetic variants in pre-microRNAs in patients with ulcerative colitis. *J Clin Immunol* 31(1): 69-73.

Ospelt, C, Brentano F, Rengel Y et al. (2008). Overexpression of toll-like receptors 3 and 4 in synovial tissue from patients with early rheumatoid arthritis: toll-like receptor expression in early and longstanding arthritis. *Arthritis Rheum* 58(12): 3684-92.

Overall, CM, Wrana JL and Sodek J (1989). Independent regulation of collagenase, 72-kDa progelatinase, and metalloendoproteinase inhibitor expression in human fibroblasts by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 264(3): 1860-9.

Paduano, F (2017). Adipose Tissue as a Strategic Source of Mesenchymal Stem Cells in Bone Regeneration: A Topical Review on the Most Promising Craniomaxillofacial Applications. 18(10).

Pandey, JP and LeRoy EC (1998). Human cytomegalovirus and the vasculopathies of autoimmune diseases (especially scleroderma), allograft rejection, and coronary restenosis. *Arthritis Rheum* 41(1): 10-5.

Paniushin, OV, Domaratskaia EI and Starostin VI (2006). [Mesenchymal stem cells: sources, phenotype, and differentiation potential]. *Izv Akad Nauk Ser Biol*(1): 6-25.

Papadimitraki, ED, Choulaki C, Koutala E et al. (2006). Expansion of toll-like receptor 9-expressing B cells in active systemic lupus erythematosus: implications for the induction and maintenance of the autoimmune process. *Arthritis Rheum* 54(11): 3601-11.

Pasare, C and Medzhitov R (2003). Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 299(5609): 1033-6.

Pauley, KM, Cha S and Chan EK (2009). MicroRNA in autoimmunity and autoimmune diseases. *J Autoimmun* 32(3-4): 189-94.

Pauley, KM, Satoh M, Chan AL et al. (2008). Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther* 10(4): R101.

Pechkovsky, DV, Prele CM, Wong J et al. (2012). STAT3-mediated signaling dysregulates lung fibroblast-myofibroblast activation and differentiation in UIP/IPF. *Am J Pathol* 180(4): 1398-412.

Pedroza, M, Le TT, Lewis K et al. (2016). STAT-3 contributes to pulmonary fibrosis through epithelial injury and fibroblast-myofibroblast differentiation. *Faseb j* 30(1): 129-40.

Pendergrass, SA, Hayes E, Farina G et al. (2010). Limited systemic sclerosis patients with pulmonary arterial hypertension show biomarkers of inflammation and vascular injury. *PLoS One* 5(8): e12106.

Piera-Velazquez, S, Li Z and Jimenez SA (2011). Role of endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of fibrotic disorders. *Am J Pathol* 179(3): 1074-80.

Pittenger, MF, Mackay AM, Beck SC et al. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284(5411): 143-7.

Pope, JE, Baron M, Bellamy N et al. (1995). Variability of skin scores and clinical measurements in scleroderma. *J Rheumatol* 22(7): 1271-6.

Prescott, RJ, Freemont AJ, Jones CJ et al. (1992). Sequential dermal microvascular and perivascular changes in the development of scleroderma. *J Pathol* 166(3): 255-63.

Pritchard, CC, Cheng HH and Tewari M (2012). MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nat Rev Genet* 13(5): 358-69.

Quintero, OL, Amador-Patarroyo MJ, Montoya-Ortiz G et al. (2012). Autoimmune disease and gender: plausible mechanisms for the female predominance of autoimmunity. *J Autoimmun* 38(2-3): J109-19.

Radstake, TR, van Bon L, Broen J et al. (2009). The pronounced Th17 profile in systemic sclerosis (SSc) together with intracellular expression of TGFbeta and IFNgamma distinguishes SSc phenotypes. *PLoS One* 4(6): e5903.

Raja, J and Denton CP (2015). Cytokines in the immunopathology of systemic sclerosis. *Semin Immunopathol* 37(5): 543-57.

Rajkumar, VS, Howell K, Csiszar K et al. (2005). Shared expression of phenotypic markers in systemic sclerosis indicates a convergence of pericytes and fibroblasts to a myofibroblast lineage in fibrosis. *Arthritis Res Ther* 7(5): R1113-23.

