

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Ana S. Zeković

**POLIMORFIZAM GENA ZA
INTERLEUKIN-6 I MONOCITNI
HEMOATRAKTANTNI PROTEIN-1 I
NIVOI INTERLEUKINA-17 I
INTERLEUKINA-23 KOD OBOLELIH OD
SISTEMSKE SKLEROZE U ODNOSU NA
ZDRAVE OSOBE**

doktorska disertacija

Beograd, 2019.

UNIVERSITY OF BELGRADE

SCHOOL OF MEDICINE

Ana S. Zekovic

**POLYMORPHISM IN THE
INTERLEUKIN-6 AND
MONOCYTECHEMOATTRACTANT
PROTEIN-1 GENES AND INTERLEUKIN-
17 AND INTERLEUKIN-23 EXPRESSION
PROFILES IN SYSTEMIC SCLEROSIS
PATIENTS COMPARED TO HEALTHY
CONTROLS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019.

Mentor: Prof. dr Nemanja Damjanov, Institut za reumatologiju, Medicinski fakultet,
Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

1. Prof. dr Mirjana Šefik Bukilica, Institut za reumatologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
2. Dr Sonja Pavlović, naučni savetnik, Institut za molekularnu genetiku i genetsko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu
3. Prof. dr Tatjana Ilić, Klinika za nefrologiju i imunologiju KCV, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

Na početku, želim da se od srca zahvalim:

- *Prof. dr Nemanji Damjanov, na velikoj podršci i saradnji tokom izrade teze*
- *Dr Sonji Pavlović, na izuzetnom entuzijazmu i nesebičnoj stručnoj pomoći, prilikom izbora i izrade teze*
- *Prof. dr Mirjani Šefik Bukilici i prof. dr Tatjani Ilić, na dragocenoj pomoći prilikom izrade teze*
- *Mojim kolegama doktorima, medicinskim sestrama i laborantima na Institutu za reumatologiju, kao i na Institutu za molekularnu genetiku i genetsko inženjerstvo, koji su mi pomagali prilikom izrade teze*
- *Poštovanim ispitanicima, koji su uzeli učešće u istraživanju*
- *Porodici i prijateljima, koji su me podržavali u trenucima gubitka optimizma*

Posvećeno Svetlani, Srdanu, Tijani i Kići

**POLIMORFIZAM GENA ZA INTERLEUKIN-6 I MONOCITNI
HEMOATRAKTANTNI PROTEIN-1 I NIVOI INTERLEUKINA-17 I
INTERLEUKINA- 23 KOD OBOLELIH OD SISTEMSKE SKLEROZE
ODNOSU NA ZDRAVE OSOBE**

Rezime

Uvod: Sistemska skeroza (SSc) je bolest nepoznatog uzroka. Jedan od mogućih činilaca u nastanku SSc je poremećaj imunskog odgovora na nivou Th17 ćelija i sekrecije interleukina-23 (IL-23/Th17 osovine). Polimorfizmi tipa zamene jednog nukleotida, u proksimalnom promotoru interleukin-6 (IL-6) gena (-174 G>C), kao i gena za monocitni hemoatraktantni protein-1(MCP-1, -2518 A>G), dovode se u vezu sa predispozicijom za nastanak nekolicine bolesti, ali je malo poznato o njihovom značaju u SSc.

Ciljevi: Istraživanje je imalo za cilj ispitati razlike u učestalosti promotorskih varijanti rs1800795 (-174 G>C) IL-6 gena i rs1024611 (-2518G/A) MCP-1 gena, kao i razlike u ekspresiji IL-17A, IL-17F, IL-6 i IL-23 u krvi obolelih od SSc sa različitom kliničkom slikom bolesti u odnosu na kontrolnu grupu zdravih ispitanika.

Ispitanici i metode: U studiji preseka učestvovala su 102 bolesnika sa SSc i 93 zdravih ispitanika koju su činili kontrolnu grupu. Za genotipizaciju promotorskih varijanti -2518 G/A MCP-1 gena i -174 C/G IL-6 gena korišćen je PCR-RFLP metod. Nivoi ekspresije IL-6, IL-17A, IL-17F i IL-23 mRNA mereni su pomoću qRT-PCR metode. Za merenje serumskih nivoa IL-17 i IL-23 korišćena je ELISA. Procena stepena oštećenja gastro-intestinalnog trakta (GIT-a) u SSc vršena je pomoću UCLA GIT 2.0 upitnika.

Rezultati: Uočena je pozitivna korelacija između dužine trajanja bolesti i nivoa IL-17A mRNA ($r = 0.41$, $p < 0.05$), IL-23mRNA ($r = 0.49$, $p < 0.05$) i IL-6 mRNA ($r = 0.4$, $p < 0.05$).

Nivoi ekspresije IL-6 bili su značajno viši kod obolelih od SSc u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0.05$). Nosioци C-alela za IL-6 gen imali su viši nivo ekspresije IL-6 (95.8 vs. 41.2, $p < 0.05$) i viši skor nadutosti (1.4 ± 0.9 vs. 0.78 ± 0.8 , $p = 0.05$) u poređenju sa G/G homozigotima. Nije primećena udruženost -2518G/A MCP-1 polimorfizma i kliničke slike bolesti. Nije bilo značajne razlike u raspodeli genotipova i učestalosti pojedinih alela ispitivanih genetskih varijanti IL-6 i MCP-1 gena između obolelih i zdravih ispitanika. Primećena je pozitivna

korelacija serumskog nivoa IL-23 i ukupnog skora oštećenja GIT-a ($r= 0.35$, $p<0.05$). Viši serumski nivoi IL-17 povezani su sa nižim vrednostima parametara plućne funkcije ($r = - 0.4$, $p< 0.05$).

Zaključak: Dužina trajanja bolesti utiče na nivoe ekspresije IL-6, IL-17 i IL-23 mRNA. Promotorska varijanta -174 C/G (prisustvo C-alela) IL-6 gena udružena je sa većom ekspresijom IL-6 i težim oštećenjem GIT-a. Bolesnici sa viši serumskim nivoima IL-17 imaju teže oštećenje plućne funkcije, dok su viši serumski nivoi IL-23 povezani sa većim stepenom oštećenja GIT-a u SSc.

Ključne reči: IL-6, MCP-1, IL-17, IL-23, gastrointestinalni trakt, oštećenje pluća

Naučna oblast: interna medicina

Uža naučna oblast: reumatologija

**POLYMORPHISM IN THE INTERLEUKIN-6
AND MONOCYTE-CHEMOATTRACTANT PROTEIN-1 GENES AND
INTERLEUKIN-17 AND INTERLEUKIN-23 EXPRESSION PROFILES IN
SYSTEMIC SCLEROSIS PATIENTS COMPARED TO HEALTHY CONTROLS**

Abstract

Introduction: Systemic sclerosis (SSc) is a disease of unknown origin. One of possible factors contributing to SSc development could be immunological disturbance regarding Th17 cells and secretion of interleukin-23 (IL-23/Th17 axis). Single nucleotide polymorphisms in proximal promoter of IL-6 gene (-174 G>C), as well as *MCP-1* gene (-2518 A>G), are associated with predisposition of several chronic diseases development, but little is known about their significance in SSc.

Aims: Study aimed to assess differences in frequencies of promoter variants rs1800795 (-174 G>C) IL-6 gene and rs1024611 (-2518G/A) *MCP-1* gene, as well as differences in IL-17A, IL-17F, IL-6 and IL-23 expression profiles in the blood of SSc patients with different clinical disease manifestations compared to healthy controls.

Subjects and methods: In this case-control study, 102 patients with SSc and 93 healthy controls were included. RCR-RFLP method was performed for genotyping promoter variants -2518 G/A of *MCP-1* gene and -174 C/G of IL-6 gene. The expression level of *IL-6*, IL-17A, IL-17F and IL-23 mRNA were determined by qRT-PCR method. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) was used for analysis of IL-23 and IL-17 serum protein levels. We used UCLA GIT 2.0 questionnaire to assess gastrointestinal involvement in SSc patients.

Results: We found a positive correlation between disease duration and expression levels of IL-17A mRNA ($r = 0.41$, $p < 0.05$), IL-23 mRNA ($r = 0.49$, $p < 0.05$) and IL-6 mRNA ($r = 0.4$, $p < 0.05$). The expression level of IL-6 gene was significantly higher in patients with SSc in comparison with healthy controls ($p < 0.05$). Carriers of C allele of IL-6 gene compared to those with G allele, showed higher expression of IL-6 gene (95.8 vs. 41.2, $p > 0.05$) and higher distension scale score (1.4 ± 0.9 vs. 0.78 ± 0.8 , $p = 0.05$). We found no significant correlation between the -2518G/A *MCP-1* polymorphism and disease manifestations. No significant differences in genotype distribution and allele frequency was observed between

patients and controls. Serum level of IL-23 positively correlated with total GIT score ($r= 0.35, p<0.05$). IL-17 serum levels negatively correlated with parameters of lung function ($r = - 0.4, p< 0.05$).

Conclusion: Levels of IL-6, IL-17 and IL-23 mRNA correlates with disease duration in SSc. The IL-6 gene variant -174 C/G (presence of C-allele) is associated with higher IL-6 gene expression and greater GIT impairment in patients with SSc. SSc patients with higher IL-17 levels have greater decline in lung function, while IL-23 levels correlate with more severe gastrointestinal involvement in SSc.

Key words: IL-6, MCP-1, IL-17, IL-23, gastrointestinal tract, lung disease

Field of science: internal medicine

Specialized field of science: rheumatology

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Sistemska skleroza.....	1
1.2.Klinička slika obolelih od SSc.....	1
1.2.1. <i>Raynaud</i> fenomen	1
1.2.2. Sklerodermija.....	2
1.2.3.Oštećenje pluća	3
1.2.4.Oštećenje srca.....	3
1.2.5. Oštećenje bubrega.....	4
1.2.6. Podtipovi bolesti.....	4
1.2.7. Oštećenje gastrointestinalnog trakta (GIT).....	5
1.2.8. Oštećenje mišića.....	5
1.3.Lečenje SSc.....	5
1.4. Imunska disregulacija u patogenezi SSc.....	6
1.5.Interleukin-6 u SSc.....	7
1.6.Monocitni hemoatraktantni protein-1 u SSc.....	8
1.7. Interleukin-23 i interleukin-17 u SSc.....	9
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	11
3. METOD ISTRAŽIVANJA.....	13
3.1. Tip studije i mesto istraživanja.....	14
3.2. Ispitanici.....	15
3.3. Procedura vađenja krvi.....	16
3.4. Procedura izolovanja DNK i mononuklearnih ćelija iz periferne krvi.....	16
3.5. Procedura izolovanja RNK iz mononuklearnih ćelija.....	16
3.6. Detekcija polimorfizma IL-6 i MCP-1 gena.....	16
3.7.Merenje relativne ekspresije IL-17, IL-23 i IL-6 gena.....	17
3.8. Statistička analiza	18
4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA.....	19
4.1. Karakteristike obolelih od SSc.....	20

4.2. Analiza -174 C/G IL-6 polimorfizma kod obolelih od SSc i zdravih ispitanika.....	21
4.2.1. Povezanost -174 C/G IL-6 polimorfizma i nivoa ekspresije IL-6 kod obolelih od SSc.....	22
4.2.2. Povezanost nivoa ekspresije IL-6 gena i kliničkih obeležja bolesti.....	22
4.2.3. Povezanost -174 C/G IL-6 polimorfizma i kliničkih obeležja bolest.....	22
4.3. Analiza -2518G/A MCP-1 polimorfizma kod obolelih od SSc i zdravih ispitanika.....	25
4.3.1. Povezanost -2518G/A MCP-1 polimorfizma i kliničkih obeležja bolesti.....	26
4.4. Analiza nivoa ekspresije IL-17 gena kod obolelih od SSc i zdravih ispitanika... 	27
4.4.1. Povezanost nivoa ekspresije IL-17 gena i kliničkih obeležja bolesti.....	27
4.5. Analiza nivoa ekspresije IL-23 gena kod obolelih od SSc i zdravih ispitanika....	30
4.5.1. Povezanost nivoa ekspresije IL-23 gena i kliničkih obeležja bolesti.....	30
4.6. Terapija Ciklofosamidom i nivoi ekspresije IL-17A, IL-17F i IL-23.....	34
5. DISKUSIJA.....	35
6. ZAKLJUČCI.....	42
7. LITERATURA.....	45

1.Uvod

1.2. Sistemska skleroza

Sistemska skleroza (SSc) je sistemska bolest vezivnog tkiva koju karakterišu aktivacija imunskog sistema, oštećenje malih krvnih sudova i pojačano stvaranje vezivnih vlakana koja se talože u kožu i visceralne organe (1). U početku bolesti dominira oštećenje krvnih sudova i tkiva, uz izvestan stepen zapaljenske reakcije, dok se kasnije pojačano stvaraju vezivna vlakna, što se ispoljava najuočljivijim znakom bolesti - tvrdom, zadebljalom kožom (sklerodermijom). Prevalancija SSc je 10-20 bolesnika sa SSc na 100 000 osoba, a novi slučajevi bolesti javljaju se kod 1-2 osobe na 100 000 godišnje (1). Od SSc obolevaju najčešće žene (ženski/muški pol = 4:1) starosti 35 do 64 godina (2, 3). Oštećenje pluća (intersticijska bolest pluća- IBP ili plućna arterijska hipertenzija-PAH) vodeći je uzrok smrtnosti u SSc (3).

Etiologija SSc podrazumeva složenu međuzavisnost genetike, činilaca u vezi sa polom i činilaca spoljašnje sredine. Patofiziološki mehanizmi koji dovode do razvoja bolesti uključuju oštećenje endotela, aktivaciju trombocita, proliferaciju fibroblasta i povećanje transformišućeg faktora rasta- β (TGF- β) (2). Izlaganje pojedinim hemijskim supstancama, među kojima su vinil-hlorid monomer, benzen, toluen i trihloretilen, može dovesti do oštećenja endotelinih ćelija i ispoljavanja bolesti sličnih SSc (1). Početna promena u SSc je oštećenje endotela sa suženjem lumena i začepljenjem malih krvnih sudova. Nakon toga dolazi do aktivacije ćelijskog imunskog odgovora (pretežno T limfocita), kao i humoralnog imunskog sistema (antinukleusna antitela) i pojačanog stvaranja vanćelijskih vezivnih vlakana (1, 2).

1.2.Klinička slika obolelih od SSc

1.2.1. *Raynaud* fenomen

Raynaud fenomen je najčešće prvi simptom SSc, mada se javlja i kod 10% zdrave populacije (3). Predstavlja epizodni, ograničeni i reverzibilni, bilateralni vazomotorni poremećaj kože prstiju (nekada nosa, ušiju ili usana). Karakteriše se promenom boje kože najpre u bledu, pa modru i na kraju crvenu boju, a nastaje kao odgovor na hladnoću, emotivni

stres ili spontano (3). Osobe sa *Raynaud* fenomenom i pozitivnim antinukleusnim antitelima treba uputiti na kapilaroskopiju, radi dopunskog ispitivanja u pravcu sistemske bolesti. Kapilaroskopija je bezbedna, neinvazivna metoda pomoću koje se procenjuje oštećenje mikrocirkulacije pregledom kapilara nokatne ploče.

