

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Dušan S. Škiljević

**AKTIVNOST DEZOKSIRIBONUKLEAZE I
U SERUMU:
KORELACIJA SA KUTANIM, SISTEMSKIM I
IMUNOSEROLOŠKIM PARAMETRIMA
KOD PACIJENATA SA
LUPUS ERYTHEMATOSUSOM**

doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

Dušan S. Škiljević

**SERUM DESOXYRIBONUCLEASE I ACTIVITY:
CORRELATION WITH CUTANEOUS,
SYSTEMIC AND IMMUNOSEROLOGICAL
MARKERS
IN PATIENTS WITH LUPUS
ERYTHEMATOSUS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

Mentor:

Prof. dr Miloš Nikolić

Redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije:

1. Prof. dr Ljiljana Medenica, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

2. Doc. dr Mirjana Šefik-Bukilica, docent Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

3. Prof. dr Dragan Jovanović, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu

Ova disertacija je rezultat rada jednog dobro osmišljenog i ukomponovanog tima u kome sam i ja sam imao privilegiju da radim. Kada pogledam unazad, shvatam da je broj ljudi koji su doprineli ovom radu toliki da izrazi zahvalnosti nose neminovnost da će neko ostati nespomenut, zbog čega se unapred izvinjavam.

Prvenstveno se zahvaljujem svom mentoru, prof. dr Milošu Nikoliću, na ogromnoj energiji i trudu koji je uložio u ovaj rad, kao i u sve prethodne zajedničke poduhvate. Njegova sistematičnost, upornost i pronicljivost rešavale su sa lakoćom probleme koji su mi se nekada činili nepremostivim.

Najveću zahvalnost dugujem i prof. dr Branki Bonači-Nikolić, koja je bila spiritus movens ne samo ovog doktorata, već i čitavog projekta koji je doveo do njega. Njena posvećenost, ogromno znanje i razumevanje problema, kao i brilijantan istraživački duh, bili su od ključnog značaja za realizaciju ovog projekta.

Neizmernu zahvalnost dugujem svojim kolegama, lekarima, sestrama i tehničarima sa Klinike za dermatovenerologiju, predvođenim prof. dr Ljiljanom Medenicom, a potom i kolegama sa Klinike za alergologiju i imunologiju KCS, Instituta za reumatologiju i Instituta za patologiju, koji su učestvovali u istraživanju koje je iznedrilo i ovaj doktorat. Zahvalnost njima nije samo izraz kurtoazije, već i iskrene želje da osete da su njihova nesebična pomoć i podrška naišle na duboko razumevanje.

Ogromnu zahvalnost dugujem i pacijentima sa lupusom koji su me naučili mnogim znanjima koja se u knjigama teško nalaze i od kojih i dalje učim.

Svojim roditeljima i svom bratu se zahvaljujem na bezuslovnoj veri, ljubavi i podršci, koje sam, nepravedno, često uzimao zdravo za gotovo i nemilosrdno trošio.

Na kraju, želim da se zahvalim supruzi Jeleni koja me je na i ovom putu požrtvovano pratila i bezrezervno podržavala, i kćerki Milici koja mi je dala razlog i energiju da nastavim dalje. One su ponele najveći teret i žrtvu u ovom poduhvatu, stoga im posvećujem ovu disertaciju.

U Beogradu, 07.01.2014. godine

Dr Dušan Škiljević

AKTIVNOST DEZOKSIRIBONUKLEAZE I U SERUMU: KORELACIJA SA KUTANIM, SISTEMSKIM I IMUNOSEROLOŠKIM PARAMETRIMA KOD PACIJENATA SA LUPUS ERYTHEMATOSUSOM

Rezime

Uvod. Lupus erythematosus (LE) je pleomorfno multisistemsko oboljenje koje karakteriše slom tolerancije. Proizvodnja autoantitela, deponovanje imunskih kompleksa i aktivacija komplementa dovode do zapaljenja i oštećenja tkiva. S obzirom da su autoantitela specifična za različite nukleusne i citoplazmatske antigene, LE ima širok spektar kliničkih prezentacija, dok tok bolesti karakteriše smenjivanje remisija i egzacerbacija. Danas je široko prihvaćen stav da poremećaj uklanjanja apoptotičnih ćelija i posledična sekundarna nekroza mogu dovesti do razvoja oboljenja koja imaju autoimunsku komponentu, kao što je LE. Iako većina podataka o poremećajima apoptoze kod LE dolazi iz studija na mišjim modelima, postoje i brojne studije kod pacijenata sa sistemskim LE (SLE) koje su pokazale kako pojačanu apoptozu, koja je kod kutanog lupusa indukovana UV zracima, tako i poremećaj uklanjanja apoptotičnih ostataka, u čemu glavnu ulogu igra dezoksiribonukleaza I (DNaza I), glavna nukleaza seruma. Smatra se da je DNaza I jedan od ključnih molekula u razvoju SLE. Postoji nekoliko razloga za ovu tvrdnju: a) dsDNA je predominantan autoantigen kod pacijenata sa SLE, b) DNaza iz bovinog pankreasa uništava antigenost DNK, i c) aktivnost DNaze I u serumu pacijenata sa SLE je često niska i to sniženje je veće kod pacijenata sa aktivnijim SLE.

Ciljevi istraživanja. Ispitati da li postoji korelacija između nivoa aktivnosti DNaze I u serumu i indeksa aktivnosti bolesti kod pacijenata sa kutanim LE (CLE) i SLE, kao i imunoseroloških parametara aktivnosti SLE. Utvrditi stepen apoptoze u koži lezije i zdravoj fotoprotektovanoj koži kod pacijenata sa LE i ispitati da li postoji korelacija između stepena apoptoze u koži i nivoa aktivnosti DNaze I u serumu.

Pacijenti i metode. Studija je obuhvatila 146 pacijenata sa LE, 121 ženu i 25 muškaraca. Kod pacijenata su registrovane sledeće varijable: aktivnost DNaze I u serumu, klinički indeksi aktivnosti bolesti (SLEDAI-2K, SLICC/ACR, CLASI), laboratorijski pokazatelji aktivnosti oboljenja (sedimentacija eritrocita (SE), fibrinogen u serumu), parametri urođene imunosti (komponente komplementa (C3 i C4), C-reaktivni protein (CRP)), parametri stečene imunosti (ANA, anti-nukleozomalna, anti-histonska, anti-dsDNA antitela). Ispitivanje indeksa apoptoze je sprovedeno kod 69 pacijenata sa LE, i to kod 30 pacijenata sa SLE i kutanim manifestacijama i 39 pacijenata sa isključivo kutanim formama LE. Poređeni su indeksi apoptoze u koži lezije i fotoprotektovanoj zdravoj koži glutealnog regiona sa nalazima direktnog imunofluorescentnog (DIF) testa sa istih lokalizacija, kao i nalazima navedenih imunoseroloških parametara LE.

Rezultati. Nisku aktivnost DNaze I u serumu je imalo 64/146 pacijenata (43,8%). Prosečna aktivnost DNaze I u serumu pacijenata sa LE je bila značajno niža nego kod zdravih osoba iz kontrolne grupe (t test, $p < 0,001$). Pacijenti sa niskom DNazom I u serumu su značajno češće imali specifične kutane lezije u poređenju sa pacijentima sa SLE i normalnom aktivnošću DNaze I, dok zahvatanje drugih organa i sistema nije imalo statističku vezu sa sniženjem DNaze I (hi kvadrat test, $p = 0,022$). Logističkom regresijom je dokazano da pacijenti koji imaju sniženu aktivnost DNaze I u serumu imaju 2,9 puta veću šansu da razviju kutane lezije nego pacijenti sa normalnim nivoom DNaze I u serumu (95% CI za RR iznosi 1,2-7,0). Nadalje, nađena je pozitivna korelacija između SLEDAI-2K i aktivnosti DNaze I u serumu. Aktivnost DNaze I kod pacijenata sa aktivnijim SLE (SLEDAI-2K ≥ 7) je bila veća nego kod pacijenata sa manje aktivnom bolešću (SLEDAI-2K < 7), mada obe prosečne vrednosti nisu dostigle nivo zabeležen kod zdravih osoba (ANOVA, $p < 0,001$). Nije nađena korelacija aktivnosti DNaze I sa indeksom oštećenja tkiva kod SLE - SLICC/ACR i parametrima aktivnosti kutanog lupusa (CLASI, RCLASI). Kod pacijenata sa SLE je nađena pozitivna korelacija između aktivnosti DNaze I u serumu i koncentracije anti-dsDNA antitela, anti-nukleozomalnih, anti-

histonskih antitela i ANA, dok nije nađena korelacija sa nivoom C3 i C4 u serumu. Tokom praćenja pacijenata sa SLE registrovana je pozitivna korelacija između promena u aktivnosti DNaze I u serumu i promena u SLEDAI-2K indeksu ($p < 0,01$). Promene u SLEDAI-2K su jače korelirale sa promenama aktivnosti DNaze I u serumu nego sa promenama titra ANA ili nivoa anti-nukleozomalnih i anti-histonskih antitela. Stepenn apoptoze u koži, odnosno apoptotski indeks u leziji je bio značajno viši nego u zdravoj koži (t test, $p < 0,001$). Nije bilo razlike u indeksu apoptoze između pacijenata sa CLE i SLE, kao ni između pacijenata sa različitim podtipovima CLE (ANOVA), osim indeksa apoptoze u leziji kod subakutnog CLE (SCLE) koji je bio značajno veći nego kod diskoidnog LE (DLE) ($p = 0,046$). Od indeksa aktivnosti lupusa, nađena je značajna pozitivna korelacija između indeksa apoptoze u leziji sa indeksima CLASI A i RCLASI D, dok ostale korelacije nisu dostigle statističku značajnost. Takođe, nije nađena korelacija stepena apoptoze u leziji i zdravoj koži ni sa jednim imunoserološkim parametrom LE, niti sa aktivnošću DNaze I u serumu. Međutim, pokazano je da pacijenti koji imaju normalnu aktivnost DNaze I u serumu i normalan indeks apoptoze u leziji kože imaju značajno niži CLASI A skor od pacijenata koji imaju sniženu aktivnost DNaze I u serumu i/ili povišen apoptotski indeks (ANOVA sa *post hoc* analizom pomoću LSD i t testa, $p = 0,017$). DIF test sa lezije je bio pozitivan kod 38/69 pacijenata (55,1%), a *lupus band test* (LBT) kod 10 (14,5%). Pacijenti sa pozitivnim i negativnim DIF/LBT se nisu međusobno razlikovali po vrednostima apoptotskog indeksa i aktivnosti DNaze I u serumu.