Ramos, PS, Silver RM and Feghali-Bostwick CA (2015). Genetics of systemic sclerosis: recent advances. *Curr Opin Rheumatol* 27(6): 521-9.

Rane, SG and Reddy EP (2000). Janus kinases: components of multiple signaling pathways. *Oncogene* 19(49): 5662-79.

Rawlings, JS, Rosler KM and Harrison DA (2004). The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci* 117(Pt 8): 1281-3.

Rehmsmeier, M, Steffen P, Hochsmann M et al. (2004). Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *Rna* 10(10): 1507-17.

Reich, N, Tomcik M, Zerr P et al. (2012). Jun N-terminal kinase as a potential molecular target for prevention and treatment of dermal fibrosis. *Ann Rheum Dis* 71(5): 737-45.

Ridolfi, RL, Bulkley BH and Hutchins GM (1976). The cardiac conduction system in progressive systemic sclerosis. Clinical and pathologic features of 35 patients. *Am J Med* 61(3): 361-6.

Rifkin, IR, Leadbetter EA, Busconi L et al. (2005). Toll-like receptors, endogenous ligands, and systemic autoimmune disease. *Immunol Rev* 204: 27-42.

Ringwood, L and Li L (2008). The involvement of the interleukin-1 receptor-associated kinases (IRAKs) in cellular signaling networks controlling inflammation. *Cytokine* 42(1): 1-7.

Rodnan, GP, Lipinski E and Luksick J (1979). Skin thickness and collagen content in progressive systemic sclerosis and localized scleroderma. *Arthritis Rheum* 22(2): 130-40.

Romano, M, Sironi M, Toniatti C et al. (1997). Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity* 6(3): 315-25.

Rose, WA, 2nd, Sakamoto K and Leifer CA (2012). TLR9 is important for protection against intestinal damage and for intestinal repair. *Sci Rep* 2: 574.

Rui, L, Vinuesa CG, Blasioli J et al. (2003). Resistance to CpG DNA-induced autoimmunity through tolerogenic B cell antigen receptor ERK signaling. *Nat Immunol* 4(6): 594-600.

Rusca, N and Monticelli S (2011). MiR-146a in Immunity and Disease. *Mol Biol Int* 2011: 437301.

Ryan, BM, Robles AI and Harris CC (2010). Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. *Nat Rev Cancer* 10(6): 389-402.

Sacre, K, Criswell LA and McCune JM (2012). Hydroxychloroquine is associated with impaired interferon-alpha and tumor necrosis factor-alpha production by plasmacytoid dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 14(3): R155.

Sakoguchi, A, Jinnin M, Makino T et al. (2013). The miR-146a rs2910164 C/G polymorphism is associated with telangiectasia in systemic sclerosis. *Clin Exp Dermatol* 38(1): 99-100.

Sanger, F, Nicklen S and Coulson AR (1992). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology* 24: 104-8.

Sanmiguel, JC, Olaru F, Li J et al. (2009). Interleukin-1 regulates keratinocyte expression of T cell targeting chemokines through interleukin-1 receptor associated kinase-1 (IRAK1) dependent and independent pathways. *Cell Signal* 21(5): 685-94.

Santiago-Raber, ML, Dunand-Sauthier I, Wu T et al. (2010). Critical role of TLR7 in the acceleration of systemic lupus erythematosus in TLR9-deficient mice. *J Autoimmun* 34(4): 339-48.

Sato, S, Hasegawa M and Takehara K (2001). Serum levels of interleukin-6 and interleukin-10 correlate with total skin thickness score in patients with systemic sclerosis. *J Dermatol Sci* 27(2): 140-6.

Saunders, MA, Liang H and Li WH (2007). Human polymorphism at microRNAs and microRNA target sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(9): 3300-5.

Scala, E, Pallotta S, Frezzolini A et al. (2004). Cytokine and chemokine levels in systemic sclerosis: relationship with cutaneous and internal organ involvement. *Clin Exp Immunol* 138(3): 540-6.

Scheller, J and Rose-John S (2006). Interleukin-6 and its receptor: from bench to bedside. *Med Microbiol Immunol* 195(4): 173-83.

Schmeiser, T, Saar P, Jin D et al. (2012). Profile of gastrointestinal involvement in patients with systemic sclerosis. *Rheumatol Int* 32(8): 2471-8.