Nalazi 4-10 puta širih kapilarnih petlji u odnosu na zdrave osobe, kao i polja bez kapilara, ukazuju na buduće ispojavanje SSc kod osoba sa *Raynaud* fenomenom. Izmene u morfologiji kapilara nokatne ploče u SSc vidjaju se znatno ranije od pojave prvih simptoma bolesti i odražavaju stepen oštećenja unutrašnjih organa, u čemu je dijagnostički značaj kapilaroskopije (3). U toku praćenja SSc, nalaz kapilaroskopije može pokazati jedan od sledeća tri šablona: a) rani (nekoliko džinovskih kapilara, odsustvo polja bez kapilara), b) aktivni (više džinovskih kapilara, polja mikrohemoragije, dezorganizacija arhitekture kapilara), c) kasni (prisutna polja bez kapilara, ramifikacija kapilara zbog neoangiogeneze). Kod osoba koje imaju *Raynaud* fenomen, na ranu dijagnozu SSc ukazuju: pozitivna autoantitela (antinukleusna, anticentromerna, anti-topoizomeraza I), pozitivan kapilaroskopski nalaz, prisutno tetivno trenje, edem prstiju ili „puffy“ šake i hipomotilitet jednjaka (4).

1.2.2. Sklerodermija

Jedno od glavnih obeležja SSc je zadebljanje kože koje nastaje zbog prekomerne proizvodnje kolagena tipa 1 od strane fibroblasta i taloženja glikozaminoglikana i fibronektina u vanćelijski matriks (4,5). Dolazi do gubitka dlake i znojnih žlezda u predelima zahvaćene kože. Stepenn progresije zadebljanje kože nije isti kod svakog bolesnika. Sklerodermija je najčešće ograničena na prste, šake i lice, mada i ostali delovi tela mogu biti zahvaćeni. U većini slučajeva, zahvaćena koža bez terapije atrofira ili omekša nakon 3-10 godina od početka bolesti. Na vrhovima prstiju se zbog oštećenja sitnih krvnih sudova i posledične ishemije i nekroze javljaju digitalni ulkusi, koji jako teško zarastaju i u zajednoj meri ometaju normalno funkcionisanje bolesnika. Stepenn zadebljanja kože nije pokazatelj stepena oštećenja unutrašnjih organa koji se vremenom pogoršava (5). Za procenu stepena oštećenja kože (debljine kože) koristi se modifikovani *Rodnan skin skor* (mRSS) koji

procenjuje kožu na 17 delova tela i čije se vrednosti kreću od 0 (najbolje stanje) do 51(najgore stanje) (5).

1.2.3.Oštećenje pluća

Oštećenje pluća u SSc započinje izmenama u krvnim sudovima pluća, obliteracijom plućnih kapilara, potom dolazi do zapaljenja i fibroze intersticijuma uz razvoj intersticijske bolesti pluća (IBP) i plućne arterijske hipertenzije (PAH). Klinički se ova stanja ispoljavaju lakim zamaranjem, dispnojom pri naporu i suvim kašljem (7, 8).

Bibazilarna IBP prisutna je kod većine SSc bolesnika nakon HRCT (*high resolution computed tomography*) pregleda, čak i kod onih bez simptoma dispnoje. Klinički značajna IBP koja podrazumeva postojanje simptoma, restriktivni nalaz pri proceni plućne funkcije ili ekstenzivni nalaz na HRCT prisutna je kod 20% obolelih od SSc i zahteva uvođenje terapije za IBP. Za procenu progresije IBP i odgovora na terapiju, mere se parametri plućne funkcije. Pad vrednosti FVC (*forced vital capacity*) za više od 10% ili pad vrednosti DLCO (*diffusing lung capacity for carbon monoxide*) za više od 15% ukazuje na progresiju bolesti (7).

Za postavljanje dijagnoze PAH neophodno je uraditi desnostranu kateterizaciju srca. Nalaz povišenog pritiska u plućnoj arteriji (mean pulmonary artery pressure - mPAP \geq 25 mmHg) i smanjenog pritiska u plućnim kapilarima (pulmonary capillarywedge pressure – PCWP \leq 15 mmHg) ukazuje na nalaz PAH (7, 8). Pored navedenog, u riziku za razvoj PAH su i bolesnici sa vrednošću DLco% <60% (u odsustvu proširene forme IBP) i oni kod kojih je odnos FVC%/DLco% >1.

Ehokardiografski pokazatelji razvoja PAH u SSc su : sistolni pritisak desne komore >40mmHg, brzina mlaza preko trikuspidalne valvule (TR jet)>2.8 m/s, dilatacija /hipokinezija desne komore, dilatacija desne pretkomore i perikardni izliv (8).

1.2.4.Oštećenje srca

Oštećenje srca u SSc najčešće se vidja kao mikrovaskularna bolest koronarnih arterija (>60%), disfunkcija desne komore (38%, može biti primarna - zbog oštećenja miokarda bolešću ili sekundarna - zbog razvoja PAH, disfunkcije leve kore, IBP), dijastolna disfunkcija

leve komore (30-35%), perikardni izliv (5-16%) i sistolna disfunkcija leve komore (5.4%). Fibroza miokarda, u vidu malih ognjišta ožiljno izmenjenog tkiva, elektrokardiografski se ispoljava poremećajima ritma i sprovodjenja (8, 9). Porast vrednosti natriureskih peptida (BNP i pro NT-BNP) takodje je pokazatelj oštećenja srca u SSc (9).

1.2.5. Oštećenje bubrega

Zbog oštećenja arteriola bubrega u SSc, dolazi do aktivacije sistema renin-angiotenzin-aldosteron, što dovodi do još težeg stepena oštećenja bubrežnih arteriola i smanjenja protoka krvi kroz bubrege. Ovo stanje se klinički ispoljava napadima povišenog krvnog pritiska (> 150/90 mmHg) i ako se hitno ne sprovede lečenje antihipertenzivima dolazi do razvoja sklerodermijske renalne krize (SRC) sa razvojem bubrežne slabosti (porast uree i kreatinina u serumu) i anurije (8). Pored navedenog, u SRC postoji retinopatija stepena III/IV, trombocitopenija i nalaz šistocita usled mikroangiopatske hemolize (8).

1.2.6. Podtipovi bolesti

Postoje dva podtipa bolesti, ograničena kožna SSc (lcSSc) i difuzna kožna SSc (dcSSc) (4).

Bolesnici sa lcSSc imaju zadebljanje kože ograničeno na vrat, lice i distalne okrajke gornjih i donjih ekstremiteta (ispod laktova i kolena). Obično ovi bolesnici imaju *Raynaud* fenomen koji traje godinama pre pojave bolesti, gastroezofagealni refluks, telangiektazije (proširenje arteriola, venula i kapilara), kalcifikacije kože (kalcinoza) i edem prstiju ili sklerodaktiliju kao jedinu kožnu manifestaciju bolesti (7, 8). Oboleli od lcSSc sa pozitivnim anti-topoizomernim autoantitelima imaju veliki rizik za razvoj progresivne IBP, dok oni kod kojih su pozitivna anticentromerna autoantitela imaju veći rizik od razvoja PAH (8).

Bolesnici sa dcSSc imaju zadebljanje kože proksimalno od laktova, kolena, kao i zadebljanje kože trupa. Kod njih se najčešće na početku bolesti vide otečene šake (*puffy hands*) i brzo progresivno zadebljanje kože (4, 5). Kod ovih bolesnika, *Raynaud* fenomen je

najčešće prisutan manje od godinu dana pre razvoja bolesti. Rizik za razvoj renalne krize je viši kod obolelih od dcSSc koji boluju kraće od 4 godine, uzimaju Pronison 20mg dnevno, imaju tetivno trenje i pozitivna anti-RNA-polimeraza III autoantitela (5, 6). Svi bolesnici sa dcSSc imaju veliki rizik za razvoj IBP i PAH, naročito u prvih 5 godina trajanja bolesti (6-8).

1.2.7. Oštećenje gastrointestinalnog trakta (GIT)

Oštećenje GIT-a prisutno je kod 90% obolelih od SSc i predstavlja treći po redu uzrok smrtnosti u SSc (9, 10). Bilo koji deo GIT-a može biti zahvaćen bolešću, što dovodi do širokog spektra simptoma, od gastro-ezofagealnog refluksa do fekalne inkontinencije (11-13). Telangiektazije želudačne sluznice dovode do stanja koje se naziva “watermelon stomach” ili GAVE (*gastric antral venous ectasia*) i može biti uzrok anemije usled hroničnog nedostatka gvožđa kao i akutnog krvarenja iz GIT-a (10). Posledice oštećenja GIT-a su smanjen unos hrane, malapsorpcija i gubitak telesne mase, što dovodi do lošije prognoze bolesti i smanjenog kvaliteta života (11, 12). Najčešći uzrok simptoma oštećenja GIT-a je smanjena crevna peristaltika usled oštećenja mienteričkog plexusa zbog koje dolazi do staze i dilatacije creva, prenaseljenosti creva bakterijama, a kasnije u toku bolesti i do malapsorpcije (13).

1.2.8. Oštećenje mišića

Kod obolelih od SSc razvija se blagi stepen miopatije, najčešće kao proksimalna miopatija sa blagim porastom mišićnih enzima. Ređe je prisutan miozitis sa značajnim povećanjem mišićnih enzima, u sklopu sindroma preklapanja SSc sa polimiozitsom (9).

1.3. Lečenje SSc

Izbor adekvatne terapije u SSc i dalje predstavlja izazov, jer ne postoji lek čija bi primena kod većine obolelih u značajnoj meri olakšala simptome bolesti u unapredila kvalitet života. Terapija Raynaud fenomena, naročito ukoliko je pozitivan kapilaroskopski nalaz podrazumeva primenu blokatora kalcijumskih kanala, inhibitori fosfodiesteraze-5 (koji se

koriste i u terapiji PAH u sklopu SSc), bosentana, iloprosta. Za simptome oštećenja GIT-a primenjuju se prokinetici, blokatori protonske pumpe i antibiotici. U terapiji IBP koristi se ciklofosamid, mikofenolat mofetil, a za sklerodermiju metotreksat (i ciklofosamid). Dokazan je povoljan efekat transplantacije matičnih ćelija hematopoeze u terapiji IBP i oštećenja kože, naročito kod rane SSc (koja traje manje od 4 godine) sa lošim prognostičkim znacima (dcSSc, mRSS>15, oštećenje bubrega i pluća). Nema dovoljno pouzdanih podataka o efektu bioloških lekova u SSc, ali za sada postoje podaci o povoljnom efektu tocilizumaba na kožu obolelih od SSc, kao i rituximaba u terapiji IBP u sklopu SSc.

1.4. Imunska disregulacija u patogenezi SSc

Imunska homeostaza predstavlja fiziološko stanje ravnoteže između T-regulatornih i T-efektorskih ćelija. Genetska osnova, kao i činioci sredine, mogu uticati na poremećaj ove ravnoteže u korist patogenih T efektorskih ćelija, što dovodi do razvoja autoimunosti, zapaljenja i oštećenja tkiva. Patogenetski mehanizmi u nastanku SSc ostaju nerazjašnjeni, ali postoje dokazi o značaju imunske disregulacije u razvoju SSc (14). Izmene u ćelijskoj imunosti karakteriše porast broja CD4+T ćelija kako u koži, tako i u krvotoku obolelih od SSc (15, 16). CD4+T ćelije čine heterogenu grupu u okviru koje se na osnovu razlika u profilu transkripcionih faktora i razlika u sekreciji citokina, izdvajaju nekoliko podtipova ćelija. T helper 17 (Th17) ćelije predstavljaju posebnu podvrstu CD4+ T ćelija (17, 18) čija se polarizacija ostvaruje preko IL-6, IL-23, TGF- β i *ROR γ t* (*retinoic acid receptor-related orphan receptor*). Pored *ROR γ t*, transkripcioni faktor STAT-3 (preko koga IL-6 ostvaruje svoje dejstvo) takodje je neophodan za stvaranje Th17 ćelija. Dokazano je da je proporcija Th17 značajno povećana kod obolelih od SSc, u odnosu na zdrave osobe (19, 20). IL-17 ima snažan proinflamatorni efekat i ima važnu ulogu u nastajanju brojnih autoimunih oboljenja, među kojima je i reumatoidni artritis (18). Ranija istraživanja dokazala su ulogu IL-23/Th17 osovine u nastanku psorijaze, psorijaznog artritisa i ankilozirajućeg spondilitisa(18).

IL-23 deluje na Th17 ćelije tako što stimuliše sekreciju IL-17 A, IL-17F, IL-23, IL-6, IL-22 i TNF- α , koji su ključni za privlačenje i aktivaciju neutrofila, kao i stimulaciju neimunskih ćelija na produkciju proinflamatornih medijatora, kao što su IL-6, IL-1, TNF- α ,

interferon (IFN) gama, transformišući faktor rasta (TGF) beta i trombocitni faktor rasta (platelet derived growth factor -PDGF) (21).

1.5. Interleukin-6 u SSc

IL-6 je citokin sa različitim efektima na nivou celog tela, uključujući stimulaciju odgovora akutne faze, stimulaciju diferencijacije osteoklasta, T ćelija i B-ćelijske proliferacije (22). Kako se IL-6 vezuje slabim afinitetom za svoj receptor IL-6R, koji može biti na membrani ćelija ili u solubilnoj formi (sIL-6R). Nakon vezivanja IL-6 za IL-6R na membrani ćelije, neophodno je i prisustvo transmembranskog proteina, glikoproteina 130 (gp 130) za sprovođenje signala. Pored IL-6, gp130 koriste i drugi citokini (kao što su IL-11, leukemija inhibitorni faktor, onkostatina M, cilijarni neurotrofični faktor kardiotrofin-1, IL-27, IL-31) u procesu signalizacije (23). IL-6 može da spasi T ćeliju od prerane smrti, čime se održava zapaljenski odgovor u tkivu i povećava broj T ćelija. Solubilni gp130 se vezuje velikim afinitetom za kompleks IL-6/sIL-6R čime onemogućava dalji prenos signala (deluje kao negativni regulator). Dokazano je da oboleli od lcSSc imaju viši nivo serumskog gp130, što može uticati na blažu formu bolesti, onesposobljavanjem IL-6 signalnog puta (24). *Signalni transdjuser i aktivator transkripcije-3 (STAT-3)* je centralni transkripcioni faktor na koji deluje IL-6 signalizacija. U brojnim autoimunim bolestima dokazana je povećana aktivacija STAT-3 (24). *Narazaki i sar.* pokazali su u in vitro eksperimentu da IL-6 signalizacija preko STAT-3 dovodi do pojačane ekspresije mRNA za kolagen tipa 1 (24). Dokazano je da IL-6 ima važnu ulogu u patogenezi SSc i predstavlja potencijalni biomarker u SSc (1). Nivo ekspresije IL-6 koreliše sa dužinom trajanja bolesti i oštećenjem pojedinih visceralnih organa (23-26). Povećana ekspresija IL-6 u ranoj fazi difuzne SSc (dcSSc) dovodi se u vezu sa težim oštećenjima kože i lošijom prognozom bolesti (24). Nivoi IL-6 su takođe povećani i u tečnosti dobijenom bronhoalveolarnom lavižom kod obolelih od SSc (23). Serumski nivo IL-6 može poslužiti kao nezavisni prediktor pada vrednosti difuzijskog kapaciteta za ugljen monoksid (DLCO) kod obolelih od SSc (27) i pozitivno koreliše sa stepenom plućne fibroze i nalazom plućne hipertenzije (28, 29). Jedno od glavnih obeležja SSc je povećano taloženje kolagena. Primećeno je da dodatak IL-6 dermalnim fibroblastima dovodi do pojačane sekrecije kolagena (23, 24). Dejstvo IL-6 na fibroblaste ostvaruje se ili

direktnim putem aktivacije transkripcije ili indirektno delujući preko citokina koji se vezuju za receptore na fibroblastima i stimulišu sekreciju kolagena (30).