Zaključak. Aktivnost DNaze I u serumu korelira sa SLEDAI-2K i nivoom anti-dsDNA, anti-nukleozomalnih, anti-histonskih antitela i ANA, te može biti koristan biomarker aktivnosti SLE. Prosečan indeks apoptoze je veći u leziji nego u zdravoj koži pacijenata sa CLE. Apoptotski indeks u leziji korelira sa indeksima aktivnosti CLASI A i oštećenja RCLASI D. Pacijenti koji imaju normalnu aktivnost DNaze I u serumu i normalan indeks apoptoze u leziji kože imaju značajno niži CLASI A skor od pacijenata koji imaju sniženu aktivnost

DNaze I u serumu i/ili povišen apoptotski indeks. Snižena aktivnosti DNAze I u serumu pacijenata sa LE doprinosi razvoju kutanih lezija.

Ključne reči: dezoksiribonukleaza I, lupus erythematosus, kutani lupus, indeksi aktivnosti lupusa, imunoserološki biomarkeri, indeks apoptoze u koži

SERUM DESOXYRIBONUCLEASE I ACTIVITY: CORRELATION WITH CUTANEOUS, SYSTEMIC AND IMMUNOSEROLOGICAL MARKERS IN PATIENTS WITH LUPUS ERYTHEMATOSUS

Abstract

Introduction. Lupus erythematosus (LE) is a pleomorphic multisystemic disease characterized by the breakdown of tolerance. Production of autoantibodies, immune complex deposition and complement activation leads to inflammation and tissue damage. Given that autoantibodies are specific for different nuclear and cytoplasmic antigens, LE has a wide range of clinical presentations, and course of the disease is characterized by alternating of remissions and exacerbations. Today it is widely accepted that disorders of removal of apoptotic cells and the consequent secondary necrosis can lead to the development of autoimmune diseases, such as the LE. Although most of the data on apoptosis in LE comes from studies in mouse models, there are a number of studies in patients with systemic LE (SLE). These studies showed increased apoptosis, UV-induced in the cutaneous lupus, and disturbance of removal of apoptotic debris, the process in which desoxyribonuclease I (DNase I), the principal serum nuclease, plays the major role. DNase I is thought to be one of the key molecules in the development of SLE for several reasons: a) double-stranded DNA (dsDNA) is the predominant autoantigen in patients with SLE, b) DNase from bovine pancreas destroys the antigenicity of DNA, and c) the DNase I activity in sera of SLE patients is often low and that decrease is more profound in patients with active SLE.

Aims of the investigation. To examine whether there is a correlation between the level of serum DNase I activity and indices of the disease activity in patients with cutaneous LE (CLE) and SLE, and immunological parameters of SLE activity. To determine the degree of apoptosis in the skin lesions and healthy photoprotected skin in patients with LE and to examine whether there is a correlation between the degree of apoptosis in the skin and serum DNase I

activity.

Patients and methods. A total of 146 patients with LE, 121 women and 25 men, was included in the study. The following variables were registered: serum DNase I activity, clinical disease activity indices (SLEDAI-2K, SLICC/ACR, CLASI), laboratory indicators of disease activity (erythrocyte sedimentation rate (ESR), fibrinogen levels), the parameters of innate immunity (complement components (C3, C4), C-reactive protein (CRP)), the parameters of acquired immunity (ANA, anti-nucleosomal, anti-histone, anti-dsDNA antibodies). The investigation of apoptosis indices was conducted in 69 patients with LE, 30 patients with SLE and cutaneous manifestations and 39 patients with only cutaneous forms of LE. Indices of apoptosis in skin lesions and healthy sun-protected skin of gluteal region were compared with direct immunofluorescence (DIF) test results at the same localization and with the findings of the aforementioned immunological parameters of LE.

Results. Low DNase I activity in serum had 64/146 patients (43.8%). The mean DNase I activity in sera of patients with LE was significantly lower than in healthy subjects in the control group (t test, $p < 0.001$). Patients with low DNase I activity had significantly more frequently specific cutaneous lesions compared with patients with SLE and normal DNase I activity. Involvement of other organs had no statistical relationship with the decrease in DNase I activity (chi-square test, $p = 0.022$). Logistic regression analysis showed that patients who have reduced DNase I activity are 2.9 times more likely to develop cutaneous lesions than patients with normal levels of serum DNase I (95% CI for the RR is 1.2-7.0). Furthermore, the positive correlation was observed between the SLEDAI-2K and the serum DNase I activity. DNase I activity in patients with more active SLE (SLEDAI-2K ≥ 7) was higher than in patients with less active disease (SLEDAI-2K < 7), although both values did not reach the level recorded in healthy subjects (ANOVA, $p < 0.001$). There was no correlation of the DNase I activity with index of tissue damage in SLE - SLICC/ACR, or with indices of activity of CLE (CLASI, RCLASI). The positive correlation between the serum

DNase I activity and the levels of anti-dsDNA, anti-nucleosomal, anti-histone antibodies and ANA was found in SLE patients. There was no correlation between the serum DNase I activity and the levels of C3 and C4 in the same group. During the follow-up we registered the positive correlation between the changes of DNase I activity and the changes of SLEDAI-2K ($p < 0.01$). The changes of SLEDAI-2K showed stronger correlation with the changes of DNase I activity than with the changes of concentrations of ANA, anti-nucleosomal and anti-histone antibodies. The degree of apoptosis, or apoptotic index, was significantly higher in the skin lesions than in healthy skin (t test, $p < 0.001$). There was no difference in the apoptotic index between the patients with CLE and SLE, as well as between the patients with different subtypes of CLE (ANOVA). The only exception was that the apoptotic index in the lesion of subacute CLE (SCLE) was significantly higher than in discoid LE (DLE) ($p = 0.046$). Among the lupus activity indices, we found a significant positive correlation between the index of apoptosis in the lesion with indices CLASI A and RCLASI D, while the other correlations did not achieve statistical significance. Also, there was no correlation between the degree of apoptosis in the lesion and healthy skin with any immunoserological parameter LE, nor with the activity of DNase I in serum. However, we demonstrated that patients with normal DNase I activity and normal apoptotic index in skin lesions have significantly lower CLASI A score than the patients with low DNase I activity and/or high apoptotic index (ANOVA with *post hoc* analysis with LSD and t test, $p = 0.017$). DIF test in the lesion was positive in 38/69 patients (55.1%), and lupus band test (LBT) in healthy skin in 10 patients (14.5%). There were no differences in apoptotic indices or DNase I activity between the patients with positive and patients with negative DIF/LBT.

Conclusions. Serum DNase I activity correlates with SLEDAI-2K and the levels of anti-dsDNA, anti-nucleosomal, anti-histone antibodies and ANA, and it might be a useful biomarker of SLE activity. The average index of apoptosis is higher in lesions than in healthy skin of patients with CLE. Apoptotic index in

lesion correlates with the activity index CLASI A and damage index RCLASI D. Patients with normal DNase I activity and normal apoptotic index in skin lesions had significantly lower CLASI A score than the patients with low DNase I activity and/or high apoptotic index. Reduction of serum DNase I activity in LE patients contributes to the development of skin lesions.

Key words: desoxyribonuclease I, lupus erythematosus, cutaneous lupus, lupus activity indices, immunoserological biomarkers, apoptotic index in the skin

LISTA SKRAĆENICA

ACLE - akutni kutani lupus erythematosus

ACR - Američki koledž za reumatologiju (*engl.* American College of Rheumatology)

ADCC - ćelijska citotoksičnost zavisna od antitela (*engl.* antibody-dependent cellular cytotoxicity)

AI - apoptotski indeks

ANA - antinukleusna antitela

ANCA - antineutrofilna citoplazmatska antitela

ANOVA - jednofaktorska numerička analiza varijanse

Anti-dsDNA At - antitela na dvostruko uvijenu dezoksiribonukleinsku kiselinu

APĆ - antigen-prezentujuće ćelije

At - antitelo

ATP - adenzin trifosfat

BILAG - *engl.* British Isles Lupus Assessment Group, indeks aktivnosti SLE

BLE - bulozni lupus erythematosus

C1q - C1q komponenta komplementa

C3 - C3 komponenta komplementa

C3c - C3c komponenta komplementa

C4 - C4 komponenta komplementa

CCL17 - hemokin ligand 17

CCLE - hronični kutani lupus erythematosus

CHLE - chilblain lupus erythematosus

CI - interval poverenja

CLASI - indeks aktivnosti kutanog lupus erythematosides-a (*engl.* Cutaneous Lupus Erythematosus Disease Area and Severity Index)

CLE - kutani lupus erythematosus

CNS - centralni nervni sistem

CRP - C -reaktivni protein

CXCR1 - hemokin (CXC) receptor 1

CXCR2 - hemokin (CXC) receptor 2

DCC - *engl.* deleted in colorectal carcinoma

DĆ - dendritične ćelije

DIF - direktna imunofluorescencija

DLE - diskoidni lupus erythematosus

DNaza - dezoksiribonukleaza

DNaza I - dezoksiribonukleaza I

DNaza III (TREX 1) - dezoksiribonukleaza III

DNK - dezoksiribonukleinska kiselina

dsDNA - dvostruko uvijena dezoksiribonukleinska kiselina (*engl.* double-stranded deoxyribonucleic acid)