Schnare, M, Barton GM, Holt AC et al. (2001). Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2(10): 947-50.

Schumacher, HR, Jr. (1973). Joint involvement in progressive systemic sclerosis (scleroderma): a light and electron microscopic study of synovial membrane and fluid. *Am J Clin Pathol* 60(5): 593-600.

Shake, JG, Gruber PJ, Baumgartner WA et al. (2002). Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg* 73(6): 1919-25; discussion 26.

Shen, J, Ambrosone CB, DiCioccio RA et al. (2008). A functional polymorphism in the miR-146a gene and age of familial breast/ovarian cancer diagnosis. *Carcinogenesis* 29(10): 1963-6.

Shrivastav, M and Niewold TB (2013). Nucleic Acid sensors and type I interferon production in systemic lupus erythematosus. *Front Immunol* 4: 319.

Shuai, K (2000). Modulation of STAT signaling by STAT-interacting proteins. *Oncogene* 19(21): 2638-44.

Singh, RP, Massachi I, Manickavel S et al. (2013). The role of miRNA in inflammation and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 12(12): 1160-5.

Skhirtladze, C, Distler O, Dees C et al. (2008). Src kinases in systemic sclerosis: central roles in fibroblast activation and in skin fibrosis. *Arthritis Rheum* 58(5): 1475-84.

Smits, P, Li P, Mandel J et al. (2001). The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation. *Dev Cell* 1(2): 277-90.

Song, GG, Bae SC, Seo YH et al. (2015). The association between susceptibility to inflammatory arthritis and miR-146a, miR-499 and IRAK1 polymorphisms. A meta-analysis. *Z Rheumatol* 74(7): 637-45.

Sonkoly, E and Pivarcsi A (2009). Advances in microRNAs: implications for immunity and inflammatory diseases. *J Cell Mol Med* 13(1): 24-38.

Sonkoly, E, Stahle M and Pivarcsi A (2008a). MicroRNAs and immunity: novel players in the regulation of normal immune function and inflammation. *Semin Cancer Biol* 18(2): 131-40.

Sonkoly, E, Stahle M and Pivarcsi A (2008b). MicroRNAs: novel regulators in skin inflammation. *Clin Exp Dermatol* 33(3): 312-5.

Sonkoly, E, Wei T, Janson PC et al. (2007). MicroRNAs: novel regulators involved in the pathogenesis of psoriasis? *PLoS One* 2(7): e610.

Spasovski, D, Spasovski V, Bascarevic Z et al. (2018). Intra-articular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells in the treatment of knee osteoarthritis. *J Gene Med* 20(1).

Stanczyk, J, Pedrioli DM, Brentano F et al. (2008). Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 58(4): 1001-9.

Steen, VD (2008). The many faces of scleroderma. *Rheum Dis Clin North Am* 34(1): 1-15.

Šumová, B, Zerr KP, Dees C et al. (2014). OP0240 Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Regulates Fibroblast Activation as A Downstream Mediator of Transforming Growth Factor-Beta. *Ann Rheum Dis* 73(Suppl 2): 153-.

Swart, J, Martens A and Wulffraat N (2008). Mesenchymal stem cells: a future for the treatment of arthritis? *Joint Bone Spine* 75(4): 379-82.

Taganov, KD, Boldin MP, Chang KJ et al. (2006). NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(33): 12481-6.

Tan, FK, Zhou X, Mayes MD et al. (2006). Signatures of differentially regulated interferon gene expression and vasculotrophism in the peripheral blood cells of systemic sclerosis patients. *Rheumatology (Oxford)* 45(6): 694-702.

Tanaka, T, Narazaki M and Kishimoto T (2014). IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6(10): a016295.

Tang, Y, Luo X, Cui H et al. (2009). MicroRNA-146A contributes to abnormal activation of the type I interferon pathway in human lupus by targeting the key signaling proteins. *Arthritis Rheum* 60(4): 1065-75.



Thomas, SJ, Snowden JA, Zeidler MP et al. (2015). The role of JAK/STAT signalling in the pathogenesis, prognosis and treatment of solid tumours. *Br J Cancer* 113(3): 365-71.

Tomasek, JJ, Gabbiani G, Hinz B et al. (2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(5): 349-63.