U proksimalnom promotoru IL-6 gena nalazi se nekoliko polimorfizama tipa zamene jednog nukleotida (*single nucleotide polymorphism* - SNP) (31). Najbolje proučen je polimorfizam rs 1800795 (poznat kao -174 C/G) koji se nalazi između *cAMP responsive element binding protein*-a i *C/EBP-b* vezujućih domena. Prisustvo G alela u polimorfizmu rs1800795 dovedeno je u vezu sa povećanom koncentracijom IL-6 u serumu i povećanom prevalencom sistemskog juvenilnog inflamatornog artritisa (32). Kasnijim istraživanjima došlo se do oprečnih rezultata o povezanosti rs1800795 polimorfizma, nivoa IL-6 i rizika za razvoj širokog spektra bolesti (33-36). Najnovija istraživanja pokazuju da je polimorfizam IL-6 gena jedan od faktora koji utiču na podložnost razvoju SSc (37). Analizom fenotipa, primećen je trend povezanosti C alela rs1800795 (-174 C/G) i difuznog oblika bolesti (37).

1.6. Monocitni hemoatraktantni protein-1 u SSc

Monocitni hemoatraktantni protein-1 (MCP1, CCL2) jedan je od najmoćnijih hemotaktičnih citokina za koje se zna da su glavni medijatori ćelijske infiltracije na mesta povrede (38). Pripada CC familiji hemokina za koje se geni nalaze na hromozomu 17. Hemokini se sekretuju kao odgovor na dejstvo proinflamatornih citokina i imaju ulogu u privlačenju monocita, neutrofila i limfocita na mesto oštećenja tkiva. Privučene ćelije eksprimiraju hemokinske receptore i kreću se u smeru više koncentracije hemokina. Hemokini indukuju hemotaksu aktivacijom *G-protein vezanog receptora (GPCR)* i unutarćelijske signalne kaskade. MCP-1 produkuju razni tipovi ćelija (endotelne, fibroblasti, epitelne, glatko-mišićne, mezengijane, astrociti, monociti i mikroglijane ćelije), neke konstitutivno, a neke nakon dejstva oksidativnog stresa, citokina ili faktora rasta. Glavni izvor MCP-1 su monociti i makrofagi. MCP-1 reguliše migraciju i infiltraciju monocita, memorijskih T ćelija i NK ćelija i deluje kao modulator zapaljenja, kao i modulator oporavka tkiva nakon povrede (38). Dokazana je uloga MCP-1 u razvoju Th2 ćelija i aktivaciji promotora IL-4 gena. Ćelije zidova krvnih sudova, kao i one u cirkulaciji, sekretuju MCP-1 koji je važan medijator privlačenja monocita u zid krvnog suda (38). Skorašnja istraživanja su pokazala povećan nivo MCP-1 u aterosklerotskim lezijama (39, 40) što govori o značajnosti

MCP-1 u patogenezi oštećenja krvnih sudova. MCP-1 indukuje polarizaciju T helper 2 ćelija (41) i stimuliše produkciju kolagena u fibroblastima, preko specifičnih receptora i povećanjem ekspresije TGF β (42). Dokazana je povećana ekspresija MCP-1 u fibroblastima tokom razvoja skleroze (38), što dovodi do regrutovanja monocite i makrofaga na mesta oštećenja kože (43). Povećani serumski nivoi MCP-1 kod obolelih od SSc opadaju paralelno sa procesom poboljšanja kožnih lezija i povezani su sa prisustvom IBP (44, 45).

Malo se zna o faktorima koji utiču na ekspresiju *MCP-1* gena (44). Poznato je da prisustvo SNP u regionu regulacije ekspresije MCP-1 gena, tj zamena nukleotida na poziciji -2518G/A ima udela u regulaciji ekspresije MCP-1. Skoro je uočena povezanost između prisustva G alela na poziciji -2518 u MCP-1 promotoru i nastanka infarkta miokarda (45), hipertenzije i podložnosti aterosklerozi (46). Analiza polimorfizma -2518 G/A za MCP1 gen, pokazala je da prisustvo G-alela udruženo sa visokom produkcijom MCP-1 može da dovede do razvoja SSc (44). Pokazano je da ova alelska varijanta može doprineti razvoju tkivne fibroze različitim mehanizmima i predstavlja faktor rizika za SSc (44).

1.7. Interleukin-23 i interleukin-17 u SSc

IL-23 je heterodimer koji se sastoji iz dve podjedinice, p40 (koju deli zajedno sa IL-12) i p19 (47, 48). Profesionalne antigen-prezentujuće ćelije (dendritične ćelije, makrofagi i monociti) sekretuju IL-23 kao odgovor na razne bakterijske i gljivične antigene (*pathogen-associated molecular patterns*-PAMP), kao i na vezivanje kostimulatornih molekula liganada (47). IL-23 zajedno sa TGF- β i zapaljenskim citokinima kao što su IL-6, IL-21 i IL-1 β , ima ključnu ulogu u proliferaciji i preživljavanju Th17 ćelija, koje imaju ključnu ulogu u antimikrobnom imunskom odgovoru, kao i u razvoju autoimunosti. IL-23 deluje preko svog receptora koji se nalazi na membrani Th17 ćelije i sastoji se iz dva dela: IL-12 receptor B1 (IL-12RB1) i IL-23 alfa podjedinica p19 (IL-23A). IL-23A vezuje se za Janus kinazu 2 (JAK-2) i STAT-3 koji se fosforiliše, dezinhibiše ROR γ τ u CD4⁺T ćelijama i vezuje se za promotor IL-17, čime se započinje ekspresija IL-17A i IL-17F (49, 50). IL-12RB1 direktno se vezuje za tirozin kinazu 2 (*Tyk 2*). IL-23A i JAK2 ostvaruju dejstvo i preko aktivacije fosfoinozimid-3 kinaze (PI3K)/RAC-alfa serin/treonin kinaze (AKT) i Nuklearni- faktor

kappaB (NF-kB) puta, koji je važan za sintezu IL-17. PI3K/AKT put je važan i za fosforilaciju STAT-3.

Familija IL-17 sastoji se od 6 članova (IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E i IL-17F), IL-17A i IL-17F dele najsličniju sekvencu aminokiselina (50% aminokiselina je identično). Obe forme IL-17 mogu zajedno biti sekretovani kao homodimeri spojeni disulfidnom vezom ili kao heterodimeri koji se vezuju za isti receptor (IL-17RA/RC, u odnosu 2:1)(51, 52). IL-17A/F heterodimer se sekretuje u većoj količini dok IL17A/A homodimer ima veću bioaktivnost (53). Obe ove izoforme imaju sličnu biološku aktivnost bitnu za razvoj zapaljenja i odbranu domaćina od infekcija tako što indukuju ekspresiju gena koji kodiraju proinflamatorne citokine (TNF, IL-1, IL-6, G-CSF i GM-CSF), hemokine (CXCL1, CXCL5, IL-8, CCL2 i CCL7), antimikrobne peptide (defenzine i S100 proteine) i matriks metaloproteinaze (MMP1, MMP3 i MMP13) (54). IL-17 je ključan citokin za regrutaciju, aktivaciju i migraciju neutrofila, a utiče i na ne-imunske ćelije, kao što su fibroblasti, endotelne ćelije, glatke mišićne ćelije disajnih puteva i epitelne ćelije, indukcijom sekrecije pro-inflamatornih medijatora (55, 56).

Proliferacija T-ćelija i sekrecija citokina igra važnu ulogu u patogenezi SSc (57, 58). Primećeno je da T ćelije iz periferne krv i fibrotskih lezija kože i pluća obolelih od SSc, pojačano sekretuju IL-17 (59). Kod obolelih od SSc, serumski nivoi IL-17 i IL-23 su bili viši nego u zdravoj populaciji (59, 60, 61), naročito na početku bolesti (59). Suprotno ovim rezultatima, *Olewicz-Gawlik i sar*, primetili su da oboleli od SSc kod kojih su zahvaćena pluća, imaju značajno niže serumske nivoe IL-17 i IL-23 u poređenju sa kontrolnom grupom zdravih ispitanika (14). Oprečni rezultati postoje i u drugim objavljenim istraživanjima, gde nije utvrđena povezanost između serumskih nivoa IL17 i IL-23 i oštećenja srca, bubrega ili pluća u SSc (59, 62, 63).

2.Ciljevi istraživanja

Genetska pozadina SSc još uvek nije u potpunosti rasvetljena. Do sada objavljene studije koje su se bavile ispitivanjem polimorfizma -2518 A>G MCP-1 i -174 G>C IL-6 gena dokazale su uticaj ovih genotipova na predispoziciju za nastanak nekolicine bolesti, ali je malo poznato o njihovom značaju u SSc. Imajući u vidu značajnost uloge IL-23/Th17 osovine u imunopatogenezi SSc kao i oprečne rezultate ranije objavljenih istraživanja, ukazuje se potreba za daljim istraživanjima uloge IL-17, IL-23, IL-6 i MCP-1 u SSc.

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

1. Ispitati razlike u učestalosti promotorskih varijanti rs1800795-174 G>C IL-6 gena i rs1024611-2518G/A MCP-1 gena, kao i razlike u ekspresiji IL-17A, IL-17F, IL-6 i IL-23 u ćelijama krvi obolelih od SSc u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika.
2. Ispitati povezanost promotorskih varijanti rs1800795-174 G>C IL-6 gena i rs1024611-2518G/A MCP-1 gena, kao i ekspresije IL-17A, IL-17F, IL-6 i IL-23 u krvi obolelih od SSc sa kliničkom slikom bolesti.

3. Metod istraživanja

3.1. Tip studije i mesto istraživanja

Opservaciona studija preseka, obuhvatila je 102 bolesnika sa SSc, lečenih na Institutu za reumatologiju u Beogradu i 93 zdravih ispitanika koji su činili kontrolnu grupu, uporedivu po polu i starosti. Istraživanje je sprovedeno u saradnji sa Institutom za molekularnu genetiku i genetsko inženjerstvo u Beogradu. Etički odbor Instituta za reumatologiju je odobrio istraživanje i svi ispitanici su potpisali Informisani pristanak o prihvatanju učešća u istraživanju u skladu sa Helsinškom deklaracijom. Ispitivanje je obuhvatilo bolesnike koji ispunjavaju EULAR 2013 klasifikacione kriterijume za SSc (64) sa ukupnim skrom ≥ 9 (Tabela 1) i imaju zahvaćen bar jedan visceralni organ (pluća, srce, bubreg ili gastrointestinalni trakt).

Tabela 1. EULAR 2013 klasifikacioni kriterijumi za SSc

Kriterijum	Skor
Zadebljanje kože obe šake proksimalno od MCP zglobova (dovoljan kriterijum)	9
Zadebljanje kože prstiju:	
- "puffy" fingers	2
- sklerodaktilija (proksimalno od PIP zglobova, a distalno od MCP zglobova)	4
Ulkusi na jagodicama prstiju	2
Ožiljci na jagodicama prstiju	3
Telangiektazija	2
Patološki nalaz na kapilaroskopiji	2
PAH	2
IBP	2
Raynaud fenomen	3
Autoantitela u vezi sa SSc (anticentromerna, anti-topoizomeraza I, anti-RNA polimeraza III)	3

MCP-metakarpofalangealni zglobovi, PIP-proksimalni interfalangealni zglobovi, PAH-plućna arterijska hipertenzija, IBP- intersticijska bolest pluća

3.2 Ispitanici

Za svakog bolesnika u studiji beleženi su sledeći podaci: godište, pol, trajanje bolesti, oblik bolesti (limitirana ili difuzna forma), laboratorijski pokazatelji (SE, klirens kreatinina, C3 i C4, autoantitela), aktivnost bolesti, stepen zahvaćenosti kože (modifikovani Rodnan skin skor- mRSS), pokazatelji funkcije pluća (VC-vital kapacitet, DLCO-koeficijent difuzije za CO), nalaz plućne fibroze na radiografiji grudnog koša (RTGu) ili snimanjem grudnog koša kompjuterizovanom tomografijom visoke rezolucije (HRCT) , kao i nalaz ultrazvučnog (EHO) pregleda srca. Trajanje bolesti je definisano kao vreme od pojave prvog narednog simptoma ili znaka bolesti nakon pojave Raynaud-ovog fenomena (prvi non-RP simptom ili znak) do uključenja u istraživanje. Na osnovu trajanja bolesti, bolesnici su podeljeni u 4 grupe: od 0 do 5 godina, od 6 do 10 godina, od 11 do 15 godina i više od 15 godina. Za merenje aktivnosti bolesti, korišćeni su kriterijumu koje su definisali *Valentini i sar.* [65]. Bolesnici su podeljeni u dve grupe u zavisnosti od stepena zahvaćenosti kože [4]. Prva grupa je imala difuzni oblik, a druga lokalizovani oblik SSc. Za procenu kvaliteta života i stepena zahvaćenosti gastrointestinalnog trakta (GIT-a), ispitanici su popunjavali upitnik UCLA GIT 2.0 (The UCLA Scleroderma Clinical trial Consortium GIT 2.0) (66).

UCLA GIT 2.0 upitnik služi za samoprocenu kvaliteta života (HRQOL) i težine gastrointestinalnih (GIT) simptoma u SSc [66]. Čine ga 34 pitanja podeljena u 7 skala za procenu učestalosti simptoma refluksa, nadutosti, dijareje, fekalnog prljanja, konstipacije, kao i emotivnog blagostanja i socijalnog funkcionisanja. Sve skale se boduju od 0 (najbolje stanje) do 3 (najgore stanje) sem dijareje i konstipacije čiji se bodovi kreću od 0 do 2.5. Ukupni rezultat GIT 2.0 upitnika (ukupni GIT skor) je prosek vrednosti svih skala sem konstipacije i kreće se od 0 (najbolje stanje) do 3 (najgore stanje). **UCLA GIT 2.0** upitnik je prethodno adaptiran i validiran na srpskom jeziku (67).

3.3 Procedura vađenja krvi

Nakon potpisivanja pristanka za istraživanje, svakom ispitaniku je izvađeno oko 15 ml krvi iz kubitalne vene. U prvoj epruveti krv je mešana sa 3,8% Na-citratom kao antikoagulansom u odnosu 9:1, a iz druge epruvete izolovan je serum, koji se potom čuvao na -20°C.

3.4. Procedura izolovanja DNK i mononuklearnih ćelija iz periferne krvi

Za izolaciju DNK iz periferne krvi korišćen je *QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Nemačka)*. Iz ostataka uzoraka periferne krvi izolovane su mononuklearne ćelije centrifugiranjem na gradijentu gustine pri čemu je korišćen rastvor fikola (*Ficoll-Plaque PLUS, GE Healthcare Life Sciences, UK*), resuspendovane u *TRI Reagent (Ambion)* i čuvane na -80°C.