EBV - Epstein Barr-ov virus

ECLAM - *engl.* European Consensus Lupus Activity Measure, indeks aktivnosti SLE

ELISA - *engl.* enzyme-linked immunosorbent assay

GVHD - bolest kalem-protiv-domaćina (*engl.* graft-versus-host disease)

HEp-2 ćelije - epitelne ćelije karcinoma larinksa

HLA - humani leukocitni antigen

HMGB1 - *engl.* high-mobility group protein B1

HP - histopatološki

IBD - inflamatorna bolest creva

ICLE - intermitetni lupus erythematosus

IFN - interferon

Ig - imunoglobulin

IgA - imunoglobulin A

IgG - imunoglobulin G

IgM - imunoglobulin M

IIF - indirektna imunofluorescencija

IL - interleukin

LBT - *engl.* lupus band test

LE - lupus erythematosus

LPC - lizofosfatidilholin

LSD test - test najmanjih značajnih razlika (*engl.* Least Significant Difference test)

MAC - kompleks koji oštećuje ćelijsku membranu (*engl.* membrane attack complex)

MHC - glavni kompleks tkivne podudarnosti (*engl.* major histocompatibility complex)

NCCD - Komitet za nomenklaturu ćelijske smrti (*engl.* Nomenclature Committee on Cell Death)

NETs - neutrofilne ekstracelularne zamke (*engl.* neutrophil extracellular traps)

NMDARs - receptori za N-metil-D-aspartat

PAMPs - molekularni obrasci patogena (*engl.* pathogen-associated molecular patterns)

RCLASI - revidirani indeks aktivnosti kutanog lupus erythematosus-a (*engl.* Revised Cutaneous Lupus Erythematosus Disease Area and Severity Index)

RNK - ribonukleinska kiselina

RR - relativni rizik

SAD - Sjedinjene Američke Države

SBC - *engl.* „sunburned cells“

SCLE - subakutni kutani lupus erythematosus

SD - standardna devijacija

SE - sedimentacija eritrocita

SLAM - *engl.* Systemic Lupus Activity Measure, indeks aktivnosti SLE

SLE - sistemski lupus erythematosus

SLEDAI - Indeks aktivnosti sistemskog lupus erythematosus-a (*engl.* Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index)

SLEDAI-2K - indeks aktivnosti sistemskog lupus erythematosus-a 2000 (*engl.* Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000)

SLICC/ACR - *engl.* Systemic Lupus International Collaborating Clinic/ American College of Rheumatology indeks oštećenja tkiva kod SLE

SPSS - statistički softverski paket (*engl.* Statistical Package for Social Sciences)

SRED - pojedinačna radijalna enzimaska difuzija (*engl.* Single Radial Enzyme Diffusion)

TCR - T ćelijski receptor

TLR - *Toll-like* receptor

TNF - faktor nekroze tumora (*engl.* tumor necrosis factor)

TRAIL - ligand povezan sa TNF koji indukuje apoptozu (*engl.* TNF-related apoptosis inducing ligand)

TSP-1 - trombospondin-1

TUNEL - *engl.* terminal deoxynucleotidyl transferase - mediated dUTP nick end labeling

UV - ultravioletno

UVA - ultravioletni A

UVB - ultravioletni B

ZBM - zona bazalne membrane

SADRŽAJ

1. Uvod	1
1.1. Lupus erythematosus	1
1.1.1. Definicija lupus erythematosus-a	1
1.1.2. Istorijat LE	1
1.1.3. Epidemiološki podaci	2
1.1.3.1. Prevalencija i incidencija LE	2
1.1.3.2. Uticaj rase, pola i uzrasta na morbiditet	2
1.1.3.3. Mortalitet od lupusa	3
1.1.4. Klasifikacija lupusa	3
1.2. Sistemski lupus erythematosus.....	3
1.2.1. Patogeneza, poremećaji stečenog i urođenog imuniteta u okviru SLE.....	3
1.2.1.1. Genetska predispozicija	4
1.2.1.2. Pol i hormoni.....	4
1.2.1.3. Uticaj okoline	5
1.2.1.4. Autoantitela.....	5
1.2.1.5. Poremećaji urođenog i stečenog imuniteta	6
1.2.1.6. Oštećenje tkiva u okviru SLE.....	7
1.2.2. Klinička slika i ACR kriterijumi za dijagnozu SLE	8
1.2.2.1. Lezije kože kod pacijenata sa SLE.....	10
1.2.2.2. Laboratorijski nalazi od značaja za dijagnozu i praćenje toka - biomarkeri SLE	11
1.2.3. Indeksi aktivnosti bolesti i oštećenja tkiva	12
1.3. Kutani lupus erythematosus	13
1.3.1. Patogeneza kutanog lupusa i odnos sa SLE	13
1.3.2. Klasifikacija i klinička slika kutanog lupusa	15
1.3.3. Indeksi aktivnosti kutanog lupusa	19
1.4. Apoptoza	20

1.4.1. Definicija i značaj apoptoze u homeostazi i patogenezi oboljenja	20
1.4.2. Mehanizmi apoptoze	21
1.4.3. Poremećaji apoptoze i autoimunost	23
1.4.4. Poremećaji apoptoze kod lupusa	26
1.4.4.1. Značaj apoptoze za kutani lupus, merenje apoptoze u kutanim lezijama	27
1.5. Dezoksiribonukleaze - istorijat, vrste, uloga u patogenezi lupusa	29
1.6. Radna hipoteza	34
2. Ciljevi istraživanja	35
3. Pacijenti i metode	36
3.1. Selekcija ispitanika	36
3.2. Instrumenti merenja	38
3.3. Statistička analiza	44
4. Rezultati	45
4.1. Demografski podaci, klinički, imunološki i serološki parametri bolesti	45
4.2. Korelacija aktivnosti DNaze I u serumu sa kliničkim i imunoserološkim parametrima LE	47
4.2.1. Razlike u aktivnosti DNaze I u serumu kod različitih populacija pacijenata sa LE	47
4.2.2. Aktivnost DNaze I i zahvatanje organa kod SLE	52
4.2.3. Odnos aktivnosti DNaze I u serumu i indeksa aktivnosti bolesti	52
4.2.4. Odnos aktivnosti DNaze I u serumu i biomarkera LE	59
4.2.4.1. Odnos aktivnosti DNaze I sa parametrima SE, fibrinogen i CRP u serumu	61
4.2.4.2. Odnos aktivnosti DNaze I sa antitelima - markerima lupusa, kao i komponentama komplementa	61
4.2.5. Podaci o praćenju 35 pacijenata sa SLE	65
4.3. Step en apoptoze u koži	67
4.3.1. Demografski podaci, klinički, imunološki i serološki parametri bolesti	67

4.3.2. Razlika u indeksu apoptoze u koži između lezije i zdrave kože	69
4.3.3. Odnos stepena apoptoze u koži između različitih podgrupa pacijenata sa LE	70
4.3.4. Odnos indeksa apoptoze sa indeksima aktivnosti lupusa	71
4.3.5. Odnos stepena apoptoze u koži sa imunoserološkim parametrima LE	72
4.3.6. Odnos aktivnosti DNaze I u serumu sa stepenom apoptoze	73
4.3.7. Nalazi DIF testa i njihov odnos sa stepenom apoptoze i aktivnošću DNaze I u serumu	75
4.4. Odnos aktivnosti DNaze I u serumu i učestalosti kutanih lezija	76
4.5. Korelacija SLEDAI i CLASI/RCLASI sa kombinacijom niske aktivnosti DNaze I u serumu i veće apoptoze u koži.....	77
5. Diskusija.....	78
6. Zaključci	94
Literatura	97
Prilozi	125
Prilog 1 - SLEDAI-2K.....	125
Prilog 2 -ACR/SLICC indeks	127
Prilog 3 - CLASI skor	128
Prilog 4 - RCLASI skor	129
Biografija autora.....	131

1. UVOD

1.1. LUPUS ERYTHEMATOSUS

1.1.1. DEFINICIJA LUPUS ERYTHEMATOSUS-A

Lupus erythematosus (LE) je pleomorfno multisistemsko oboljenje koje karakteriše slom tolerancije. Proizvodnja autoantitela, deponovanje imunskih kompleksa i aktivacija komplementa dovode do zapaljenja i oštećenja tkiva (1). S obzirom da su autoantitela specifična za različite nukleusne i citoplazmatske antigene, LE ima širok spektar kliničkih prezentacija, dok tok bolesti karakteriše smenjivanje remisija i egzacerbacija. Patološki imunski odgovor kod LE pokreću različiti faktori sredine (ultravioletno (UV) zračenje, virusi, lekovi) na terenu genetske konstitucije koju karakteriše poremećaj imunskih regulatornih mehanizama (2). LE nastaje u nekoliko koraka; prvi predstavlja dug period predispozicije za razvoj autoimunosti, nakon čega, kod malog broja predisponiranih osoba, sledi proizvodnja autoantitela, da bi se nakon nekoliko meseci ili godina razvili klinički simptomi i znaci bolesti (3).

1.1.2. ISTORIJAT LE

Reč lupus (*lat.* vuk) označava destruktivne lezije koje izgledaju kao ujedi vuka (4). Smatra se da je Hipokrat pod terminom *herpes esthiomenes* uključivao i lupus (5). U engleskoj literaturi reč se koristi od X veka, od biografije Svetog Martina (5). Do sredine XIX veka reč lupus je označavala ulceraciju ili nekrozu bilo koje etiologije koja zahvata lice ili donje ekstremitete (6). Prvi jasan opis lupus erythematosus-a pripada Laurent-u Biètt-u (*erytheme centrifuge*, 1833) (7), čiji rad je 1851. godine objavio njegov student, Pierre Cazenave, a oboljenje nazvao *lupus erytemateux* (8). Prema opisu, jasno je da se radilo o diskoidnom lupusu. Prvi opis eritema u vidu leptira dao je Ferdinand von Hebra (*seborrhea congestiva*, 1866) (9). Moritz Kaposi je, zajedno sa Cazennave-om, najzaslužniji za razdvajanje lupus erythematosus-a od lupus vulgaris-a, a takođe je prvi

opisao sistemske znakove LE (1872) - febrilnost, gubitak težine, anemiju, limfadenopatiju i artritis (10). Jonatan Hutchinson je zaslužan za otkrivanje uticaja fotosenzitivnosti na nastanak eritema u vidu leptira (11). Nakon II svetskog rata, sa naglim razvojem nauke o imunitetu, došlo je do značajnih otkrića u patogenezi, kliničkoj slici i biomarkerima lupusa. Međutim, ovaj razvoj nije bio praćen razvojem novih terapijskih modaliteta, tako da je američka agencija za hranu i lekove 2011. godine odobrila upotrebu belimumaba, prvog novog leka odobrenog za lečenje LE nakon više od 50 godina (12).