Travers, JG, Kamal FA, Robbins J et al. (2016). Cardiac Fibrosis: The Fibroblast Awakens. *Circ Res* 118(6): 1021-40.

Trujillo, G, Meneghin A, Flaherty KR et al. (2010). TLR9 differentiates rapidly from slowly progressing forms of idiopathic pulmonary fibrosis. *Sci Transl Med* 2(57): 57ra82.

Tsai, CC, Su PF, Huang YF et al. (2012). Oct4 and Nanog directly regulate Dnmt1 to maintain self-renewal and undifferentiated state in mesenchymal stem cells. *Mol Cell* 47(2): 169-82.

Tsitsiou, E and Lindsay MA (2009). microRNAs and the immune response. *Curr Opin Pharmacol* 9(4): 514-20.

Tyndall, A and van Laar JM (2010). Stem cells in the treatment of inflammatory arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 24(4): 565-74.

Tyndall, AJ, Bannert B, Vonk M et al. (2010). Causes and risk factors for death in systemic sclerosis: a study from the EULAR Scleroderma Trials and Research (EUSTAR) database. *Ann Rheum Dis* 69(10): 1809-15.

Uccelli, A, Moretta L and Pistoia V (2006). Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol* 36(10): 2566-73.

Valentini, G, Della Rossa A, Bombardieri S et al. (2001). European multicentre study to define disease activity criteria for systemic sclerosis. II. Identification of disease activity variables and development of preliminary activity indexes. *Ann Rheum Dis* 60(6): 592-8.

Valentino, L and Pierre J (2006). JAK/STAT signal transduction: regulators and implication in hematological malignancies. *Biochem Pharmacol* 71(6): 713-21.

van den Hoogen, F, Khanna D, Fransen J et al. (2013). 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis* 72(11): 1747-55.

Varga, J and Abraham D (2007). Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest* 117(3): 557-67.

Varga, J and Bashey RI (1995). Regulation of connective tissue synthesis in systemic sclerosis. *Int Rev Immunol* 12(2-4): 187-99.

Verrecchia, F and Mauviel A (2007). Transforming growth factor-beta and fibrosis. *World J Gastroenterol* 13(22): 3056-62.

Vollmer, J, Tluk S, Schmitz C et al. (2005a). Immune stimulation mediated by autoantigen binding sites within small nuclear RNAs involves Toll-like receptors 7 and 8. *J Exp Med* 202(11): 1575-85.

Vollmer, J, Tluk S, Schmitz C et al. (2005b). Immune stimulation mediated by autoantigen binding sites within small nuclear RNAs involves Toll-like receptors 7 and 8. *J Exp Med* 202(11): 1575-85.

Wakitani, S, Goto T, Pineda SJ et al. (1994). Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 76(4): 579-92.

Wang, C, Deng L, Hong M et al. (2001). TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 412(6844): 346-51.

Wang, J, Shao Y, Bennett TA et al. (2006). The functional effects of physical interactions among Toll-like receptors 7, 8, and 9. *J Biol Chem* 281(49): 37427-34.

Wang, L, Kurosaki T and Corey SJ (2007). Engagement of the B-cell antigen receptor activates STAT through Lyn in a Jak-independent pathway. *Oncogene* 26(20): 2851-9.

Wardemann, H, Yurasov S, Schaefer A et al. (2003). Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science* 301(5638): 1374-7.

Watanabe, A, Hashmi A, Gomes DA et al. (2007). Apoptotic hepatocyte DNA inhibits hepatic stellate cell chemotaxis via toll-like receptor 9. *Hepatology* 46(5): 1509-18.

Wei, J, Bhattacharyya S, Tourtellotte WG et al. (2011). Fibrosis in systemic sclerosis: emerging concepts and implications for targeted therapy. *Autoimmun Rev* 10(5): 267-75.

Wei, X, Yang X, Han ZP et al. (2013). Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacol Sin* 34(6): 747-54.

Whitacre, CC (2001). Sex differences in autoimmune disease. *Nat Immunol* 2(9): 777-80.

Woodbury, D, Schwarz EJ, Prockop DJ et al. (2000). Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 61(4): 364-70.

Wright, JA and Nair SP (2010). Interaction of staphylococci with bone. *Int J Med Microbiol* 300(2-3): 193-204.