3.5. Procedura izolovanja RNK iz mononuklearnih ćelija

Za izolaciju RNK iz mononuklearnih ćelija korišćen je *TRI Reagent (Ambion)*. 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 predstavlja unapređen klasični metod izolacije RNK definisan od strane Chomczynski P & Sacchi N (68).

3.6. Detekcija polimorfizma IL-6 i MCP-1 gena

U svrhu detekcije prisustva varijanti rs1800795 (-174 G>C) u promotoru gena IL-6 i rs1024611 (-2518 A>G) u promotoru gena MCP-1 korišćen je **PCR-RFLP** (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*). Korišćeni su sledeći parovi prajmera: *forw*: 5'-GGAGTCACACACTCCACCT-3', 19 bp, Tm=59 °C, Metabion International AG i *rev*: 5'-CTGATTGGAAACCTTATTAAG-3', 21 bp, Tm=54 °C, Metabion International AG, za rs1800795, kao i *forw*: 5'-GAGTGGGAATTTCCACTCACTTCTCTC-3', 27 bp, Tm=65 °C, Eurofins i *rev*: 5'-CTGAGTGTTACATAGGCTTCTGAGTGT-3', 28

bp, $T_m=65.1$ °C, Eurofins, za rs1024611. Pored navedenog, korišćena je i Taq polimeraza (*Kapa Taq PCR Kit, Kapa Biosystems, US*), restrikcioni enzim Hin1 II (5 U/ μ l, *TermoFisherScientific*) za detekciju varijante rs1800795 *IL-6* gena, odnosno PvuII (*Fast Digest, TermoFisher Scientific*) za detekciju varijante rs1024611 MCP-1 gena. Fragmenti PCR proizvoda nastali delovanjem restrikcioni enzima vizuelizovani su elektroforezom na 3% agaroznom gelu (korišćenjem CCD kamere).

3.7. Merenje relativne ekspresije IL-17, IL-23 i IL-6 gena

Nivo ekspresije gena IL-17 (izoforme A i F), IL-23 i IL-6 iz mononuklearnih ćelija periferne krvi meren je metodom kvantitativnog PCR (qPCR, *real time PCR*). Ova metoda omogućava preciznu kvantifikaciju dobijenog PCR produkta nakon svakog završenog pojedinačnog ciklusa PCR reakcije, u realnom vremenu. Osnovne tehnike koje se koriste u qPCR metodi su *TaqMan* i *SYBR Green*.

TaqMan tehnika koristi 5'→3' egzozonukleaznu aktivnost Taq polimeraze i probu obeleženu sa dve fluoroboje (na 5' kraju je R-boja, a na 3' kraju Q-boja) koja se vezuje nizvodno od prajmera i komplementarna je delu sekvence koji se umnožava. Detektibilna emisija fluorescencije dešava se nakon uklanjanja hibridizovane probe sa DNK lanca uz pomoć Taq polimeraze. Intenzitet fluorescencije proporcionalan je količini umnoženih molekula DNK. U relativnoj kvantifikaciji, pored umnožavanja ciljne sekvence, vrši se i umnožavanje endogene kontrole koju najčešće predstavlja konstitucionalno eksprimiran ("housekeeping") gen.

SYBR Green tehnika zasniva se na vezivanju fluoroboje za žleb dvolančanih produkata DNK, pri čemu je nivo emisije svetlosti proporcionalan zastupljenosti ciljne DNK u uzorku.

Za merenje relativne ekspresije IL-17, IL-23 i IL-6 gena, korišćeni su kitovi prajmera i proba za IL-23 (Hs00900828_g1), IL-17A (Hs00174383_m1), IL-17F (Hs00369400_m1), IL-6 (Hs01018347m1). Relativna ekspresija gena određivana je na aparatu *7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystem)*, upotrebom *TaqMan* tehnike za određivanje ekspresije gena IL-17 i IL-23, dok su nivoi ekspresije gena IL-6 praćeni upotrebom *SYBR Green* tehnike. Detekcija relativnog nivoa ekspresije odabranih gena analizirana je upotrebom

komparativne ddCT metode, koristeći medijanu nivoa ekspresija gena od interesa u okviru grupe zdravih kontrola kao kalibrator za ove gene.

Za detekciju prisustva i određivanje koncentracije IL-17 i IL-23 u serumu, korišćen je **ELISA** metod, kvantitativni sendvič enzimski imunoesej (Quantikine ELISA Human IL-23 and IL-17 assay, R&D Systems, US).

3.8. Statistička analiza

Za prikaz osnovnih karakteristika ispitanika korišćene su metode deskriptivne statistike. Značajnost razlika između grupa testirana je Man-Whitney U-testom za kontinualna obeležja, ili Student-ovim t testom, u zavisnosti od toga da li obeležje parametarsko ili neparametarsko. χ^2 test korišćen je za poređenje kategoričnih varijabli. Za poređenje neparametarskih varijabli više nezavisnih uzoraka upotrebljen je Kruskal-Wallis test. Korelacije među varijablama unutar grupa, u zavisnosti od prirode obeležja, testirane su pomoću Spearman-ovog ili Pearson-ovog korelacijskog koeficijenta (r). Za ispitivanje razlike u učestalosti promotorskih varijanti rs1800795-174 G/C IL-6 gena i rs1024611-2518G/A MCP-1 gena, kao i ispitivanje njihove povezanosti sa kliničkom slikom bolesti, broj ispitanika izabran je tako da omogući dovoljnu statističku snagu (0.8, α 0.05) za detekciju efekta u tabelama kontigencije. Za merenje statističke snage korišćene su ranije objavljeni podaci o učestalosti G/C-174 IL-6 i -2518G/A MCP-1 polymorfizma u opštoj populaciji [69]. Univarijantnim i multivarijantnim linearnim regresionim modelima ispitivano je prisustvo konfauding faktora. Sve statističke analize vršene su u SPSS-u (ver. 16, Medicinski fakultet, Univerziteta u Beogradu). Statistička značajnost definisana je kao p - vrednost <0.05 .

4. Rezultati

4.1. Karakteristike obolelih od SSc

Od ukupno 102 bolesnika sa SSc, 80 je imalo limitiran oblik bolesti, a njih 22 imalo je difuzni oblik. Većina bolesnika bila je ženskog pola (86/102), životne dobi 32-79 godina (srednja vrednost 58.4 ± 9.1 godina), kod kojih je bolest trajala 0.3- 32 godine (srednja vrednost 8 ± 6.79 godina). Karakteristike ispitanika predstavljene su u *Tabeli 2*.

Tabela 2. Karakteristike bolesnika sa SSc i kontrolne grupe zdravih ispitanika.

	SSc bolesnici	Kontrolna grupa
Obeležje	N=102	N=93
Godine starosti, srednja vrednost (SD)	58.4 (9.1)	57.6 (9.3)
Ženski pol, n. (%)	90 (88.2)	80 (86.0)
Oblik bolesti, n. (%)		
Limitirana	60 (58.8)	
Difuzna	42 (41.2)	
SSc-specifična autoantitela		
Anticentromerna	35(42.2)	
Anti-Scl70	27(32.5)	
Trajanje bolesti (god.), srednja vrednost (SD)	8.0 (6.7)	
Modifikovani Rodnan skin skor, srednja vrednost (SD)	9.6 (6.9)	
Indeks aktivnosti bolesti, srednja vrednost (SD)	2.6 (1.7)	
Forsirani Vitalni Kapacitet (FVC) % očekivani, srednja vrednost (SD)	94.7 (19.6)	
Difuzijski Kapacitet (DLCO)% očekivani, srednja vrednost (SD)	64.7 (18.9)	
DLCO <70%, n. (%)	55 (53.9)	
FVC/DLCO>1.6, n. (%)	28 (27.5)	
Plućna fibroza, n. (%)	28 (27.5)	
Oštećenje gastrointestinalnog trakta, n. (%)	91 (89)	

Plućnu fibrozu imalo je 28 bolesnika (27.5%), a vrednost DLCO<70% je izmeren kod 55 bolesnika (53.9%). Simptomi oštećenja gastrointestinalnog trakta bili su prisutni kod 87% obolelih od SSc. Srednje vrednosti bodova na skalama za procenu stepena oštećenja GIT-a, kretale su se od 0.31 za fekalno prljanje do 0.89 za nadutost (*Tabela 3*). Oboleli od SSc su se najviše žalili na simptome nadutosti i refluksa, kategorije UCLA GIT 2.0 upitnika sa najvišim ostvarenim brojem bodova (srednje vrednosti bodova 0.89 i 0.68).

Tabela 3. Rezultati UCLA GIT 2.0 upitnika kod obolelih od SSc.

UCLA GIT 2.0 skale	Srednji (SD) skor	Minimalni skor	Maksimalni skor
ukupni GIT skor	0.59	0	2.48
Refluks	0.68 (0.71)	0	3
Nadutost	0.89 (0.88)	0	3
Dijareja	0.37 (0.57)	0	2
Fekalno prljanje	0.31 (0.67)	0	3
Konstipacija	0.53 (0.58)	0	2.5
EB	0.45 (0.72)	0	3
SF	0.49	0	3

EB- emotivno blagostanje, SF-socijalno funkcionisanje. Sve skale i ukupni GIT skor boduju se od 0 (bolji ishod) do 3 (lošiji ishod) izuzev dijareje i konstipacije koje se boduju od 0-2 i 0-2.5. Ukupni GIT skor je prosek vrednosti pojedinačnih skorova i opseg vrednosti je od 0 do 3.

4.2. Analiza -174 C/G IL-6 polimorfizma kod obolelih od SSc i zdravih ispitanika

Nije bilo značajnih razlika u učestalosti G/G- homozigota, G/C-heterozigota i C/C-homozigota za IL-6 gen, između grupe obolelih od SSc i kontrolne grupe zdravih ispitanika (*Tabela 4*). Učestalosti ispitivanih genotipova u obe grupe bile su u Hardy-Weinberg ekvilibrijumu.

Tabela 4. Učestalost -174 IL-6 polimorfizma kod obolelih od SSc i kontrolne grupe

-174 IL-6 genotipovi	SSc n=102 (%)	Kontrole n=93 (%)
G/G	50 (49)	46 (49.5)
C/G	42 (40.2)	35 (37.6)
C/C	11 (10.8)	12 (12.9)

4.2.1. Povezanost -174 C/G IL-6 polimorfizma i nivoa ekspresije IL-6 kod obolelih od SSc

Nivoi ekspresije IL-6 gena bili su značajno viši kod obolelih od SSc u odnosu na zdrave ispitanike (66 vs. 3.2, $p < 0.01$). Oboleli od SSc koji su C/C-homozigoti, imali su viši nivo ekspresije IL-6, u odnosu na C/G-heterozigote i G/G-homozigote (97.4 i 85.3, $p > 0.05$; 97.4 i 41.2, $p < 0.05$). Ova razlika je bila posebno uočljiva upoređivanjem nivoa ekspresije IL-6 između nosilaca C-alela (C/C-homozigoti i C/G-heterozigoti) i G/G homozigota (95.8 vs. 41.2, $p < 0.05$).

4.2.2. Povezanost nivoa ekspresije IL-6 gena i kliničkih obeležja bolesti

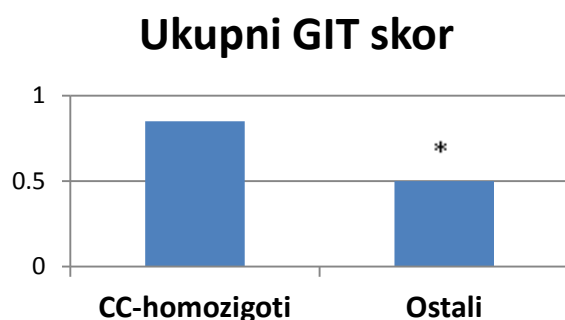
Primećena je pozitivna korelacija između nivoa ekspresije IL-6 gena i dužine trajanje bolesti ($r = 0.4$, $p < 0.05$). Nivoi ekspresije IL-6 nisu bili povezani sa aktivnošću i oblikom bolesti. Međutim, u grupi obolelih sa difuznim oblikom bolesti, primećena je pozitivna korelacija između nivoa ekspresije IL-6 i stepena zahvaćenosti kože (mereno preko mRSS) ($r = 0.41$, $p < 0.05$).

4.2.3. Povezanost -174 C/G IL-6 polimorfizma i kliničkih obeležja bolesti

Primećena je udruženost -174 C/G IL-6 polimorfizma sa stepenom oštećenja GIT-a u SSc. Bolesnici koji su C/C-homozigoti za IL-6 gen, imali su značajno viši broj bodova u

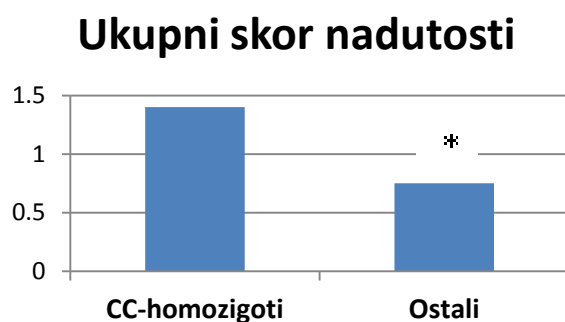
kategoriji ukupnog GIT oštećenja u poređenju sa C/G i G/G -heterozigotima (0.85 vs. 0.5, $p < 0.05$, *Grafikon 1*).

Grafikon 1. Ukupni GIT skor kod CC-homozigota za IL-6 i ostalih SSc bolesnika. * $p < 0.05$



Broj bodova u kategoriji nadutosti, značajno je viši kod C/C-homozigota za IL-6 gen, u poređenju sa ostalim obolelima od SSc (1.4 ± 0.9 vs. 0.78 ± 0.8 , $p = 0.05$, *Grafikon 2*).

Grafikon 2. Skor nadutosti kod CC-homozigota za IL-6 i ostalih SSc bolesnika. * $p = 0.05$



Rezultati sprovedenog regresionog modela analize mogućeg uticaja konfauding faktora, prikazani su u *Tabeli 5* i *Tabeli 6*. Ispitivan je uticaj terapije Ciklofosamidom (CYC) na stepen oštećenja GIT-a. Nije bilo povezanosti između kumulativne doze primljenog CYC i

učestalosti GIT simptoma. Nosioi C-alela (G/C-heterozigoti i C/C-homozigoti) kao i bolesnici sa dužim trajanjem bolesti imali su viši broj bodova u kategorijama nadutost i ukupno GIT oštećenje.

Tabela 5. Linearni regresioni modeli sa GIT ukupnim skorom kao zavisnom varijablom.

	Univarijantni modeli			Multivarijantni modeli		
	b	SE	p	b	SE	p
Alel*						
GG	- 0.27	0.19	0.160	-0.20	0.19	0.288
GC	- 0.43	0.19	0.027**	-0.38	0.19	0.045**
Trajanje bolesti	0.016	0.007	0.026**	0.016	0.007	0.027**
Godine starosti	- 0.005	0.005	0.338			
Ženski pol	- 0.126	0.157	0.424			
Difuzni oblik bolesti	0.202	0.134	0.134			
Anti-Scl70 autoantitela	-0.11	0.14	0.428			

*CC je referentna kategorija; **p<0.05

Tabela 6. Linearni regresioni modeli sa skorom skale nadutosti kao zavisnom varijablom.