1.1.3. EPIDEMIOLOŠKI PODACI

1.1.3.1. Prevalencija i incidencija LE

Prevalencija sistemskog LE (SLE) u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) iznosi između 14,6 i 122 pacijenta na 100000 ljudi (13,14). U studijama sprovedenim u državama sa predominatno populacijom bele rase, prevalencija se procenjuje na 12,5 kod žena u Engleskoj (15) do 39 na 100000 kod oba pola u Švedskoj (16). Ovolika varijabilnost u podacima se objašnjava ne samo faktorima domaćina, odnosno sredine u različitim populacijama, već prvenstveno razlikama u primenjenoj metodologiji i razlikama u dostupnim izvorima podataka (17). Prosečna incidencija u SAD, ali i u drugim regionima, se kreće od 1,8 do 7,6 pacijenata na 100000 osoba godišnje (13,18,19,20).

1.1.3.2. Uticaj rase, pola i uzrasta na morbiditet

LE je bolest ženskog pola - u svim studijama više od 90% pacijenata se SLE su ženskog pola. Međutim, ovako velika razlika između polova (6-10 puta u korist žena) je zabeležena samo u uzrasnoj grupi od 15 do 64 godine, i kod bele i crne rase (21). Kod pacijenata mlađih od 14 i starijih od 65 godina nije zabeležena ovako velika razlika između polova (naročito kod crne rase), što ukazuje na značaj hormona u razvoju SLE. Kod osoba crne rase SLE je inače češći (13,14,22,23).

1.1.3.3. Mortalitet od lupusa

Na najvećoj studiji mortaliteta od lupusa, urađenoj u SAD između 1968 i 1978. godine, nađeno je da je u navedenom periodu umrlo 11156 osoba sa LE, 23% sa diskoidnim i 77% sa SLE, nije bilo razlika između ove 2 grupe u polu, rasi, regionu ili godini (24). Nađeno je da je stopa mortaliteta kod belih žena 6,0, žena crne rase - 17,6, belih muškaraca - 1,8 i crnih muškaraca - 3,0 na milion godišnje (24). U studijama u Finskoj, Engleskoj i Karibima (Kurasao) stopa mortaliteta je bila 4,7, 2,5 i 17,0 na milion osoba godišnje (25,26).

Standardizovana stopa mortaliteta (odnos opserviranog i očekivanog broja smrtnih slučajeva) u studiji objavljenj 2006. godine je bila 2,4 (27). Posebno visok mortalitet je nađen kod cirkulatornih bolesti, infekcija, bubrežne bolesti, non-Hoćkinovog limfoma i karcinoma pluća. Najveću standardizovanu stopu mortaliteta su imale osobe ženskog pola, crne rase, mlađi i pacijenti sa trajanjem SLE manjim od 1 godine.

1.1.4. KLASIFIKACIJA LUPUSA

Računa se da oko 15% pacijenta sa lupusom imaju isključivo kutane forme, oko 70% ima SLE, 10% pacijenata ima sindrom preklapanja sa drugom reumatskom bolešću (ispunjavaju kriterijume i za SLE i za drugo oboljenje), a oko 5% pacijenata ima lupus indukovan lekovima (28).

1.2. SISTEMSKI LUPUS ERYTHEMATOSUS

1.2.1. PATOGENEZA, POREMEĆAJI STEČENOG I UROĐENOG IMUNITETA U OKVIRU SLE

Danas se smatra da se SLE razvija u nekoliko koraka (3). Prvi predstavlja dugotajna predispozicija za razvoj autoimunosti, a potom se kod malog boja ovih osoba razvijaju autoantitela, što sve prethodi kliničkim simptomima, i to više meseci i godina (29). Jedan broj osoba sa autoantitelima razvije kliničke prodrome koji ne zadovoljavaju kriterijume za postavljenje dijagnoze SLE, a

jedan deo njih razvije kompletan SLE sa različitim simptomima, autoantitelima i laboratorijskim abnormalnostima. Na kraju, pacijenti sa SLE tokom vremena imaju egzacerbacije i remisije (obično parcijalne) i oštećenja organa i komorbiditete povezane sa hroničnom inflamacijom, terapijom ili starenjem (3).

1.2.1.1. Genetska predispozicija

Ovo je možda najvažniji pojedinačni faktor u prvoj fazi (30, 31). Osim deficita C1q, kod kog homozigoti u >90% slučajeva razvijaju SLE (32), kao i deficita C4, nijedan drugi polimorfizam pojedinačnog gena nije odgovoran konkretno za nastanak SLE (33). Nedostatak C1q dovodi do defekata u eliminaciji apoptotičnog materijala, dok nedostatak C4 dovodi do smanjene eliminacije autoreaktivnih B limfocita (32). Većina polimorfizama pojedinačnih nukleotida koji su povezani sa SLE se javlja u nekodirajućim regionima DNK u genima povezanim sa imunskim odgovorom. Neki od ovih gena su povezani sa različitim autoimunskim bolestima, a neki su specifični za SLE. Međutim, računa se da do sada identifikovani lokusi doprinose samo oko 15% hereditarnosti SLE (34). Do sada je poznato barem 40 lokusa u hromozomima koji nose gene susceptibilnosti za SLE, ovi regioni nisu identični kod različitih rasa i etničkih grupa (35). Takođe, identifikovani su i geni i regioni koji predisponiraju razvoj određenih fenotipova SLE, npr. nefritisa, vaskulitisa, artritisa i hemolitičke anemije (3). Ekspresija gena zavisi od metilacije DNK i modifikacije (acetilacije i metilacije) histona. Lekovi, kao što su hidralazin i prokainamid, inhibiraju metilaciju DNK i dovode do kliničkih manifestacija lupusa i kod zdravih osoba (34).

1.2.1.2. Pol i hormoni

LE se značajno češće javlja kod žena, i to u generativnom periodu, što sugeriše uticaj hormona, za sada nejasnim mehanizmima (34). Estradiol najverovatnije produžava život autoreaktivnih B i T limfocita (36). Izgleda da X hromozom deluje nezavisno od hormona, jer je na kastriranim i genetski

izmenjenim miševima pokazano da prisustvo 2 X hromozoma povećava težinu SLE (37)

1.2.1.3. Uticaj okoline

Ultravioletno (UV) zračenje nesumnjivo izaziva pogoršanja kod većine pacijenata sa SLE, verovatno zbog menjanja strukture DNK u dermu, koja je čini imunogenom, kao i zbog indukcije apoptoze keratinocita i ćelija u dermu koja dovodi do prezentacije sopstvenih antigena imunskom sistemu preko apoptotskih telašaca (3). Odavno je poznato da infekcije indukuju i pogoršavaju SLE, poslednji radovi povezuju infekcije Ebstein Barr-ovim virusom (EBV) (38,39) i Parvovirusom B19 (40) sa SLE. EBV aktivira B limfocite, a takođe sadrži antigen u jedru (EBNA 1) koji pokazuje molekularnu mimikriju sa sekvencom u Ro čestici (38). Epidemiološke studije su ukazale na pušenje kao kontributivni faktor nastanku SLE i CLE (41,42), pušenje takođe umanjuje terapijski odgovor na antimalarike (43).

1.2.1.4. Autoantitela

Autoantitela su glavni efektori u SLE. Kod ljudi su ona neophodna, ali ne i dovoljna za razvoj SLE, jer da bi došlo do oštećenja tkiva i organa, neophodno je da njihovo deponovanje bude praćeno aktivacijom komplementa i/ili drugih medijatora inflamacije, što dovodi do hemotaksije limfocita i fagocita, oslobađanja citokina, hemokina i proteolitičkih enzima, kao i oksidativnog oštećenja tkiva. Kod oko 85% pacijenata sa SLE pojava autoantitela prethodi prvim simptomima bolesti u proseku 2 do 3 godine, a u nekim slučajevima, čak i do 9 godina (1). Ona se javljaju sukcesivno, i to prvo antinukleusna antitela (ANA), potom anti DNK antitela i antifosfolipidna antitela, a na kraju anti SM i anti RNP. Ovi podaci ukazuju da se imunska kontrola potencijalno patogenih autoantiela može održati godinama i da se bolest javlja kod osoba kod kojih se ova regulacija iscrpi (44).

1.2.1.5. Poremećaji urođenog i stečenog imuniteta

Infekcije i sopstveni antigeni kao „signali opasnosti“ aktiviraju urođeni imunitet prvenstveno putem dendritičnih ćelija (DĆ) koje su locirane u tkivima koja su u kontaktu sa spoljašnjom sredinom (pluća, creva, koža, periferna limfoidna tkiva). Ona sadrže *Toll-like* receptore (TLR) za molekularne obrasce patogena (*engl.* pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) koje imaju bakterije i virusi. Važno za SLE je da TLR9 na DĆ i B limfocitima može vezati CpG sekvenciju DNK (45, 46), a takođe i samu DNK iz DNK/antiDNK imunskih kompleksa, dok se antiDNK antitela vezuju za receptore na DĆ, što dodatno aktivira urođeni imunitet. Drugi TLR (TLR 3, 7, 8) prepoznaju virusnu DNK ili RNK, dok se kompleksi RNK i proteina koji su karakteristični za SLE mogu takođe vezivati za TLR 7 (47). Vezivanje bilo kog od ovih TLR, posebno za plazmocitoidne DĆ, dovodi do oslobađanja interferona (IFN) alfa i ostalih citokina, koji svi omogućavaju sazrevanje nezrelih DĆ i monocita/makrofaga, koji na taj način postaju moćne antigen-prezentujuće ćelije (APĆ) i aktiviraju T limfocite, a putem sopstvenih citokina dodatno stimulišu sazrevanje i aktivaciju T limfocita (naročito u pravcu Th1 fenotipa) i B limfocita, kod kojih dovode do povećane sinteze imunoglobulina i prebacivanje na patogene IgG podklase. Na taj način se nastaju aktivirane T i B ćelije (od kojih su neke autoreaktivne), koje su spremne da učestvuju u stečenom imunskom odgovoru. Svi ovi procesi se dešavaju i kod zdravih osoba, pacijenti sa SLE samo imaju veću količinu hipometilisane DNK sa CpG sekvencijama (48), cirkulišućih DNK/antiDNK kompleksa i, moguće, skorašnju ili reaktiviranu infekciju sa EBV ili Parvovirusom B19 (38, 39, 49).