Wu, P, Wu J, Liu S et al. (2008). TLR9/TLR7-triggered downregulation of BDCA2 expression on human plasmacytoid dendritic cells from healthy individuals and lupus patients. *Clin Immunol* 129(1): 40-8.

Wu, X and Peng SL (2006). Toll-like receptor 9 signaling protects against murine lupus. *Arthritis Rheum* 54(1): 336-42.

Xu, MY, Hu JJ, Shen J et al. (2014). Stat3 signaling activation crosslinking of TGF-beta1 in hepatic stellate cell exacerbates liver injury and fibrosis. *Biochim Biophys Acta* 1842(11): 2237-45.

Xu, T, Zhu Y, Wei QK et al. (2008). A functional polymorphism in the miR-146a gene is associated with the risk for hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 29(11): 2126-31.

Xu, W, Xu J, Liu S et al. (2011). Effects of common polymorphisms rs11614913 in miR-196a2 and rs2910164 in miR-146a on cancer susceptibility: a meta-analysis. *PLoS One* 6(5): e20471.

Xu, WD, Lu MM, Pan HF et al. (2012). Association of MicroRNA-146a with autoimmune diseases. *Inflammation* 35(4): 1525-9.

Yamaoka, K, Saharinen P, Pesu M et al. (2004). The Janus kinases (Jaks). *Genome Biol* 5(12): 253.

- Yang, B, Zhang JL, Shi YY et al. (2011). Association study of single nucleotide polymorphisms in pre-miRNA and rheumatoid arthritis in a Han Chinese population. *Mol Biol Rep* 38(8): 4913-9.
- Yang, M, Tian M, Zhang X et al. (2017a). Role of the JAK2/STAT3 signaling pathway in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus with macrovascular complications. *Oncotarget* 8(57): 96958-69.
- Yang, XK, Li P, Zhang C et al. (2017b). Association between IRAK1 rs3027898 and miRNA-499 rs3746444 polymorphisms and rheumatoid arthritis : A case control study and meta-analysis. *Z Rheumatol* 76(7): 622-9.
- Yang, YK, Ogando CR, Wang See C et al. (2018). Changes in phenotype and differentiation potential of human mesenchymal stem cells aging in vitro. *Stem Cell Res Ther* 9(1): 131.
- Yarak, S and Okamoto OK (2010). Human adipose-derived stem cells: current challenges and clinical perspectives. *An Bras Dermatol* 85(5): 647-56.
- York, MR (2011). Novel insights on the role of the innate immune system in systemic sclerosis. *Expert Rev Clin Immunol* 7(4): 481-9.
- Yu, H, Kortylewski M and Pardoll D (2007). Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* 7(1): 41-51.
- Yu, H, Pardoll D and Jove R (2009). STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer* 9(11): 798-809.
- Yu, P, Wellmann U, Kunder S et al. (2006). Toll-like receptor 9-independent aggravation of glomerulonephritis in a novel model of SLE. *Int Immunol* 18(8): 1211-9.
- Yue, C, Wang M, Ding B et al. (2011). Polymorphism of the pre-miR-146a is associated with risk of cervical cancer in a Chinese population. *Gynecol Oncol* 122(1): 33-7.
- Zhang, H, Pu J, Wang X et al. (2013). IRAK1 rs3027898 C/A polymorphism is associated with risk of rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 33(2): 369-75.

Zhang, HY and Phan SH (1999). Inhibition of myofibroblast apoptosis by transforming growth factor beta(1). *Am J Respir Cell Mol Biol* 21(6): 658-65.

Zhang, J, Liu YF and Gan Y (2012). Lack of association between miR-149 C>T polymorphism and cancer susceptibility: a meta-analysis based on 4,677 cases and 4,830 controls. *Mol Biol Rep* 39(9): 8749-53.

Zhang, Y, Dees C, Beyer C et al. (2015). Inhibition of casein kinase II reduces TGFbeta induced fibroblast activation and ameliorates experimental fibrosis. *Ann Rheum Dis* 74(5): 936-43.

Zhang, YE (2009). Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res* 19(1): 128-39.

Zhao, Y and Srivastava D (2007). A developmental view of microRNA function. *Trends Biochem Sci* 32(4): 189-97.

Zheng, L, Dai H, Zhou M et al. (2007). Fen1 mutations result in autoimmunity, chronic inflammation and cancers. *Nat Med* 13(7): 812-9.