	Univariate models			Multivariate model		
	b	SE	p	b	SE	p
Alel*						
GG	- 0.48	0.31	0.121	-0.38	0.3	0.218
GC	- 0.735	0.31	0.018**	-0.67	0.3	0.031**
Trajanje bolesti	0.023	0.011	0.038**	0.02	0.01	0.042**
Godine starosti	0.0	0.009	0.959			
Ženski pol	0.11	0.25	0.676			
Difuzni oblik bolesti	- 0.049	0.217	0.823			
Anti-Scl70 autoantitela	- 0.149	0.121	0.222			

*CC je referentna kategorija; **p<0.05

Nije primećena povezanost -174 G/C IL-6 polimorfizma i oštećenja pluća kod obolelih od SSc. Plućna fibroza je bila prisutna kod 24.5% G/G- homozigota, odnosno 26% G/C-heterozigota i 27.2 % C/C-homozigota. Vrednost DLCO<70% imalo je 51% G/G-homozigota, odnosno 53% G/C-heterozigota i 55% C/C-homozigota. Nije bilo značajne razlike u stepenu zahvaćenosti kože između obolelih sa različitim varijantama *IL-6* gena (srednja vrednost mRSS kod G/G- homozigota bila je 9.4, odnosno 9.3 kod G/C-heterozigota i 9.7 kod C/C-homozigota). U grupi obolelih od SSc, nije bilo značajne povezanosti između SSc-specifičnih autoantitela, oblika bolesti i -174 C/G varijante *IL-6* gena (p>0.05, *Tabela 4*, *Tabela 5*).

4.3. Analiza -2518G/A MCP-1 polimorfizma kod obolelih od SSc i zdravih ispitanika

Nije primećena značajna razlika u učestalosti -2518G/A *MCP-1*genskih varianti između obolelih od SSc i zdravih ispitanika (*Tabela 7*). Učestalosti genotipova bile su u skladu sa prethodno objavljenim učestalostima za populaciju belaca [36, 37]. A/A-homozigoti su bili

češći među obolelima od SSc u odnosu na kontrolnu grupu zdravih ispitanika (52% vs. 41.9%), ali ova razlika nije bila statistički značajna (Tabela 6).

Tabela 7. Učestalost -2518 MCP-1 polimorfizma kod obolelih od SSc i kontrolne grupe.

-2518 MCP-1 genotipovi	SSc n=102 (%)	Kontrole n=93 (%)
G/G	3 (2.9)	6 (6.5)
A/G	46 (45.1)	48 (51.6)
A/A	53 (52)	39 (41.9)

4.3.1. Povezanost -2518G/A MCP-1 polimorfizma i kliničkih obeležja bolesti

Nije primećena značajna udruženost -2518G/A *MCP-1* polimorfizma ni sa jednim kliničkim obeležjem bolesti. Ispitivanje povezanosti -2518G/A *MCP-1* polimorfizma sa stepenom oštećenja GIT-a u SSc, pokazalo je da bolesnici koji su G/G-homozigoti za *MCP-1* gen imaju viši broj bodova u kategoriji nadutost u poređenju sa G/A-heterozigotima (1.2 ± 0.9 vs. 0.8 ± 0.9 , $p > 0.05$) i A/A-homozigotima (1.2 ± 0.9 vs. 0.9 ± 0.9 , $p > 0.05$), mada ove razlike nisu bile statistički značajne. Nije bilo povezanosti između -2518G/A *MCP-1* genskih varianti i oštećenja pluća kod obolelih od SSc. Plućna fibroza je bila prisutna kod 27.4% G/G-homozigota, odnosno 25.2% G/A-heterozigota i 23.8% A/A-homozigota. Vrednost DLCO < 70% imalo je 56% G/G-homozigota, odnosno 54.6% G/A-heterozigota i 52.8% A/A-homozigota. Nije bilo značajne razlike u stepenu zahvaćenosti kože između obolelih sa različitim varijantama *MCP-1* gena (srednja vrednost mRSS kod G/G-homozigota bila je 9.6, odnosno 9.5 kod G/A-heterozigota i 9.4 kod A/A-homozigota). U grupi obolelih od SSc, nije bilo značajne povezanosti između SSc-specifičnih autoantitela, oblika bolesti i -2518G/A varijante *MCP-1* gena ($p > 0.05$).

4.4. Analiza nivoa ekspresije IL-17 gena kod obolelih od SSc i zdravih ispitanika

U grupi bolesnika sa SSc, nivoi IL-17A mRNA bili su viši nego u kontrolnoj grupi (3.7 ± 5.5 vs. 1.2 ± 1.7 , $p > 0.05$), ali ova razlika nije dosegla statističku značajnosti. Kada smo grupu obolelih od SSc podelili u podgrupe na osnovu razlike u dužini trajanja bolesti, uočili smo da oni koji boluju od 5 do 10 godina, kao i oni kod kojih bolest traje preko 15 godina, imaju statistički značajno više nivoa IL-17A mRNA u poređenju sa kontrolnom grupom zdravih (6.1 ± 7.8 vs. 1.2 ± 1.7 , $p < 0.05$, Tabela 8).

Tabela 8. Ekspresija IL-17A, IL-17F i IL-23 mRNA kod obolelih od SSc sa različitim trajanjem bolesti i kontrolne grupe – relativna genska ekspresija \pm S.D. (* $p < 0.05$)

	Trajanje bolesti				Kontrolna grupa
	<5 godina	5-10 godina	10-15 godina	>15 godina	
IL-17A mRNA	1.47 ± 1.0	$4.7 \pm 4.0^*$	8.5 ± 1.1	$6.1 \pm 7.8^*$	1.2 ± 1.7
IL-17F mRNA	$0.63 \pm 0.9^*$	1.1 ± 1.6	$0.53 \pm 0.3^*$	1.1 ± 1.3	1.2 ± 0.7
IL-23 mRNA	$0.73 \pm 0.6^*$	1.34 ± 0.9	1.1 ± 0.7	1.5 ± 1.3	1.1 ± 0.4

U grupi bolesnika sa SSc, nivoi IL-17F bili su neznačajno niži nego u kontrolnoj grupi (0.8 ± 0.9 vs. 1.2 ± 0.7 , $p > 0.05$). Značajno niže vrednosti IL-17F mRNA u odnosu na zdrave ispitanike, primećene su u podgrupi kod koje je bolest trajala manje od 5 godina (0.9 ± 1.1 vs. 1.2 ± 0.7 , $p < 0.05$), kao i onoj kod koje je bolest trajala 10-15 godina (0.53 ± 0.3 vs. 1.2 ± 0.7 , $p < 0.05$, Tabela 8). Serumski nivoi IL-17 bili su viši u grupi obolelih od SSc nego u kontrolnoj grupi (15.2 ± 2.2 vs. 14.7 ± 1.7), ali bez statističke značajnosti razlike ($p > 0.05$).

4.4.1. Povezanost nivoa ekspresije IL-17 gena i kliničkih obeležja bolesti

Uočena je pozitivna korelacija između dužine trajanja bolesti i nivoa IL-17A mRNA ($r = 0.41$), ali ne i sa IL-17F mRNA. Bolesnici sa plućnom fibrozom i značajnim oštećenjem plućne funkcije imali su više nivoa IL-17A i IL-17F mRNA u poređenju sa ostalim

obolelima, ali ova razlika nije imala statističku značajnost ($p > 0.05$). Nije primećena povezanost nivoa IL-17A, IL-17F mRNA i stepena zahvaćenosti kože ($p > 0.05$).

Grupu obolelih od SSc podelili smo u dve podgrupe na osnovu nivoa IL-17 u serumu. Prva podgrupa (n=7) imala je povišen nivo IL-17 (≥ 17.8 pg/ml, definisano kao srednja vrednost IL-17 u kontrolnoj grupi zdravih +2SD), a druga podgrupa (n=23) imala je normalan serumski nivo IL-17 (< 17.8 pg/ml). Nisu pronađene značajne razlike u pogledu glavnih kliničkih, demografskih i laboratorijskih pokazatelja između ove dve podgrupe obolelih (Tabela 9)

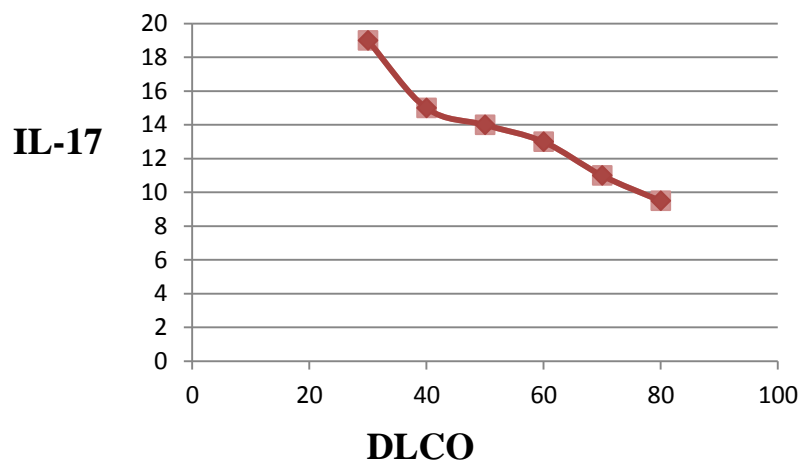
Tabela 9. Klinička, demografska i laboratorijska obeležja SSc bolesnika sa normalnim i povišenim nivoima IL-17.

	IL-17 \geq 17.8 pg/ml (n=7)	IL-17 $<$ 17.8 pg/ml (n=23)	p
Ž/M	6/1	19/4	0.62
Godine starosti	53.9 \pm 6.4	56.5 \pm 7.3	0.75
Trajanje bolesti (godine)	5.9 \pm 4.3	7.1 \pm 5.5	0.69
Difuzna/limitirana SSc	2/5	5/18	0.32
ATA/ACA pozitivni	3/4	8/9	0.37
DLCO	58.2 \pm 25.2	68.2 \pm 20.1	0.78
FVC	95.6 \pm 14.9	97 \pm 20.3	0.52
mRSS	10.2 \pm 4.2	10.9 \pm 7.4	0.38
VDAI	2.7 \pm 2.3	2.6 \pm 1.8	0.12
SE	17.3 \pm 8.9	23.2 \pm 12.6	0.40

ATA-Anti-Sc170 autoantitela, ACA-anticentromerna autoantitela, DLCO-difuzijski kapacitet pluća, FVC-forsirani vitalni kapacitet pluća, mRSS- modifikovan Rodnan skin skor, VDAI-indeks aktivnosti bolesti

Oboleli sa višim nivoima IL-17 u serumu, imali su niže vrednosti DLCO (58.2 vs. 25.2) i veći broj bodova u kategorijama dijareje (0.83 vs. 0.46), refluksa (0.9 vs. 0.6) i ukupnog GIT oštećenja (0.74 vs.0.6, u poređenju sa obolelima koji su imali normalne serumske vrednosti IL-17. Ove razlike među podgrupama nisu bili statistički značajne. Uočena je statistički značajna negativna korelacija između serumskog nivoa IL-17 i vrednosti DLCO ($r = - 0.4$, $p < 0.05$, *Grafikon.3*) kod obolelih od SSc, što pokazuje da su bolesnici sa višim serumskim nivoima IL-17 imali teža oštećenja plućne funkcije. Nije primećena povezanosti između SSc-specifičnih autoantitela, aktivnosti bolesti, oblika bolesti i nivoa ekspresije IL-17 (IL-17A, IL-17F mRNA i serumski IL-17).

Grafikon 3. Korelacija nivoa IL-17 u serumu i DLCO kod bolesnika sa SSc ($r = - 0.4$, $p < 0.05$)



4.5. Analiza nivoa ekspresije IL-23 gena kod obolelih od SSc i zdravih ispitanika

Nije bilo značajne razlike u nivou ekspresije IL-23mRNA iz mononuklearnih ćelija periferne krvi obolelih od SSc i zdravih ispitanika (1.1 ± 0.8 vs. 1.1 ± 0.4 , $p > 0.05$). Međutim, u podgrupi SSc bolesnika kod kojih je bolest trajala manje od 5 godina, nivo IL-23 mRNA je bio statistički značajno niži u poređenju sa kontrolnom grupom zdravih ispitanika (0.73 ± 0.6 vs. 1.1 ± 0.4 , $p < 0.05$, *Tabela 8*). Serumski nivoi IL-23 bili su viši u grupi obolelih od SSc u odnosu na kontrolnu grupu zdravih (3.69 ± 1.82 vs. 2.98 ± 1.89 , $p > 0.05$), mada ova razlika nije bila statistički značajna.

4.5.1. Povezanost nivoa ekspresije IL-23 gena i kliničkih obeležja bolesti

Uočena je pozitivna korelacija nivoa IL-23mRNA kod obolelih od SSc i dužine trajanja bolesti ($r = 0.49$). Bolesnici sa plućnom fibrozom su imali više nivoe IL-23mRNA u poređenju sa obolelima bez plućne fibroze, mada ova razlika nije imala statističku značajnost (1.3 vs. 1.0 , $p > 0.05$). Nivoi IL-23mRNA su takođe bili viši i u grupi bolesnika sa značajnim oštećenjem plućne funkcije ($DLCO < 70\%$), u poređenju sa ostalim SSc bolesnicima (1.2 vs. 1.0 , $p > 0.05$). Nije primećena povezanost nivoa IL-23 mRNA i stepena zahvaćenosti kože ($p > 0.05$).

Grupu obolelih od SSc podelili smo u dve podgrupe na osnovu nivoa IL-23 u serumu. Prva podgrupa ($n=9$) imala je povišen nivo IL-23 (≥ 6.8 pg/ml, definisano kao srednja vrednost IL-23 u kontrolnoj grupi zdravih $+2SD$), a druga podgrupa ($n=21$) imala je normalan serumski nivo IL-23 (< 6.8 pg/ml). Nisu pronađene značajne razlike u pogledu glavnih kliničkih, demografskih i laboratorijskih pokazatelja između ove dve podgrupe obolelih (*Tabela 10*).

Tabela 10. Klinička, demografska i laboratorijska obeležja SSc bolesnika sa normalnim i povišenim nivoima IL-23.

	IL-23 > 6.8 pg/ml (n=9)	IL-23 < 6.8 pg/ml (n=21)	p
Ž/M	7/2	16/5	0.75
Godine starosti	55.6± 8.3	59.2± 7.9	0.74
Trajanje bolesti (godine)	5.7 ± 4.7	6.1 ± 5.9	0.77
Difuzna/limitirana SSc	3/6	4/17	0.29
ATA/ACA pozitivni	2/4	9/6	0.34
DLCO	67.1 ±19.5	65.6 ± 22.5	0.72
FVC	96.6 ±15.7	96 ± 22.7	0.86
mRSS	9.4 ± 6.9	11.4 ± 6.8	0.38
VDAI	1.7 ± 0.7	3.1 ± 1.9	0.07
SE	18.3± 9.5	25.2 ± 15.6	0.32

ATA-Anti-Scl70 autoantitela, ACA-anticentromerna autoantitela, DLCO-difuzijski kapacitet pluća, FVC-forsirani vitalni kapacitet pluća, mRSS- modifikovan Rodnan skin skor, VDAI-indeks aktivnosti bolesti

Primećena je značajna razlika u učestalosti simptoma oštećenja GIT-a između podgrupa sa povišenim i normalnim serumskim nivoima IL-23. Oboleli od SSc sa povišenim IL-23 u serumu imali su značajno više bodova u kategorijama nadutost ($p= 0.01$), konstipacija ($p=0.01$), fekalno prljanje ($p<0.05$), ukupno GIT oštećenje ($p<0.05$), emotivno blagostanje ($p<0.05$) i socijalno funkcionisanje ($p <0.05$) u poređenju sa obolelima sa normalnim vrednostima serumskog IL-23 (Tabela 11).