Poremećaji stečenog imuniteta dovode do stvaranja aktivisanih autorekativnih T i B limfocita. Strani sopstveni antigeni se susreću sa aktivisanim APĆ koje ih preuzimaju, internalizuju i procesiraju, i na kraju prezentuju peptide na površini molekula kompleksa tkivne podudarnosti (*engl.* major histocompatibility complex, MHC). Za razliku od DĆ koje su glavne APĆ u urođenoj imunosti, u stečenoj imunosti glavne APĆ su B limfociti i

monociti/makrofagi. Takođe, pojedine ćelije koje ne pripadaju imunitetu, kao što su mezangijalne ćelije, mogu eksprimirati MHC klase II na površini i služiti kao APĆ za lokalnu aktivaciju T ćelija. T limfociti sa receptorom za specifični antigen dobijaju prvi aktivacijski signal putem MHC/peptidnog kompleksa, a potom i drugi putem CD86 molekula na aktivisanim APĆ. U slučaju pomoćničkih T ćelija, one se aktiviraju i luče citokine (interleukin (IL)-6, IL-10) koji pomažu B limfocitima da proizvedu autoantitela. Ovaj proces proizvodnje autoantitela je veoma aktivan kod SLE, dok su sa druge strane oštećeni mnogi regulatorni mehanizmi koji bi trebalo da suprimiraju proizvodnju antitela, kao što je smanjena fagocitoza apoptotičnih ćelija i imunskih kompleksa (50) i proizvodnja regulatornih CD4⁺CD25⁺ i supresorskih CD8⁺ T ćelija (43).

1.2.1.6. Oštećenje tkiva u okviru SLE

Glavnu ulogu u oštećenju tkiva kod SLE imaju imunski kompleksi (34). Velika količina imunskih kompleksa se formira kada se ANA vežu za nukleusni materijal koji je prisutan u povećanim količinama u krvi i tkivima i koji se ne uklanja pravilno jer su Fc receptori za komplement brojčano i funkcionalno deficitarni (51). Pored aktivacije komplementa, imunski kompleksi menjaju funkciju Fc receptora, a poremećaj uklanjanja imunskih kompleksa je genetski povezan sa polimorfizmom gena za Fc receptor (52) i C3bi (53).

Premda se u toku SLE stvara veliki broj autoantitela, za samo mali broj je dokazana direktna uloga u oštećenju tkiva, kao što su npr. antitela na ćelije krvi koja uzrokuju citopenije. Tako antitela na T ćelije (CD3 i TCR) suprimiraju proizvodnju IL-2 (54), a anti Ro antitela smanjuju funkciju mišićnih ćelija i sprovodnog sistema i izazivaju kongenitalni blok srca kod neonatalnog lupusa (55). Neka antitela na DNK ukršteno reaguju na receptore za N-metil-D-aspartat (NMDARs) u mozgu, što dovodi do neurokognitivnih defekata (56). Antitela na fosfolipide i beta-2 glikoprotein izazivaju tromboze u okviru antifosfolipidnog sindroma (57). Ona se vezuju i za ćelije trofoblasta placente, aktiviraju komplement i tako dovode do gubitka ploda (58).

Antitela na DNK, fosfolipide, histone i ribonukleoproteine se mogu vezati i za ishemična tkiva i dodatno ih oštetiti putem aktivacije komplementa, što može objasniti egzacerbacije lupusa nakon primarnog oštećenja (59).

U oštećenju kože i bubrega učestvuju i T ćelije iz krvi koje eksprimiraju athezione molekule, kakav je CD44, koji im omogućavaju da se nasele u tkivu. One luče IL-17 koji doprinosi inflamaciji (60). U ispoljavanju bolesti učestvuju i ćelije specifične za tkiva, kao što su mezangijalne i intersticijske ćelije i podociti u bubrezima, koji, kada se izlože interferonu gama, zadobijaju antigenprezentujuća svojstva i luče proinflamatorne citokine. UV zraci izazivaju apoptozu keratinocita u koži, što dovodi do oslobađanja nuklearnog materijala, koji se kod pacijenata sa SLE ne eliminiše adekvatno, te stimuliše imunski sistem. Genetski deficit serum amiloida P, c-Mer kinaze, imunoglobulina (Ig) M, komponente komplementa C1q i enzima dezoksiribonukleaze (DNaze), koji su odgovorni za uklanjanje apoptotskih ostataka, dovodi do pojave SLE i kod miševa i kod ljudi (61, 62). Koji će organ biti pogođen zavisi i od lokalne produkcije organ-specifičnih molekula kakav je npr. receptor 1 za faktor nekroze tumora (*engl.* tumor necrosis factor, TNF), koji dovodi do ekspresije kutane bolesti, a sa druge strane štiti bubrege od inflamacije (63).

Ateroskleroza i njene posledice su značajno češće prisutne kod pacijenata sa SLE nego u opštoj populaciji, i to iz više razloga - oksidacija i stvaranje antitela na lipoproteine, hipertenzija, metabolički sindrom, dejstvo imunskih kompleksa na endotelne ćelije (64, 65, 66).

1.2.2. KLINIČKA SLIKA I ACR KRITERIJUMI ZA DIJAGNOZU SLE

LE je izuzetno pleomorfno oboljenje, tako da ne postoji klasična klinička slika, već se dijagnoza bazira na kriterijumima datim od strane Američkog koledža za Reumatologiju (*engl.* American College of Rheumatology, ACR) 1982. i revidiranim 1997. godine (67, tabela 1). Kriterijumi obuhvataju manifestacije zahvaćenosti pojedinačnih organa i karakteristične laboratorijske nalaze. Smatra se da osoba ima SLE ukoliko je ispunjeno 4 ili više od 11

kriterijuma, istovremeno ili jedan za drugim, tokom bilo kog perioda opservacije.

Tabela 1. ACR kriterijumi za SLE (67)

Kriterijum	Definicija
1. Malarni eritem	Fiksiran malarni eritem, u ili iznad nivoa kože, sa poštedom nazolabijalnih brazda
2. Diskoidne lezije	Eritematozni plakovi sa adherentnom skvamom i keratotičnim čepovima, kod starijih lezija može nastati atrofija sa ožiljkom
3. Fotosenzitivnost	Promene na koži nastale kao neuobičajena reakcija na sunce, na osnovu anamneze ili pregleda
4. Oralne ulceracije	Oralne ili nazofaringealne ulceracije, obično bezbolne, dijagnostikovane kliničkim pregledom
5. Artritis	Neerozivni artritis bar 2 periferna zgloba sa bolom, otokom ili efuzijom
6. Serozitis	a. Pleuritis (uverljivi anamnestički podaci o pleuralnom bolu ili auskultacijski nalaz pleuralnog trenja ili prisustvo izliva u pleuri) ILI b. Perikarditis (dokumentovan putem EKG, trenja ili prisustvom izliva u perikardu)
7. Bubrežni poremećaj	a. Perzistentna proteinurija (>0.5 g/d ili >3+) ILI b. Čelijski cilindri bilo kog tipa (eritrociti, hemoglobin, granularni, tubularni, mešoviti)
8. Neurološki poremećaj	a. Konvulzije (u odsustvu drugog uzroka - leka, poznatog metaboličkog poremećaja, npr. uremije, ketoacidoze, ili poremećaja elektrolita) ILI b. Psihoza (u odsustvu drugog uzroka - leka, poznatog metaboličkog poremećaja, npr. uremije, ketoacidoze, ili poremećaja elektrolita)
9. Hematološki poremećaj	a. Hemolitička anemija sa retikulocitozom ILI b. Leukopenija (<4,000/mL u 2 ili više nalaza) ILI c. Limfopenija (<1,500/mL u 2 ili više nalaza) ILI d. Trombocitopenija (<100,000/mL u odsustvu leka kao mogućeg uzročnika)
10. Imunološki poremećaj	a. Anti-ds DNK antitela (<i>engl.</i> anti-double-stranded DNA, anti-dsDNA) u abnormalnom titru ILI b. Anti-Sm antitela ILI c. Pozitivan nalaz antifosfolipidnih antitela na osnovu (1) abnormalnog nivoa IgM ili IgG antikardiolipinskih antitela u serumu, (2) pozitivnog rezultata testa na lupus antikoagulans, standardnom metodom, ili (3) lažno pozitivnog serološkog testa na sifilis u trajanju od minimum 6 meseci i potvrđenim testom imobilizacije <i>Treponema pallidum</i> ili fluorescentnim apsorpcionim testom na treponemska antitela
11. Antinukleusna antitela	Abnormalan titar antinukleusnih antitela (ANA) detektovanih imunofluorescencijom ili ekvivalentnim esejom, u odsustvu leka za koji se zna da je povezan sa „sindromom lupusa indukovanim lekovima“
Ig, imunoglobulin	

Pored znakova i simptoma koji spadaju u kriterijume, u kliničku sliku SLE spadaju i brojni drugi znakovi i simptomi, kao i laboratorijski poremećaji. U

tabeli 2 su prikazani glavni poremećaji koji su registrovani u studijama prilikom postavljanja dijagnoze SLE (68). Iz tabele se vidi da su prvi pogođeni organi koža i zglobovi, a da su inicijalni simptomi najčešće groznica i febrilnost, slabost i malaksalost.