Zheng, L, Zhang Z, Yu C et al. (2010). Expression of Toll-like receptors 7, 8, and 9 in primary Sjogren's syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 109(6): 844-50.

Zhernakova, A, van Diemen CC and Wijmenga C (2009). Detecting shared pathogenesis from the shared genetics of immune-related diseases. *Nat Rev Genet* 10(1): 43-55.

Zhou, Q, Hou S, Liang L et al. (2014). MicroRNA-146a and Ets-1 gene polymorphisms in ocular Behcet's disease and Vogt-Koyanagi-Harada syndrome. *Ann Rheum Dis* 73(1): 170-6.

Zhu, H, Li Y, Qu S et al. (2012). MicroRNA expression abnormalities in limited cutaneous scleroderma and diffuse cutaneous scleroderma. *J Clin Immunol* 32(3): 514-22.

Zilahi, E, Tarr T, Papp G et al. (2012). Increased microRNA-146a/b, TRAF6 gene and decreased IRAK1 gene expressions in the peripheral mononuclear cells of patients with Sjogren's syndrome. *Immunol Lett* 141(2): 165-8.

## **BIOGRAFIJA:**

Miša Vreća je rođena 03.09.1985. godine u Beogradu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, studijska grupa Molekularna biologija i fiziologija, upisala je školske 2004/2005. godine, i diplomirala u septembru 2012. godine sa prosečnom ocenom 9.85 i diplomskim radom pod nazivom “Studija asocijacije genetičkih polimorfizama azot oksid sintaze i sa rizikom za razvoj karcinoma prostate u srpskoj populaciji”. Doktorske studije upisala je školske 2013/2014. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Molekularna biologija, modul Molekularna biologija eukariota. U periodu od decembra 2013. do februara 2015. godine zaposlena je Laboratoriji za molekularnu biomedicinu, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu, kao učesnik međunarodnog projekta: “Strengthening the Research Potential of IMGGE through Reinforcement of Biomedical Science of Rare Diseases in Serbia – en route for innovation” (EU-FP7-REGPOT-316088, 2013-2016. godine). Od februara 2015. godine učesnik je na nacionalnom projektu “Retke bolesti: molekularna patofiziologija, dijagnostički i terapijski modaliteti i socijalni, etički i pravni aspekti” (Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, ev. br. III41004, 2011-2018. godine). Miša Vreća je do sada objavila 7 radova u časopisima međunarodnog značaja i imala 15 saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima i 3 saopštenja na skupu nacionalnog značaja.

## Прилог 1.

### Изјава о ауторству

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_ Миша Врећа \_\_\_\_\_

Број индекса \_\_\_\_\_ М3012/2013 \_\_\_\_\_

#### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Експресије гена маркера инфламације и фиброзе и гена кандидата за

\_\_\_\_\_ оптимизовану ћелијску терапију код пацијената са системском склерозом \_\_\_\_\_

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, \_\_\_\_\_ 8.11.2018. \_\_\_\_\_

*Миша Врећа*

## Прилог 2.

### Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_ Миша Врећа \_\_\_\_\_

Број индекса \_\_\_\_\_ М3012/2013 \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_ Молекуларна биологија, модул: Молекуларна биологија  
еукариота \_\_\_\_\_

Наслов рада \_\_\_\_\_ Експресије гена маркера инфламације и фиброзе и гена  
кандидата заоптимизовану ћелијску терапију код пацијената са системском  
склерозом \_\_\_\_\_

Ментор \_\_\_\_\_ др Весна Спасовски, др Соња Павловић \_\_\_\_\_

Потписани \_\_\_\_\_ Миша Врећа \_\_\_\_\_

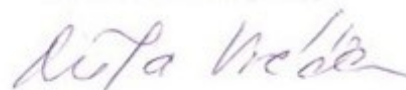
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској  
верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног  
репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског  
звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум  
одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне  
библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, \_\_\_\_\_ 8.11.2018. \_\_\_\_\_

Потпис докторанда





Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Експресије гена маркера инфламације и фиброзе и гена кандидата за

---

оптимизовану ћелијску терапију код пацијената са системском склерозом

---

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, \_\_\_\_\_ 8.11.2018. \_\_\_\_\_

  
\_\_\_\_\_

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.