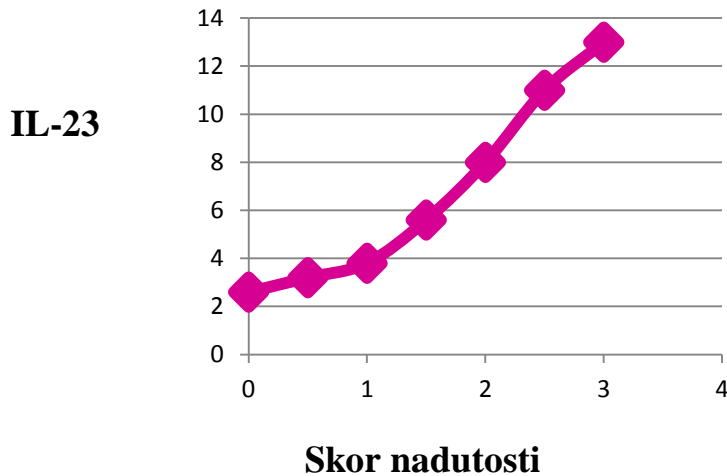
Tabela 11. Rezultati UCLA GIT 2.0 upitnika kod SSc bolesnika sa normalnim i povišenim serumskim IL-23

UCLA GIT 2.0 skorovi	IL-23 > 6.8 pg/ml (n=9)	IL-23 < 6.8 pg/ml (n=21)	p
GIT ukupni	0.83 ± 0.57	0.37 ± 0.59	0.03*
Refluks	1.13 ± 0.69	0.35 ± 0.8	0.11
Nadutost	1.5 ± 0.91	0.25 ± 0.74	0.01*
Dijareja	0.8 ± 0.59	0.41 ± 0.59	0.09
Konstipacija	0.75 ± 0.63	0.25 ± 0.43	0.02*
Fekalno prljanje	0.9 ± 1.13	0.2 ± 0.39	0.04*
EB	0.9 ± 1.1	0.26 ± 0.5	0.03*
SF	0.58 ± 0.7	0.16 ± 0.5	0.03*

EB- emotivno blagostanje, SF-socijalno funkcionisanje. Sve skale i ukupni GIT skor boduju se od 0 (bolji ishod) do 3 (lošiji ishod) izuzev dijareje i konstipacije koje se boduju od 0-2 i 0-2.5. *p<0.05

Bolesnici sa težim oštećenjima GIT-a imali su značajno više vrednosti IL-23 u serumu (r = 0.35, p<0.05). Najjača povezanost je primećena između nivoa IL-23 u serumu i broja bodova u kategoriji nadutosti (r = 0.5, p<0.05, *Grafikon 4*).

Grafikon 4. Korelacija nivoa IL-23 u serumu i skora nadutosti kod SSc bolesnika ($r = 0.5$, $p < 0.05$).



Nije bilo povezanosti između serumskog nivoa IL-23 i oštećenja pluća kod obolelih od SSc. Plućna fibroza je bila prisutna kod 28.1% obolelih sa povišenim vrednostima IL-23, odnosno 26.2% obolelih sa normalnim vrednostima IL-23. Vrednost DLCO < 70% imao je približno jednak procenat ispitanika u obe podgrupe obolelih od SSc (49% vs. 47%). Nije bilo značajne razlike u stepenu zahvaćenosti kože između obolelih sa povišenim i normalnim vrednostima IL-23 (srednja vrednost mRSS 8.9 vs. 8.6). Nije primećena povezanosti između SSc-specifičnih autoantitela, aktivnosti bolesti, oblika bolesti i nivoa ekspresije IL-23 (IL-23 mRNA i serumski IL-23).

4.6. Terapija Ciklofosfamidom i nivoi ekspresije IL-17A, IL-17F i IL-23

Ispitivan je efekat terapije Ciklofosfamidom (CYC) na nivoe ekspresije IL-17 i IL-23. Bolesnici koji su poslednju dozu CYC primili u period od 12 meseci pre vađenja krvi za analizu, imali su niže nivoe IL-17A, IL-17F i IL-23mRNA, u poređenju sa bolesnicima koji nisu primali CYC (3.4 vs. 4.5, 0.5 vs. 0.6 i 0.8 vs. 0.9, $p > 0.05$). Bolesnici kod kojih je od poslednje doze CYC prošlo više od 12 meseci pre vađenja krvi za analize, imali su više nivoe IL-17A, IL-17F i IL-23mRNA, u poređenju sa bolesnicima koji nisu primali CYC (3.2 vs. 3.4, 0.7 vs. 0.6 i 1.3 vs. 0.9, $p > 0.05$). Primećene razlike nisu imale statističku značajnost. Nije bilo povezanosti između kumulativne doze primljenog CYC i nivoa IL-17 i IL-23 kod obolelih od SSc.

5. Diskusija

Rezultati dobijeni sprovedenim istraživanjem ukazuju na značajnu ulogu polimorfizma IL-6 gena u nivou ekspresije IL-6 i stepena oštećenja GIT-a kod obolelih od SSc. Nivoi ekspresije IL-17, IL-6 i IL-23 menjaju se u zavisnosti od dužine trajanja bolesti. Serumski nivoi IL-17 udruženi su sa težim stepenom oštećenja plućne funkcije, dok su viši serumski nivoi IL-23 udruženi sa težim oštećenjem GIT-a.

Povećani nivoi IL-6 često se nalaze kod obolelih sa raznim imunski-posredovanim zapaljenskim bolestima, zbog čega je ispitivana uloga IL-6 kao mogućeg biomarkera u SSc (28). Dokazana je povećana proizvodnja IL-6 u serumu i koži obolelih od SSc (29). Povećani nivoi IL-6 udruženi su sa lošijim ishodom bolesti u SSc (4). Rezultati našeg istraživanja pokazuju povećanu ekspresiju IL-6 gena kod obolelih od SSc u odnosu na zdrave ispitanike, što je u skladu sa prethodno objavljenim rezultatim (10, 12, 27). Primitili smo pozitivnu korelaciju između nivoa ekspresije IL-6 i dužine trajanja bolesti.

Regulacija ekspresije IL-6 je složen proces koji podrazumeva međudejstvo više transkripcionih faktora, među kojima su NFkB i *CCAAT/enhancer-binding* protein (C/EBP)-b (70-73). Razni genetski i epigenetski činioci, kao što su polimorfizmi zamene jednog nukleotida i metilacija DNA, takođe utiču na stepen ekspresije IL-6 (73, 74). Skorašnja istraživanja pokazuju da izmene IL-6 gena imaju različito dejstvo na ćelije u zavisnosti od njihovog porekla i načina stimulacije. Primećeno je da fibroblasti i CD4⁺ monociti od iste osobe imaju potpuno različiti nivo ekspresije IL-6 (31). Istraživanje *Noss-a i sar*, pokazalo je viši nivo ekspresije IL-6 u fibroblastima sinovije dobijenim od obolelih od reumatoidnog artritisa koji su homozigoti za C alel IL-6 gena (-174 C/G). Suprotno ovom nalazu, u CD4⁺monocitima istih bolesnika nije primećena povezanost ove genetske varijacije i nivoa ekspresije IL-6 (31). U našem istraživanju, nosioci C-alela za IL-6 gen imali su teže oštećenje GIT-a (značajno viši GIT ukupni skor i skor nadutosti u poređenju sa ostalim bolesnicima sa SSc). Nije primećena udruženost -174 G>C IL-6 genske varijante i oštećenja pluća kod bolesnika sa SSc. Ovi rezultati mogu biti posledica različitog šablona ekspresije IL-6 u različitim tipovima ćelija. Prisustvo određenog alela u sklopu genetske varijante zamene jednog nukleotida udruženo je sa različitim epigenetskim mehanizmima acetilacije histona i vezivanja transkripcionih faktora u različitim tipovima ćelija (31). Ranije objavljeni rezultati

pokazuju značajnu razliku u učestalosti rs 1800795 varijante (-174C/G) kod obolelih od SSc sa difuznim oblikom bolesti u odnosu na kontrolnu grupu zdravih ispitanika (37). U istraživanju *Khan-a i sar.* (24), uočena je povezanost između serumskog nivoa IL-6 i stepena oštećenja kože kod obolelih sa dcSSc. Rezultati našeg istraživanja ukazuju na pozitivnu korelaciju između nivoa ekspresije IL-6 i mRSS-a kod podgrupe bolesnika sa dcSSc, ali ne i u celoj grupi bolesnika. Ovaj nalaz je u skladu sa prethodno objavljenim zapažanjima o povezanosti ekspresije IL-6 i stepena oštećenja kože u SSc, posebno u podrupi obolelih sa difuznim oblikom bolesti (24, 37, 75).

Trenutno u literaturi ne postoje podaci o istraživanjima na temu povezanosti ekspresije IL-6 gena, genske varijante -174 C/G i oštećenja GIT-a kod obolelih od SSc. Jedan od mogućih načina na koji IL-6 dovodi do oštećenja GIT-a odnosi se na proces poznat kao trans-signalizacija, gde se IL-6 vezuje za svoj solubilni receptor (sIL-6R) i pravi kompleks sa signalnim receptorskim proteinom gp130 (76). Ovi kompleksi spajaju unutarćelijske delove gp130 i započinju kaskadu signalne transdukcije preko JAK (Janus kinaza) i STAT2 (*signal transducers and activators of transcription*), ali takođe dovode i do aktivacije signalne kaskade preko MAP (*mitogen activated protein*)-kinaza (77). *Khan i sar* (24) primetili su da u kulturi dermalnih fibroblasta izolovanih od bolesnika sa SSc, IL-6 zavisna aktivacija ekspresije ektraćelijskih proteina vrši se preko JAK2/STAT3 i ERK (*extracellular signal-regulated kinases*)-puta. U skladu sa tim, povećana proizvodnja ektraćelijskih proteina u zidu creva može biti uzrok poremećene funkcije GIT-a kod obolelih od SSc. Drugi mogući mehanizam dejstva IL-6 na GIT odnosi se na ulogu mikrobioma kod obolelih od SSc. Ranije objavljeno istraživanje ukazuje na pozitivnu korelaciju između naseljenosti creva bakterijama i nivoa IL-6 u krvi obolelih sa sindromom sistemskog zapaljenskog odgovora (78). Naši rezultati pokazuju da je prisustvo C-alela IL-6 genske varijante -174 C/G udruženo sa većim stepenom oštećenja GIT-a kod obolelih od SSc, dok je jedan od najčešćih simptoma bila nadutost. Poznato je da u kasnijem toku bolesti abdominalna nadutost i bol postaju učestaliji, što se dovodi u vezu sa prenaseljenošću creva bakterijama (small intestinal bacterial overgrowth-SIBO) (79). Istraživanja koja se vršena na životinjama pokazala su povezanost nivoa IL-6 i oštećenja kolona, dok je primena anti-IL-6 antitela imala povoljan efekat crevnu

pokretljivost (80). Neophodna su dalja istraživanja povezanosti nivoa IL-6, SIBO i oštećenja GIT-a kod obolelih od SSc radi boljeg razumevanja uzročno-posledične veze ovih činilaca.

Primena humanizovanog, monoklonskog antitela na interleukin-6 receptor (tocilizumaba) dovodi do smanjene proizvodnje kolagena u fibroblastima izolovanim od bolesnika sa SSc (75). Rituksimab takođe deluje na smanjenje nivoa IL-6 uništavanjem CD20+ B ćelija. Pokazano je da oba leka dovode do omekšanja kože obolelih od SSc, ali neophodno je više randomizovanih istraživanja na većim grupama obolelih radi potvrde rezultata (75, 81). Objavljeni podaci o dejstvu tocilizumaba na GIT u SSc su za sada vrlo oskudni. Prikaz slučaja dva bolesnika sa ranim difuznim oblikom SSc ukazuje na povezanost anti-IL-6 terapije i pogoršanja simptoma oštećenja GIT-a (82). U istraživanju koje su sproveli *Strangfeld i sar.* u grupi obolelih od reumatoidnog artritisa, primećeno je da bolesnici koji su lečeni tocilizumabom imaju veći rizik od perforacije debelog creva u odnosu na bolesnike koji nisu bili na ovoj terapiji (83). Godine starosti bolesnika, kao i primenjene doze glukokortikoida i nesteroidnih antireumatika imale su značajan uticaj na rizik od perforacije creva u ovoj grupi ispitanika (83). Lečenje obolelih od SSc i dalje predstavlja veliki izazov. Za procenu dejstva tocilizumaba na GIT u SSc, kao i otkrivanje bolesnika na koje bi anti-IL-6 terapija blagotvorno delovala, neophodna su dalja istraživanja na većim grupama ispitanika.

Prema preporukama EULAR-a, u terapiji obolelih od SSc sa simptomima refluksa u cilju prevencije ulkusa i suženja jednjaka, primenjuju se blokatori protonske pumpe (84). Za bolesnike kod kojih ova terapije ne daje efekat preporučuje se agonist 5-hidroksitriptamin 1A receptora (85). U terapiji poremećaja motiliteta creva kod bolesnika sa SSc savetuje se primena prokinetika i antibiotika širokog spectra dejstva koji bi delovali na smanjenje bakterijske prenaseljenosti creva (84).

Ranija istraživanja ukazuju na značajnu ulogu MCP-1 u procesu fibroze u SSc. MCP-1 deluje direktno na fibroblaste dovodeći do pojačane ekspresije mRNA za vanćelijske protein matriksa, ili indirektno, dovodeći do pojačane ekspresije TGF- β (42). Povećani nivoi MCP-1 primećeni su i u aterosklerotskim lezijama arterija, što ukazuje na važnu ulogu ovog molekula u oštećenju krvnih sudova (40, 42, 46).

Malo je poznato o činiocima koji regulišu ekspresiju gena za MCP-1. Genotipizacijom -2518 A/G promotorskih varijanti MCP-1 gena, uočena je povezanost prisustva G-alela i pojave arterijske hipertenzije kod Tunizana (38). Skorašnje istraživanje uloge MCP-1 u SSc, dokazalo je povećanu ekspresiju MCP-1 u fibroblastima obolelih od SSc koji su imali bar jedan G-alel u odnosu na A/A-homozigote (43). Trenutno nema objavljenih podataka o povezanosti -2518 A/G promotorskih varijanti MCP-1 gena i odlika bolesti u SSc. Naši rezultati pokazali su podjednaku učestalost -2518 A/G MCP-1 genskih varijanti između obolelih od SSc i kontrolne grupe zdravih ispitanika. Nije primećena povezanost određene varijante MCP-1 gena i kliničkih karakteristika bolesti.