Tabela 2. Prevalencija određenih simptoma, znakova i laboratorijskih poremećaja SLE u nekoliko većih kohortnih studija (68)

Poremećaj	Učestalost (%)	Poremećaj	Učestalost (%)
Pozitivna ANA	97%	Malarni raš	35%
Slabost, malaksalost	90%	Centralni nervni sistem (CNS)	32%
Artralgije, mialgije	90%	Povećani gama globulini	32%
Fotosenzitivnost i promene na koži	70%	Hipertenzija	25%
Kognitivna disfunkcija	70%	Sjögrenov sindrom	25%
Niska C3 ili C4 komponenta komplementa	61%	Diskoidne lezije	20%
Febrilnost	57%	Vaskulitis CNS-a	15%
Artritis	50%	Adenopatija	15%
Antitela na dsDNA	50%	Efuzije pleure	12%
Leukopenija	46%	Ulceracije na sluzokožama (usta, nos)	20%
Pleuritis	44%	Gubitak u težini	27%
Anemija	42%	Raynaudov sindrom	25%
Alopecija	40%	Subakutni kutani LE	10%
Antikardiolipinska antitela	35%	Miozitis	10%
Nefritis, proteinurija	40%	Avaskularna nekroza	10%

1.2.2.1. Lezije kože kod pacijenata sa SLE

Promene na koži koje se javljaju u toku SLE se mogu podeliti na specifične (kutani lupus, promene koje imaju specifičan histološki nalaz) i nespecifične (69), koje se ne javljaju samo kod pacijenata sa lupusom i koje nemaju specifičnu histologiju. Ove lezije su češće kod pacijenata sa SLE od specifičnih i njihovo

prisustvo može ukazati na veću aktivnost bolesti (70). Ove promene se dele na one koje služe kao kriterijumi za klasifikaciju SLE (fotosenzitivnost, ulceracije na sluzokožama, alopecija, Raynaudov fenomen), nespecifične kutane vaskularne reakcije (vaskulitis, vaskulopatije, urtikarija, palmarni eritem, periungvalne telangiektazije, eritromelalgija, livedo) i ostale lezije (mucinoza i kalcinoza kože, promene na noktima, stečene bulozne dermatoze povezane sa SLE, kutane manifestacije autoimunskih sindroma preklapanja itd.) (69).

1.2.2.2. Laboratorijski nalazi od značaja za dijagnozu i praćenje toka - biomarkeri lupusa

Kod lupusa je detektovano više od 100 autoantitela (71), međutim, najveći broj autoantitela predstavljaju samo epifenomen, odnosno, za njih nije dokazano patogeno dejstvo u lupusu. Antinukleusna antitela (ANA) se više od 50 godina smatraju pokazateljem prisustva sistemske bolesti vezivnog tkiva. Inicijalno su se za detekciju ANA koristili supstrati tkiva glodara (jetra pacova, bubreg miša), a potom su se pojavile supstrati humanih ćelija, od kojih se najviše koriste epitelne ćelije karcinoma larinksa (HEp-2 ćelije) (72). ANA su negativna kod veoma malog broja pacijenata sa SLE, oko 2% na HEp-2 ćelijama, odnosno oko 5% na tkivu glodara. Međutim, kod svih tih pacijenata se ELISA testom detektuju antitela na Ro/La antigen (73).

Antitela na DNK (anti-DNK) su antitela za koja se klasično navode da su karakteristična za SLE. Visoko aviditetna antitela klase IgG na dvostruko uvijenu DNK (dsDNA) imaju glavnu ulogu u indukovanju nekih manifestacija SLE (posebno nefritisa) i relativno su specifična za SLE, a kod pojedinih pacijenata predstavljaju i dobre markere aktivnosti bolesti (74).

Antitela na histone i antigene povezane sa nukleozomoma - ova antitela mogu formirati imunske komplekse koji se deponuju u glomerulu bubrega i dovode do njegovog oštećenja (75). Anti-histonska antitela se nalaze kod najvećeg broja pacijenata sa lupusom izazvanim lekovima, ali kod ove vrste

lupusa njihova patogenost zavisi od klase imunoglobulina i dela histonskog kompleksa protiv koga su usmerena (76).

Anti-Ro i anti-La su važna autoantitela u SLE i javljaju se kod oko 50% i 20% ovih pacijenata, respektivno. Usko su povezana sa određenim kliničkim nalazima (fotosenzitivnost, neonatalni lupus). Antitela na komponente splajsozoma se često viđaju kod SLE i ostalih sistemskih bolesti vezivnog tkiva, naročito anti-Sm i anti-nRNP (77).

U ostale važne serološke abnormalnosti spadaju: lupus antikoagulans i antifosfolipidna antitela, antieritrocitna antitela, trombocitna antitela, antineutrofilna citoplazmatska antitela (ANCA), reumatoidni faktor, krioglobulini.

Brojni su poremećaji ostalih laboratorijskih analiza kod lupusa, kao što su hipoalbuminemija, poremećaji serumskih imunoglobulina, paraproteinemija, povišena sedimentacija eritrocita (SE), citopenije, poremećaji sistema komplementa.

1.2.3. INDEKSI AKTIVNOSTI BOLESTI I OŠTEĆENJA TKIVA KOD SLE

Postoji preko 60 indeksa i indeksnih sistema koji procenjuju aktivnost lupusa. Među njima nema zlatnog standarda, a najčešće su korišćeni British Isles Lupus Assessment Group index (BILAG) (78), Systemic Lupus Activity Measure (SLAM) (79), Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI) (80), European Consensus Lupus Activity Measure (ECLAM) (81). Iako je svaki ponaosob specifičan, svi su oni validni i pouzdani i koreliraju međusobno (82). U poslednje vreme u kliničkim i istraživačkim studijama najviše korišćen indeks je SLEDAI sa svojim modifikacijama, SELENA-SLEDAI (83) i SLEDAI-2K (84). SLEDAI je razvijen 1992. godine na Univerzitetu u Torontu (80), dok su modifikacije napravljene 1998. i 2002. godine i u njima su bodovane nove promene na koži, alopecija, proteinurija i promene na sluzokožama.

Oštećenje tkiva predstavlja važnu meru SLE. Za razliku od indeksa aktivnosti koji se odnose samo na aktivan lupus, oštećenje tkiva može biti

rezultat kako same bolesti, tako i neželjenih efekata lekova ili prisustva komorbiditeta. Kao mera oštećenja tkiva koristi se Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology (SLICC/ACR) Damage Index, koji je razvijen 1996. godine (85).

U studijama je pokazano da oštećenje tkiva u ranoj fazi lupusa, mereno SLICC/ACR indeksom, ima prognostički značaj. Pacijenti čiji je skor inicijalno ≥ 1 imaju veću stopu mortaliteta i primaju veće doze kortikosteroida u toku prve godine bolesti, koji mogu da doprinesu daljem morbiditetu i mortalitetu (86).

U studijama je takođe pokazano da ne postoji korelacija skora aktivnosti bolesti i akumuliranog skora oštećenja, merenih u jednom momentu, pa se smatra da se oba skora moraju meriti kod svakog pacijenta, da bi se analizirala i aktivnost oboljenja i kumulativno oštećenje tkiva (87).

1.3. KUTANI LUPUS ERYTHEMATOSUS (CLE)

1.3.1. PATOGENEZA KUTANOG LUPUSA I ODNOS SA SLE

Još je Kapoši verovao da su diskoidni LE (DLE) i SLE manifestacije iste bolesti (10), međutim, to mišljenje se menjalo kroz istoriju. MacLeod (88) je smatrao da se uz akutni diseminovani lupus ponekada javlja i „opšta toksemija“, a da lokalizovani slučajevi imaju drugačiju etiologiju. Keil je 1937. godine ukazivao na činjenicu da kutane i sistemske manifestacije lupusa ne koreliraju i da verovatno predstavljaju različite varijante iste bolesti (89). Međutim, Baehr i saradnici (90) su 1951. godine tvrdili da diseminovani lupus nema nikakve veze sa diskoidnim lupusom. Prema Dubois-ovoj seriji od 520 pacijenata sa SLE iz 1963. godine, 10,8% njih su inicijalno imali diskoidne lezije, tri puta više nego što ih je imalo eritem u vidu leptira (91). Prema novijoj multicentričnoj studiji, taj procenat pacijenata sa diskoidnim lezijama u toku trajanja SLE iznosi 13% (92). Sa druge strane, u studiji u kojoj je praćeno 120 pacijenata sa DLE tokom 5 godina, nijedan nije razvio SLE (93). Ova 2 mišljenja

i nalaza je „pomirila“ teorija Burcha i Rowella (94) iz 1968. godine po kojoj postoji poligenetska predispozicija za razvoj DLE i SLE, a osobe sa DLE kod kojih dođe do razvoja SLE su genetski predisponirane za oba oboljenja, ova tvrdnja, međutim, nije dokazana. U studijama u prethodnih 50 godina, pokazano je da prisustvo generalizovanih DLE lezija, artralgijske ili artritisa, promene na noktima, anemija, leukopenija, visoka sedimentacija eritrocita i prisutna ANA u visokom titru predstavljaju faktore rizika za progresiju DLE u SLE (95).