IL-23 ima važnu ulogu u procesima preživljavanja i proliferacije Th17 ćelija. Dejstvo IL-23 iz antigen-prezentujuće ćelije na Th17 ćelije preko IL-23 receptora na ćelijskoj membrani, ključno je za diferencijaciju Th17 ćelija i indukciju transkripcije gena za IL-17A, IL-17F, IL-6, IL-22 i TNF- α (86). Dokazano je da TGF- β u kombinaciji sa IL-1 α , IL-6 i IL-23 dovodi do ekspresije ROR γ t, ključnog činioca za zaustavljanje apoptoze nediferentovanih T ćelija i sazrevanje u patogene efektorske Th17 ćelije, čime se pokreće proces autoimunosti [86]. U tim uslovima Th17 ćelije pojačano proizvode IL-17, bitnog činioca u patogenezi SSc, dovodeći do aktivacije fibroblasta i endotelnih ćelija (59).

Istraživanje koje su sprovedi *Gourh i sar.* pokazalo je da nivoi citokina i imunska ravnoteža podležu značajnim promenama u toku trajanja bolesti (87). Naši rezultati pokazuju povećan nivo IL-17A mRNA i snižen nivo IL-17F kod obolelih od SSc u odnosu na kontrolnu grupu zdravih ispitanika. U ranije objavljenom istraživanju uočeno je da su nivoi IL-23 niži kod obolelih od SSc kod kojih je bolest trajala manje od 10 godina u odnosu na kontrolnu grupu zdravih ispitanika (87). U skladu sa tim, naši rezultati pokazuju da je u podgrupi SSc bolesnika kod kojih je bolest trajala manje od 5 godina, nivo IL-23 mRNA niži u poređenju sa kontrolnom grupom. Brojna istraživanja sa različitim rezultatima ukazuju na izmene nivoa ekspresije IL-17 i IL-23 gena tokom trajanja bolesti, kao i na razlike u nivou IL-17 i IL-23 između obolelih od SSc i zdravih ispitanika (19, 58, 60, 61). Određeni autori ukazuju na udruženost viših nivoa ekspresije IL-17 i ranog stadijuma bolesti (14, 59), kao i veće aktivnosti bolesti (88), dok druga istraživanja nisu potvrdila ovu povezanost (62). Naši

rezultati pokazuju pozitivnu korelaciju nivoa IL-23 i IL-17A mRNA sa dužinom trajanja bolesti. Nije primećena povezanost nivoa ekspresije IL-17A, IL-17F, IL-23 mRNA sa aktivnošću bolesti, kao ni sa stepenom oštećenja kože, pluća i GIT-a.

Oštećenje pluća, ispoljeno kao intesticijumska plućna bolest ili plućna arterijska hipertenzija, vodeći je uzrok oboljevanja i smrtnosti u SSc (89). Kako je fibroza glavno obeležje SSc, zanimljiva je činjenica da IL-17 ima važnu ulogu u fibrozi bazalne membrane kod astme (90) kao i u kontroli zapaljenskog odgovora nakon bleomicinom- indukovane povrede pluća (eksperimentalni model koji se najčešće koristi za izučavanje plućne fibroze) (91). U nekoliko ranije objavljenih istraživanja nije dokazana povezanost nivoa IL-17, IL-23 sa oštećenjem pluća u SSc (19, 21, 59). U istraživanju koje su sproveli *Olewicz-Gawlik i sar*, dokazana je pozitivna korelacija serumskog nivoa IL-17 i stepena zahvaćenosti pluća (HRCT), dok su serumski nivoi IL-23 negativno korelisali sa parametrima plućne funkcije (DLCO). Autori nisu dokazali povezanost između nivoa IL-23, IL-17, gastrointestinalnih simptoma, vrste primljene terapije i parametara aktivnosti bolesti, uključujući mRSS (14).

Naši rezultati pokazuju da bolesnici sa višim serumskim nivoima IL-17 imaju teža oštećenja plućne funkcije (niže vrednosti DLCO), što može biti posledica povećanog lučenja IL-17 od strane T ćelija koje se u povećanom broju nalaze u fibrotskim lezijama pluća kod SSc (21). Pokazali smo da bolesnici sa višim serumskim nivoima IL-23 imaju teže oštećenje GIT-a (veći broj bodova na skalama za procenu simptoma nadutosti, konstipacije i fekalnog prljanja). Najjača povezanost je primećena između nivoa IL-23 u serumu i broja bodova u kategoriji nadutosti, što može biti povezano sa prenaseljenošću creva bakterijama u kasnijim fazama bolesti, kako je ranije opisano (79, 92). Dokazana je povezanost IL-23 i oštećenja creva u nekim autoimunskim bolestima, dok za sada nema objavljenih podataka o odnosu serumskog nivoa IL-23 i oštećenja GIT-a kod obolelih od SSc. Skorašnja istraživanja ukazuju da važnu ulogu IL-23 u razvoju zapaljenskih bolesti creva (93, 94). Ustekinumab, monoklonsko antitelo na p40 podjedinicu IL-12 I IL-23, predstavlja obećavajuću terapijsku terapijsku mogućnost za bolesnike sa Kronovom bolešću (95). Podaci o efektima anti-IL-23 terapije u SSc su vrlo oskudni. Za sada je objavljen samo jedan prikaz slučaja bolesnika sa SSc i psorijazom, kod koga je nakon primene ustekinumaba došlo do smanjenja zategnutosti

kože (96). Neophodna su dalja istraživanja na veći grupama obolelih od SSc radi ispitivanja koristi od lečenja anti-IL-23 terapijom.

Postoje izvesna ograničenja u našem istraživanju koja treba imati u vidu prilikom interpretacije rezultata. Relativno mali broj ispitanika je uključen u istraživanje što dosta ograničava tumačenje razlike u učestalosti IL-6 i MCP-a genskih varijanti između obolelih od SSc i zdravih ispitanika. Dizajn studije (studija preseka) ne omogućava serijska merenja i praćenje promene u nivoima citokina koje se dešavaju tokom trajanja bolesti. Poznato je da genska ekspresija merena količinom mRNA, ne mora da bude pokazatelj količine genske ekspresije na proteinskom nivou. Procenat korelacije između količine mRNA i proteina može biti i manji od 40%, zbog mnogobrojnih procesa obrade primarnog transkripta između procesa transkripcije i translacije (97). Ovo je razlog što jedan te isti biomarker može imati potpuno drugačiji značaj zavisno od toga da li je merenje vršeno na nivou mRNA ili proteina.

6. Závěry

1. Na osnovu dobijenih rezultata analize -174 C/G IL-6 polimorfizma i nivoa ekspresije IL-6 kod obolelih od SSc i zdravih ispitanika, moguće je izvesti sledeće zaključke:

a) nema razlika u učestalosti G/G- homozigota, G/C-heterozigota i C/C-homozigota za -174C/G IL-6 gensku varijantu između grupe obolelih od SSc i kontrolne grupe zdravih ispitanika

b) nivoi ekspresije IL-6 gena bili su viši kod obolelih od SSc u odnosu na zdrave ispitanike

c) oboleli od SSc koji su nosioci C-alela u sklopu -174C/G IL-6 polimorfizma imali su viši nivo ekspresije IL-6 u odnosu na G/G-homozigote

d) viši nivoi ekspresije IL-6 gena udruženi su sa dužim trajanjem bolesti

e) teže oštećenje kože udruženo je sa višim nivoima ekspresije IL-6 u grupi bolesnika sa dcSSc

f) bolesnici koji su C/C-homozigoti u -174 C/G IL-6 polimorfizmu imaju teže oštećenje GIT-a u odnosu na obolele koji su C/G i G/G –heterozigoti

2. Na osnovu dobijenih rezultata analize -2518G/A MCP-1 polimorfizma kod obolelih od SSc i zdravih ispitanika, moguće je izvesti sledeće zaključke:

a) nema razlika u učestalosti A/A-homozigota, A/G-heterozigota i G/G-homozigota za -2518G/A MCP-1 gensku varijantu između obolelih od SSc i zdravih ispitanika

b) -2518G/A MCP-1 genska varijanta nije udružena ni sa jednim kliničkim obeležjem bolesti u SSc

3. Na osnovu dobijenih rezultata analize nivoa ekspresije IL- 17 i IL-23 gena kod obolelih od SSc i zdravih ispitanika, moguće je izvesti sledeće zaključke:
- a) oboleli od SSc kod kojih bolest traje od 5 do 10 godina, kao i oni kod kojih bolest traje preko 15 godina imaju više nivoe IL-17AmRNA u poređenju sa kontrolnom grupom zdravih ispitanika
 - b) oboleli od SSc kod kojih bolest traje manje od 5 godina imaju niže nivoe IL-23 mRNA i IL-17FmRNA u poređenju sa kontrolnom grupom zdravih ispitanika
 - c) viši nivoi ekspresije IL-17 i IL-23 gena udruženi su sa dužim trajanjem bolesti
 - d) viši serumski nivoi IL-17 udruženi su sa nižim vrednostima DLCO
 - e) oboleli od SSc sa povišenim IL-23 u serumu imali su teže oštećenje GIT-a u poređenju sa obolelima koji su imali normalne vrednosti serumskog IL-23

7. Literatura

1. Medsger TA. Systemic sclerosis (scleroderma), localized scleroderma, eosinophilic fasciitis and calcinosis. In: McCarty DJ Koopman WJ, editors. Arthritis and allied conditions. Philadelphia: Lea & Febiger; 1993:1253-92.
2. Steen VD, Medsger TA. Epidemiology and natural history of systemic sclerosis, *Rheum Dis Clin North Am* 1990; 16:641–654.
3. Steen VD. Autoantibodies in systemic sclerosis, *Semin Arthritis Rheum* 2005;35:35–42.
4. White B: Interstitial lung disease in scleroderma, *Rheum Dis Clin North Am* 2003;29:371–390.
5. Condliffe R, Kiely DG, Peacock AJ, et al: Connective tissue disease-associated pulmonary arterial hypertension in the modern treatment era, *Am J Respir Crit Care Med* 2009;179:151–157.
6. Goh NS, Desai SR, Veeraraghavan S, et al: Interstitial lung disease in systemic sclerosis: a simple staging system, *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:1248–1254.
7. Steen VD, Lucas M, Fertig N, et al: Pulmonary arterial hypertension and severe pulmonary fibrosis in systemic sclerosis patients with a nucleolar antibody, *J Rheumatol* 2007;34:2230–2235.
8. Steen VD, Medsger TA: Changes in causes of death in systemic sclerosis, 1972-2002, *Ann Rheum Dis* 2007;66:940–944.
9. Steen VD, Medsger TA Jr. Severe organ involvement in systemic sclerosis with diffuse scleroderma. *Arthritis Rheum* 2000;43:2437-44.
10. Ebert EC. Gastric and enteric involvement in progressive systemic sclerosis. *J Clin Gastroenterol* 2008; 42:5-12.
11. Soeters PB, Schols AMWJ. Advances in understanding and assessing malnutrition. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2009;12:487-94.
12. Christmann RB, Wells AU, Capelozzi VL, et al: Gastroesophageal reflux incites interstitial lung disease in systemic sclerosis: radiologic, histopathologic, and treatment evidence, *Semin Arthritis Rheum* 2010;40:241–249.
13. Gyger G, Baron M: Gastrointestinal manifestations of scleroderma: recent progress in evaluation, pathogenesis, and management, *Curr Rheumatol Rep* 2012;14:22–29.
14. Olewicz-Gawlik A, Danczak-Pazdrowska A, Kuznar-Kaminska B, Gornowicz-Porowska J, Katulska K, Trzybulska D, Batura-Gabryel H et al. Interleukin-17 and interleukin-23:

- importance in the pathogenesis of lung impairment in patients with systemic sclerosis. *International Journal of Rheumatic Diseases* 2014;17:664-670.
15. Hussein MR, Hassan HI, Hofny ER, Elkholy M, Fatehy NA, et al. Alterations of mononuclear inflammatory cells, CD4/CD8+ T cells, interleukin I beta, and tumor necrosis factor alpha in the bronchoalveolar lavage fluid, peripheral blood, and skin of patients with systemic sclerosis. *J ClinPathol* 2005;58:178-184.
 16. Gustafsson R, Totterman TH, Klareskog L, Hallgren R. Increase in activated T cells and reduction in suppressor inducer T cells in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 1990; 49:40-45.
 17. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Hood L, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 2005; 6:1133-1141.
 18. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGF- β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17 producing T cells. *Immunity* 2006;24: 179-189.
 19. Redstake TR, Van Bon L, Broen J, Hussiani A, Hesselstrand R, Wuttge DM, et al. The pronounced Th17 profile in systemic sclerosis (SSc) together with intracellular expression of TGFbeta and IFNgamma distinguishes SSc phenotypes. *PloS One* 2009;4:e5903.
 20. Rodriguez-Reyna TS, Furuzawa-Carballeda J, Cabiedes J, Fajardo-Hermossilo LD, Martinez-Reyes C, Diaz-Zamudio M, et al. Th17 peripheral cells are increased in diffuse cutaneous systemic sclerosis compared with limited illness: a cross-sectional study. *Rheumatol Int* 2011;32:2653-2660.
 21. Gutcher I, Donkor MK, Ma Q, Rudensky AY, Flavel RA, Li MO. Autocrine transforming growth factor-beta1 promotes in vivo Th17 cell differentiation. *Immunity* 2011;34:396-408.
 22. Calabrese LH, Rose-John S. IL-6 biology: Implications for clinical targeting in rheumatic disease. *Nat Rev Rheumatol* 2014;10(12):720–727
 23. O'Reilly S, Cant R, Ciechomska M, van Laar JM. Interleukin-6: a new therapeutic target in systemic sclerosis? 2013;12;2(4).

24. Narazaki M, Yasukawa K, Saito T, Ohsugi Y, Fuki H, Koishihara Y et al. Soluble forms of the IL-6 signal transducing receptor component gp130 in human serum possessing a potential to inhibit signals through membrane-anchored gp130. *Blood* 1993;82:1120-1126.
25. Khan K, Xu S, Nihtyanova S et al. Clinical and pathological significance of interleukin 6 overexpression in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2012; 71(7): 1235–1242.
26. Antonelli A, Ferri C, Fallahi P et al. CXCL10 (alpha) and CCL2 (beta) chemokines in systemic sclerosis—a longitudinal study. *Rheumatology (Oxford)* 2008 ; 47(1): 45–49.
27. Hasegawa M, Fujimoto M, Matsushita T, Hamaguchi Y, Takehara K and Sato S. Serum chemokine and cytokine levels as indicators of disease activity in patients with systemic sclerosis. *Clin Rheumatol* 2011 ;30:231-237.
28. Sato S, Hasegawa M, Takehara K. Serum levels of interleukin-6 and interleukin-10 correlate with total skin thickness score in patients with systemic sclerosis. *J Dermatol Sci* 2011;27:140_6.
29. Scala E, Pallotta S, Frezzolini A et al. Cytokine and chemokine levels in systemic sclerosis: relationship with cutaneous and internal organ involvement. *Clin Exp Immunol* 2004;138:540_6.
30. O'Reilly S, Ciechomska M, Cant R, Hugle T, van Laar JM. Interleukin-6, its role in fibrosing conditions. *Cytokine Growth Factor Rev* 2012; 23: 99–107.
31. Noss EH, Nguyen HN, Chang SK, Watts GF, Brenner MB. Genetic polymorphism directs IL-6 expression in fibroblasts but not selected other cell types. 2015;112(48):14948-53.
32. Fishman D, et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 1998;102(7):1369–1376.
33. Cole SW, et al. Computational identification of gene-social environment interaction at the human IL6 locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107(12):5681–5686
34. Giannitrapani L, Soresi M, Balasus D, Licata A, Montalto G. Genetic association of interleukin-6 polymorphism (-174 G/C) with chronic liver diseases and hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2013;19(16):2449–2455.

35. Smith AJ, Humphries SE. Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009 Feb;20(1):43-59.
36. Yin YW, et al. The lack of association between interleukin-6 gene -174 G/C polymorphism and the risk of type 1 diabetes mellitus: A meta-analysis of 18,152 subjects. *Gene* 2013;515(2):461–465.
37. Cénit MC, Simeón CP, Vonk MC, Callejas-Rubio JL, Espinosa G, Carreira Pet al. Influence of the IL6 gene in susceptibility to systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2012;39(12):2294-302.
38. Jemaa R , Ben Ali S, Kallel A, Omar S, Feki M, Elasmí M et al. Association between the -2518G/A polymorphism in the monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) gene and hypertension in Tunisian patients. *Clinical Biochemistry* 2009;42: 34–37.
39. Yla-Herttuala S, Lipton BA, Rosenfeld ME, et al. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 in macrophage rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:5252–6.
40. Yu X, Dluz S, Graves DT, et al. Elevated expression of monocyte chemoattractant protein-1 by vascular smooth muscle cells in hypercholesterolemic primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:6953–7.
41. Gu L, Tseng S, Horner RM, Tam C, Loda M, Rollins BJ. Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. *Nature* 2000 Mar 23; 404(6776): 407–411.
42. Gharaee-Kermani M, Denholm EM, Phan SH. Costimulation of fibroblast collagen and transforming growth factor beta1 gene expression by monocyte chemoattractant protein-1 via specific receptors. *J Biol Chem* 1996 Jul 26; 271(30): 17779–17784.
43. Karrer S, Bosserhoff AK, Weiderer P, Distle Or, Landthaler M, Szeimies RM. The -2518 Promotor Polymorphism in the MCP-1 Gene Is Associated with Systemic Sclerosis. *J Invest Dermatol* 2005;124:92 –98.
44. Hasegawa M, Sato S, Takehara K. Augmented production of chemokines (MCP-1, MIP-1a, and MIP-1b) in patients with systemic sclerosis: MCP-1 and MIP-1a may be involved in the development of pulmonary fibrosis. *Clin Exp Immunol* 1999; 117: 159–165.

45. Jemaa R, Rojbani H, Kallel A, et al. Association between the -2518G/A polymorphism in the monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) gene and myocardial infarction in Tunisian patients. *Clin Chim Acta* 2008;390:122–5.
46. Szalai C, Duba J, Prohaszka Z, et al. Involvement of polymorphisms in the chemokine system in the susceptibility for coronary artery disease (CAD). Coincidence of elevated Lp(a) and MCP-1 -2518G/G genotype in CAD patients. *Atherosclerosis* 2001;158:233–9.
47. Oppmann B, Lesley R, Blom B, et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 2000; 13:715–725.
48. Becker C, Wirtz S, Blessing M, et al. Constitutive p40 promoter activation and IL-23 production in the terminal ileum mediated by dendritic cells. *J Clin Invest* 2003; 112:693–706.
49. Yang L, Anderson DE, Baecher-Allan C, Hastings WD, Bettelli E, Oukka M et al. IL-21 and TGF- β are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature* 2008; 454:350-352.
50. Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor- β and induction of the nuclear receptor ROR γ t. *Nat Immunol* 2008;9:641-649.
51. Iwakura Y., Nakae S, Saijo S and Ishigame H. The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. *Immunol Rev* 2008;226: 57–79.
52. Reynolds J.M, Angkasekwinai P, and Dong C. IL-17 family member cytokines: Regulation and function in innate immunity. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010;21:413–423.
53. Wright JF, Guo Y, Quazi A. Identification of an interleukin 17F/17A heterodimer in activated human CD4+ T cells. *J Biol Chem* 2007; 282(18):13447-55.
54. Iwakura Y, Ishigame H, Saijo S, Nakae S. Functional Specialization of Interleukin-17 Family Members. *Immunity* 2011;34(2):149-62.
55. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 cells. *Ann Rev Immunol* 2009;27:485-517.

56. Gutter I, Donkor MK, Ma Q, Rudensky AY, Flavell RA and Li MO. Autocrine transforming growth factor-beta1 promotes in vivo Th17 cell differentiation. *Immunity* 2011;34:396-408.
57. Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jager A, Strom TB, Oukka M, Kuchroo VK. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T (H)17 cells. *Nature* 2007;448:484-487.
58. Baraut J, Michel L, Verrecchia F, Farge D. Relationship between cytokine profiles and clinical outcomes in patients with systemic sclerosis. *Autoimmun Rev* 2010;10:65-73.
59. Sakkas LI, Patsoucas CD. Is systemic sclerosis an antigen-driven T cell disease? *Arthritis Rheum* 2004;50:1721-1733.
60. Kurasawa K, Hirose K, Sano H et al. Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2000 ;43(11):2455-63.
61. Komura K, Fujimoto M, Hasegawa M et al. Increased serum interleukin 23 in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2008;35: 120-5.
62. Duan H, Fleming J, Pritchard DD, Amon LM, Xue J, et al. Combined analysis of monocyte and lymphocyte messenger RNA expression with serum protein profiles in patients with scleroderma. *Arthritis Rheum* 2008;58:1465-1474.
63. Palomino-Morales R, et al. Interleukin-6 gene-174 promoter polymorphism is associated with endothelial dysfunction but not with disease susceptibility in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2009;27(6):964-970.
64. Van Den Hoogen F, Khanna D, Fransen J et al. 2013 Classification Criteria for Systemic Sclerosis. An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism Collaborative Initiative. *Arthritis & Rheumatism* 2013 ; 65 (11): 2737-47.
65. Valentini G, Della Rossa A, Bombardieri S, Bencivelli W, Silman AJ, D' Angelo S, et al. 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* 2011; 60:592-598.
66. Khanna D, Hays RD, Maranian P, Seibold JR, Impens A, Mayes MD et al. Reliability and validity of the University of California, Los Angeles scleroderma clinical trial consortium gastrointestinal tract instrument. *Arthritis Rheum* 2009; 61: 1257-63.

67. Zekovic A, Damjanov N. Validation of Serbian version of UCLA Scleroderma Clinical Trial Consortium Gastrointestinal Tract Instrument in 104 patients with systemic sclerosis. *Rheumatol Int* 2017;37(5):735-741.
68. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162(1):156-9.
69. Uboldi de Capei MU, Dametto E, Fasano ME, Rendine S, Curtioni ES. Genotyping for cytokine polymorphisms: allele frequencies in the Italian population. *Eur J Immunogenet* 2003; 30: 5–10.
70. Georganas C, et al. Regulation of IL-6 and IL-8 expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: The dominant role for NF-kappa B but not C/EBP beta or c-Jun. *J Immunol* 2000;165(12):7199–7206.
71. Matsusaka T et al. Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90(21):10193–10197.
72. Vanden Berghe W et al. Signal transduction by tumor necrosis factor and gene regulation of the inflammatory cytokine interleukin-6. *Biochem Pharmacol* 2000;60(8):1185–1195
73. Iliopoulos D, Hirsch HA, Struhl K. An epigenetic switch involving NF-kappaB, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation. *Cell* 2009;139(4):693–706.
74. Ishida K, et al. Interleukin-6 gene promoter methylation in rheumatoid arthritis and chronic periodontitis. *J Periodontol* 2012;83(7):917–925.
75. Shima Y, Kuwahara Y, Murota H et al. The skin of patients with systemic sclerosis softened during the treatment with anti-IL-6 receptor antibody tocilizumab. *Rheumatology* 2010; 49: 2408-12.
76. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1813(5):878–88.
77. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, et al. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 2003;374(Pt 1):1–20.
78. Tsay T.B, Yang M.C, Sun J.T, Chen P.H, Lin Y.S, Shih M.H and Chen L.W. Enteric bacterial loads are associated with interleukin-6 levels in systemic inflammatory response syndrome patients. *Formosan Journal of Surgery* 2016;49,: 208-216.

79. Savarino E, Furnari M, De Bortoli N, Martinucci I, Bodini G, Ghio M et Savarino V. Gastrointestinal involvement in systemic sclerosis. *Presse Med* 2014;43:e279-91.
80. Nullens S, Staessens M, Cédric P, Philip P, Malhotra-Kumar S, Francque S et al. Beneficial Effects of Anti-Interleukin-6Antibodies on Impaired Gastrointestinal Motility, Inflammation and Increased Colonic Permeability in a Murine Model of Sepsis Are Most Pronounced When Administered in a Preventive Setup. *PloS One* 2016;DOI:10.1371/journal.pone.0152914 April 4.
81. Bosello S, De Santis M, Lama G et al. B cell depletion in diffuse progressive systemic sclerosis: Safety, skin score modification and IL-6 modulation in an up to thirty-six months follow-up open-label trial. *Arthritis Res Ther* 2010; 12: R54
82. Frech TM, Hudson M. Protective role of interleukin-6 in systemic sclerosis gastrointestinal tract involvement: case report and review of the literature. *Clin Exp Rheumatol.*2015;33(4 Suppl 91):S179-81.
83. Strangfeld A, Richter A, Siegmund B, Herzer P, Rockwitz K, Demary W et al. Risk for lower intestinal perforations in patients with rheumatoid arthritis treated with tocilizumabin comparison to treatment with other biologic or conventional synthetic DMARDs. *Ann Rheum Dis.* 2017Mar;76(3):504-510. doi: 10.1136/annrheumdis-2016-209773. Epub 2016 Jul 12.
84. Kowal-Bielecka O, Fransen J, Avouac J, Becker M, Kulak A, Allanore Y et al. Update of EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2017;76(8):1327-1339.
85. Denaxas K, Ladas S. D, Karamanoli G.P. Evaluation and management of esophageal manifestations in systemic sclerosis. *Annals of Gastroenterology* 2018;31: 165-170.
86. Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, Maggi L, Liotta F, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med* 2007; 204:1849-1861.
87. Gourh P, Arnett FC, Assassi S, Tan FK, Huang M, Diekman L et al. Plasma cytokine profiles in systemic sclerosis: associations with autoantibody subsets and clinical manifestations . *Arthritis Research &Therapy* 2009; 11:R147 (doi:10.11186/ar2821).
88. Yang X, Yang J, Xing X, Wan L et Li M. Increased frequency of Th17 cells in systemic sclerosis is related to disease activity and collagen overproduction. *Arthritis Research&Therapy* 2014;16:R4.

89. Le Pavec J, Launay D, Mathai SC, Hassoun PM, Humbert M. Scleroderma lung disease. *Clin Rev Allergy Immunol* 2011;40:104-16.
90. Chakir J, Shannon J, Molet S, Fukakusa M, Elias J et al. Airway remodeling-associated factors in moderate to severe asthma: effect of steroids on TGF-beta, IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111:1293-1298.
91. Braun RK, Ferrick C, Neubauer P, Sjoding M, Sterner-Kock A et al. IL-17 producing gamma delta T cells are required for a controlled inflammatory response after bleomycine-induced lung injury. *Inflammation* 2008;31:167-179.
92. Thoua NM, Bunce C, Brough G, Forbes A, Emmanuel AV and Denton C. Assessment of gastrointestinal symptoms in patients with systemic sclerosis in a UK tertiary referral centre. *Rheumatology* 2010; 49(9):1770-1775.
93. Eken A, Singh K. A, Oukka M. Interleukin-23 in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2014 ; 20(3): 587-595.
94. Gheita TA, El Gazzar II, El-Fishawy HS, Aboul-Ezz MA, Kenawy SA. Involvement of IL-23 in enteropathic arthritis patients with inflammatory bowel disease: preliminary results. *Clin Rheumatol* 2014;33(5):713-7.
95. Gisbert JP, Chaparro M. Ustekinumab to treat Crohn's disease. *Gastroenterol Hepatol* 2017;40(10):688-698.
96. Ichihara A, Jinnin M, Ihn H. Treatment of psoriasis with ustekinumab improved skin tightening in systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 2017 ;35 Suppl 106(4):208-210
97. Vogel C, Marcotte EM. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature reviews Genetics* 2012;13(4):227-232.

Biografija autora

Dr Ana Zeković rođena je u Beogradu, 12. maja 1985. godine. Medicinski fakultet u Beogradu upisala je 2004. godine, a diplomirala je 2010. godine sa prosekom 9.69. Tokom studija bila je više puta stipendista grada Beograda, dobijala je pohvalnice za Najboljeg studenta i bila autor nekoliko studentskih naučnih radova.

Zaposlena je na Institutu za reumatologiju u Beogradu od juna 2013. godine. Zvanje akademskog specijaliste reumatologije stekla je jula 2015. godine, a doktorske studije iz oblasti Molekularne medicine upisala je oktobra 2014. godine. Specijalističke studije iz oblasti Interne medicine, upisala je decembra 2014. godine.

Na Medicinskom fakultetu u Beogradu prijavljuje temu za izradu doktorke disertacije pod nazivom „Polimorfizam gena za interleukin 6 i monocitni hemoatraktantni protein 1 i nivoi interleukina 17 i interleukina 23 kod obolelih od sistemske skleroze u odnosu na zdrave osobe“, koja je odobrena od strane naučno-nastavnog veća jula 2018. godine.

Uz obavljanje redovnih poslova na mestu odeljenskog lekara na Institutu za reumatologiju, prezentovala je više radova na kongresima reumatologa u zemlji i inostranstvu i usavršavala se na brojnim kursevima domaćih i inostranih predavača. Do sada je objavila 7 radova u stranim časopisima, na domaćim i inostranim kongresima.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Ana Zeković

broj upisa _____

Izjavljujem


da je doktorska disertacija pod naslovom

"POLIMORFIZAM GENA ZA INTERLEUKIN 6 I MONOCITNI HEMOATRAKTANTNI
PROTEIN 1 I NIVOI INTERLEUKINA 17 I INTERLEUKINA 23 KOD OBOLELIH OD
SISTEMSKE SKLEROZE U ODNOSU NA ZDRAVE OSOBE"

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

Potpis doktoranda

U Beogradu, 10/SEP/2018



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Ana Zeković

Broj upisa _____

Studijski program molekularna medicina

Naslov rada "POLIMORFIZAM GENA ZA INTERLEUKIN 6 I MONOCITNI
HEMOATRAKTANTNI PROTEIN I I NIVOI INTERLEUKINA 17 I INTERLEUKINA 23
KOD OBOLELIH OD SISTEMSKE SKLEROZE U ODNOSU NA ZDRAVE OSOBE"

Mentor Prof. dr Nemanja Damjanov

Potpisani Dr Ana Zeković

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

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

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

Potpis doktoranda

U Beogradu, 10 (SEP) 2018



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

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

“POLIMORFIZAM GENA ZA INTERLEUKIN 6 I MONOCITNI HEMOATRAKTANTNI
PROTEIN 1 I NIVOI INTERLEUKINA 17 I INTERLEUKINA 23 KOD OBOLELIH OD
SISTEMSKE SKLEROZE U ODNOSU NA ZDRAVE OSOBE”

koja je moje autorsko delo.

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

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

1. Autorstvo

2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

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

U Beogradu, 10/SEP/2018

Potpis doktoranda



1. Autorstvo - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.