Etiopatogeneza kutanog lupusa nije razjašnjena, kao ni njegova genetska arhitektura. Do sada je nađena imunogenetska povezanost sa anti-Ro/SSA i/ili anti-La/SSA antitelima, a takođe nađena je uloga gena za humani leukocitni antigen (HLA), TNF, komplement, IL-10, T ćelijski receptor (TCR); za CLE još uvek postoje brojni kandidatni geni (96). Danas se smatra da je CLE autoimunska bolest dominantno posredovana T limfocitima. Profil citokina u lezijama kože obolelih sa CLE je sličan kao kod SLE - povećana ekspresija IL-5, IL-10 i IFN- γ , a smanjena IL-2 i IL-4 (97). Dva su osnovna patološka procesa kod CLE koji se dešavaju u predelu dermo-epidermalne granice: jedan je deponovanje imunskih kompleksa sa aktivacijom sistema komplementa i obrazovanjem kompleksa koji oštećuje ćelijsku membranu (*engl.* membrane attack complex, MAC) bazalnih keratinocita (98, 99), a drugi proces je citotoksičnost zavisna od antitela (*engl.* antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC) u kome citotoksični T limfociti putem svojih Fc receptora za imunoglobuline prepoznaju autoantitela vezana za ćelije epiderma i dovode do njihovog uništenja (98).

UV zračenje je najvažniji pojedinačni faktor u razvoju kutanih lezija kod lupusa. Uloga UV zraka je najbolje objašnjena na modelu apoptotične ćelije. UV zraci indukuju apoptozu - u lezijama kože kod subakutnog kutanog LE (SCLE) i DLE postoji povećan broj apoptotičnih ćelija (100, 101). I UVA (320–400nm) i UVB (290–320nm) indukuju apoptozu u epidermu, što se vidi kroz prisustvo „sunburned cells“ (SBC), koje morfološki imaju piknotično jedro i smanjenu i eozinofilnu citoplazmu, a mogu se detektovati i esejima fragmentacije DNK

(102). Mehanizmi i vremenski obrazac apoptoze izazvane UVA i UVB se razlikuju, premda je ishod isti (103, 104). Nadalje, UV zraci izazivaju ekspoziciju autoantigena imunskom sistemu - u eksperimentima je pokazano da se tokom apoptoze keratinocita izazvane UV zracima, intracelularni antigeni kao što su 52-kDa Ro/SSA, ribozomi, kalretikulin i fosfolipidni kompleksi translociraju u 2 određena apoptotična mehurića na površini ćelije (105). UV zraci su i važan imunomodulator - UVA i UVB indukuju određene inflamatorne medijatore i na taj način imaju različit uticaj na imunski i inflamatorni odgovor. Prvo, i UVA i UVB zraci povećavaju nivoe IL-10 i IL-12, s tim da UVB produkuje više IL-10, a UVA1 više IL-12 (106, 107). Drugo, UV indukuje IL-1 α i TNF- α , što dovodi do povećane ekspresije adhezionih molekula na keratinocitima i endotelnim ćelijama, što opet dovodi do lokalne regrutacije inflamatornih ćelija (108, 109). Treće, UVB zraci modifikuju proizvodnju hemokina CXCR1 i CXCR2 (110), dok UVA inhibira proizvodnju hemokina CCL17 u keratinocitima (111). Na kraju, UVB zraci indukuju oslobađanje proapoptotskih citokina IL-1 i TNF- α iz keratinocita (112), dok i UVA i UVB indukuju IL-12, koji sa svoje strane suprimira TNF- α na nivou promotora (106).

1.3.2. KLASIFIKACIJA I KLINIČKA SLIKA KUTANOG LUPUSA

Klinička slika kutanog lupusa je veoma raznolika i teško je razviti jedinstveni koncept kutanih manifestacija LE (113). Gilijam je prvi, 1977. godine, predložio nomenklaturu kutanih manifestacija LE (114), koja je ubrzo pretrpela nekoliko izmena (69, 115). Ovaj klasifikacioni sistem je podelio sve promene na koži koje su povezane sa lupusom na one koje su histološki specifične za LE (LE specifične kožne promene) i one koje nemaju specifičnu histologiju (LE nespecifične kožne promene). LE specifične kožne promene su dalje podeljene u 3 šire potkategorije: akutni kutani LE (ACLE), subakutni kutani LE (SCLE) i hronični kutani LE (CCLE) sa svojim varijantama, kao što je diskoidni LE (DLE). Kuhn i saradnici su 2003. u ovu klasifikaciju uključili tumidni LE kao posebnu kategoriju i nazvali ga intermitetni kutani LE (ICLE) (116). Nadalje,

bulozne kutane lezije koje su povezane sa različitim formama LE su uključene u ovu novu, Diseldorfsku klasifikaciju CLE (113, Tabela 3). One su podeljene na bulozne lezije koje imaju i one koje nemaju histopatološki nalaz specifičan za LE (117, 118).

Tabela 3. Diseldorfska klasifikacija CLE iz 2003. godine (113)

Akutni kutani lupus erythematosus (ACLE)
Subakutni kutani lupus erythematosus (SCLE)
Hronični kutani lupus erythematosus (CCLE)
Diskoidni lupus erythematosus (DLE)
Hipertrofična/verukouzna varijanta
Telangiektoidna varijanta
Lupus erythematosus profundus (LEP)
Chilblain lupus erythematosus (CHLE)
Intermitentni kutani lupus erythematosus (ICLE)
Lupus erythematosus tumidus (LET)
Bulozne lezije kod lupus erythematosus-a (BLE)
LE-specifične bulozne lezije kože
LE-nespecifične bulozne lezije kože
Primarna bulozna oboljenja kože povezana sa LE

Akutni kutani lupus erythematosus - tipična klinička manifestacija je lokalizovani eritem - malarni raš ili eritem u vidu leptira centralnih partija lica, ili diseminovani/generalizovani eritem (119), koji se još naziva i „fotosenzitivni raš“, viđa se ređe i može biti lokalizovan bilo gde na koži, naravno sa predilekcijom za fotoekspozirane regije. Najčešće ima oblik makulopapuloznog pruriginoznog egzantema, javlja se kod oko 20-60% pacijenata sa lupusom i češći je kod žena (120).

Subakutni kutani lupus erythematosus - javlja se pretežno kod žena bele rase, povezan je sa HLA-DR2 or -DR3, pacijenti imaju preklapajuće manifestacije sa Sjögrenovim sindromom ili visok titar anti-Ro/SSA antitela (121). Lezije kože su inicijalno eritematozne makule i papule koje evoluiraju u papuloskvamozne-psorijaziformne ili anularno-policiklične lezije, sa približno podjednakom učestalošću (121); kod manjeg broja pacijenata se razvijaju obe vrste lezija (122).

Hronični kutani lupus erythematosus - ovoj grupi CLE pripada više entiteta kao što je DLE sa svojim varijantama (hipertrofični/verukozni i telangiektoidni) i ređim tipovima LEP i CHLE.

Diskoidni LE je najčešća forma hroničnog CLE, može biti lokalizovan i diseminovan, sa ili bez sistemskih manifestacija LE. Tipične DLE lezije se javljaju na početku SLE kod 5-10% pacijenata, a ukupno oko 30% pacijenata sa SLE razviju DLE lezije u toku bolesti, obično diseminovanog tipa (113).

Hipertrofična/verukozna varijanta DLE je opisana od strane Becheta 1940. godine (123); retka je (oko 2% pacijenata sa DLE) i obično udružena sa prisustvom klasičnih DLE lezija na drugim mestima (124).

Telangiektoidna varijanta DLE - eritematozni plakovi sa retikularnim telangiektazijama na fotoeksponiranim regijama lica, vrata, ekstremiteta, na dojčkama, kolenima, stopalima čine ovi retku formu DLE (125).

Chilblain lupus erythematosus (CHLE) - takođe retka manifestacija CLE, opisana od strane Hačinsona 1888. godine (126), u kojoj je vezi sa faktorima sredine (113), češće se javlja kod žena. Pacijenti često imaju poliklonsku hipergamaglobulinemiju, povišen nivo imunoglobulina u serumu i pozitivan reumatoidni faktor, često se detektuju i anti-dsDNA antitela i anti-Ro/SSA antitela (127).

Lupus erythematosus profundus (LEP), naziva se još i "Kaposi-Irgangova bolest" i "lupus panniculitis". Predstavlja retku varijantu CLE, ima je oko 2-10% pacijenata sa SLE (113).

Lupus erythematosus tumidus - termin je prvi dao Hoffmann (128) da opiše eritematozne eksudativne i infiltrovane necikatricijalne lezije na licu sa minimalnim promenama na površini. Češće se viđa kod muškaraca.

Bulozne lezije kod LE - Učestalost buloznih lezija kod LE je niska, takođe, javlja se kod manje od 5% pacijenata sa SLE i promenama na koži (118).

Dijagnoza kutanog lupusa se postavlja na osnovu karakteristične kliničke slike i/ili histopatološkog (HP) nalaza. HP nalaz je sličan kod različitih formi

kutanog lupusa i karakteriše se hiperkeratozom ortokeratotskog tipa sa stvaranjem folikularnih čepova, atrofijom Malpigijevog sloja, hidropsnom degeneracijom bazalnih keratinocita, zadebljanom i tortuoznom bazalnom membranom, kao i prisustvom mononuklearnog, predominantno limfocitnog infiltrata u dermu, duž dermoepidermalne granice, oko krvnih sudova i adneksa (129, 130). Infiltrat je najizraženiji u srednjim i nižim slojevima derma i često se proteže do supkutanog masnog tkiva; čine ga mahom aktivisani T limfociti. Ovakav nalaz diskoidni LE svrstava u grupu *interface dermatitisa* (129, 130). U biopstatima kože se, metodom direktne imunofluorescencije (DIF), kod pacijenata sa kutanim lupusom mogu detektovati depoziti imunoglobulina (Ig) G, A, M, komponenti komplementa i fibrinogena - tzv. *lupus band test*, (LBT) (131). Depoziti imunoreaktanata se nalaze u zoni bazalne membrane (ZBM) i mogu biti kontinuirani i diskontinuirani. DIF test sa kože lezije je pozitivan kod 50-90% pacijenata sa DLE (132), kod 70-100% pacijenata sa SCLE (133) i kod preko 90% pacijenata sa ACLE (134), uz napomenu da nalaz može biti i lažno pozitivan ukoliko se biopsija uzima sa fotoekspozirane kože ili pacijent ima neko drugo fotosenzitivno oboljenje kože (135, 136). *Lupus band test* sa klinički neizmijenjene, fotoprotektovane kože je kod hroničnog i subakutnog kutanog lupusa po pravilu negativan, dok se kod SLE depoziti imunoreaktanata mogu naći kod 31-90% pacijenata, češće kod onih kod kojih postoji zahvatanje bubrega (137, 138).

Od laboratorijskih nalaza, kod pacijenata sa CLE se mogu se naći: povećana SE (kod 20%-56% pacijenata), anemiju ima 2-27% pacijenata, leukopeniju do 30% pacijenata, a trombocitopenija se javlja kod 2%-4% pacijenata sa CLE (139). Osim ANA koja se viđaju kod 4-63% pacijenata sa CLE, i anti-Ro/SSA antitela koja su karakteristična za SCLE, ostale imunoserološke analize su kod CLE retko pozitivne (139).

1.3.3. INDEKSI AKTIVNOSTI KUTANOG LUPUSA

Prvi indeks aktivnosti kutanog lupusa - CLASI (*engl.* Cutaneous Lupus Erythematosus Disease Area and Severity Index) je predstavljen 2005. godine (140). CLASI se sastoji iz 2 skora, prvi sumira aktivnost bolesti (CLASI A, skoriraju se eritem i skvama u svim zahvaćenim regionima pojedinačno, u skor ulazi i prisustvo lezija na sluzokožama i alopecija), a drugi oštećenje tkiva (CLASI R, skoriraju se dispigmentacija i atrofija, odnosno stvaranje ožiljka). Povezani simptomi (svrab, bol, slabost) registruju pacijenti na odvojenoj vizualno-analognoj skali od 1 do 10. Kasnije studije su pokazale da je CLASI pouzdan i pogodan za korišćenje od strane dermatologa, ali i reumatologa (141), da je skor veći kod pacijenata sa diskoidnim ili kombinovanim lezijama, naročito ukoliko su diseminovane, i pacijenata sa povećanim anti dsDNA, anti-Ro/SSA i anti-La/SSB antitelima (142, 143). Clein i saradnici (144) su zaključili da CLASI može da posluži za razvrstavanje pacijenata u grupe prema aktivnosti bolesti, pri čemu bi skor aktivnosti od 0 do 9 označavao blagu bolest, skor od 10 do 20 umereno izraženu, a skor od 21 do 70 tešku bolest. Takođe su utvrdili da ukoliko se uzme promena CLASI za 4 odnosno 20%, to može biti pouzdan indikator značajne promene aktivnosti bolesti. U cilju povećanja pouzdanosti indeksa kod pojedinih oblika kutanog lupusa, Kuhn i saradnici su 2010. godine iz CLASI indeksa izveli RCLASI (*engl.* Revised Cutaneous Lupus Erythematosus Disease Area and Severity Index) tako što su uz povećanje preciznosti postojećih, dodali i nove parametre za skoriranje, kao što su edem/infiltracija i supkutani nodusi (145). I ovaj skor se, kao i CLASI, sastoji iz skora aktivnosti (RCLASI A) i skora oštećenja tkiva (RCLASI D). Studije pouzdanosti su pokazale da je RCLASI validan i primenljiv u proceni aktivnosti CLE, i to svih njegovih podtipova (145).

1.4. APOPTOZA

1.4.1. DEFINICIJA I ZNAČAJ APOPTOZE U HOMEOSTAZI I PATOGENEZI OBOLJENJA

Izraz „apoptoza“ je izveden iz grčkih reči „*απο*“ i „*πτωσις*“ i znači “opadanje”, a odnosi se na opadanje lišća u jesen. Izraz se koristi, suprotno nekrozi, da opiše situaciju u kojoj ćelije aktivno stremi smrti nakon što je primila određene stimuluse (146, 147). Apoptoza je izuzetno selektivan proces važan i u fiziološkim i patološkim uslovima (148) - tabela 4. Bez apoptoze, ljudi bi do 80-te godine života akumulirali oko 2 tone koštane srži i oko 16km creva (149). Poremećaji apoptotske mašinerije su registrovani kod karcinoma, autoimunskih oboljenja, neuroloških i kardivaskularnih bolesti, hepatitisa, sepse (150).

Tabela 4. Uloga apoptoze u fiziološkim i patološkim uslovima (146,148)

Fiziološki uslovi

Formiranje tkiva u embrionalnom razvoju programiranom destrukcijom ćelija
Fiziološka involucija kao npr. odvajanje endometrijuma, regresija laktacijske dojke

Normalna destrukcija ćelija praćena zamenom putem proliferacije, kao što je epitel želuca

Involucija timusa u ranom uzrastu

Patološki uslovi

Ćelijska smrt u tumorima indukovana lekovima protiv karcinoma

Ćelijska smrt indukovana citotoksičnim T limfocitima kao što je imunska odbacivanje i bolest kalem protiv domaćina (*engl.* graft versus host disease, GVHD)

Progresivna ćelijska smrt i deplecija CD4+ ćelija u okviru AIDS-a

Neki oblici ćelijske smrti indukovane virusom, ako što su hepatitis B i C

Patološka atrofija organa i tkiva kao rezultat uklanjanja stimulusa, kao što je npr. atrofija prostate nakon orhidektomije

Ćelijska smrt nakon dejstva agensa kao što je radijacija, hipoksija ili blaža termička povreda

Ćelijska smrt u degenerativnim bolestima kao što su Alchajmerova i Parkinsonova bolest

Ćelijska smrt kod oboljenja srca kao što je infarkt miokarda

Autoimunost

1.4.2. MEHANIZMI APOPTOZE

Glavne morfološke osobine apoptoze su kondenzacija hromatina i fragmentacija jedra, koje su prećene zaokruživanjem ćelije, smanjenjem njene zapremine i retrakcijom pseudopoda (151). Kondenzacija hromatina započinje na periferiji jedarne membrane i dovodi do preloma hromatina unutar ćelije sa intaktnom membranom, što se naziva karioreksa (152). Plazma membrana ostaje intaktna tokom čitavog procesa. U kasnijim stadijumuma apoptoze dolazi do pupljenje membrane, ultrastrukturnih promena citoplazmatskih organela i gubitka integriteta membrane (151). Fagociti obično obuhvate apoptotsku ćeliju pre nego što se pojave apoptotska telašca. Ukoliko ne dođe do fagocitoze ostataka apoptotskih ćelija, kao što je to slučaj kod veštačkih ćelijskih kultura, one će proći kroz degradaciju koja liči na nekrozu i to stanje se naziva sekundarna nekroza (153).

Uopšteno govoreći, postoje 3 tipa biohemijskih promena koja se mogu sresti kod apoptoze: 1) aktivacija kaspaza, 2) prelom DNK i proteina i 3) promene na membrani i prepoznavanje od strane fagocita (154). U ranim fazama apoptoze u spoljašnjim slojevima ćelijske membrane dolazi do ekspresije fosfatidil serina (PS), koji je tu dospeo iz unutrašnjih slojeva. On omogućava makrofagima da rano prepoznaju mrtve ćelije, što dovodi do fagocitoze bez oslobađanja proinflamatornih ćelijskih komponenti (155). Ovaj proces je praćen karakterističnim prelomom DNK u veće delove, veličine 50 do 300 kilobaza (156). Kasnije, endonukleaze dovode do internukleozomalnog rascepa DNK na oligonukleozome od 180 do 200 parova baza. Premda je ovo osobina apoptoze, on nije tako specifičan, jer se tipičan DNK „stepenik“ u elektroforezi na agaroznom gelu može videti i kod nekrotičnih ćelija (157).

Druga specifična osobina apoptoze predstavlja aktivacija grupe enzima koji pripadaju porodici cistein proteinaza, koji se zovu kaspaze ili kaspaze. Slovo „c“ u reči kaspaza se odnosi na cistein proteazu, dok se „aspaza“ odnosi na jedinstvenu osobinu enzima da cepa supstrat nakon aspartatne rezidue (154). Aktivisane kaspaze cepaju brojne vitalne proteine ćelije i degradiraju skelet

jedra i citoskelet. Takođe, one aktiviraju DNazu, koja dalje degradira DNK iz jedra (158). Premda biohemijske promene mogu delimično da objasne morfološke procese koji se dešavaju u toku apoptoze, važno je da biohemijska analiza fragmentacije DNK ili aktivacije kaspaza ne bi trebalo da služi za definiciju apoptoze, jer se ona može desiti i bez oligonukleozomalne fragmentacije DNK i može biti nezavisna od kaspaza (159). Biohemijske metode za procenu ćelijske smrti imaju mnoge prednosti u odnosu na morfološke, a posebno zato što su kvantitativne i samim tim manje podložne pogrešnim interpretacijama od strane onoga ko ih izvodi. Međutim, ove metode imaju značajne nedostatke, posebno kada se ispituju pojedinačni parametri (160). Iako su brojni biohemijski eseji i eksperimenti korišćeni u svrhu detekcije apoptoze, Komitet za nomenklaturu ćelijske smrti (*engl.* Nomenclature Committee on Cell Death, NCCD) je predložio da se klasifikacija oblika ćelijske smrti bazira samo na morfološkim kriterijumima, jer ne postoji jasna ekvivalencija između ultrastrukturnih promena i biohemijskih osobina ćelijske smrti (159).

Kaspaze igraju centralnu ulogu u mehanizmu apoptoze jer su i inicijatori i izvršioci. Dele se u 2 grupe: 1) kaspaze u vezi sa kaspazom 1 (npr. kaspaze -1, -4, -5, -13 i -14) su uglavnom uključene u procesiranje citokina tokom inflamatornog procesa i 2) kaspaze koje igraju glavnu ulogu u apoptozi (npr. kaspaze -2, -3, -6, -7, -8, -9 i -10); ove kaspaze se dalje mogu podeliti u inicijatorske kaspaze (npr kaspaze -2, -8, -9 i -10) koje su primarno odgovorne za započinjanje apoptoze, i efektorske kaspaze (kaspaza -3, -6 i -7), čija je glavna uloga cepanje komponenti ćelije tokom apoptoze (161).

Kaspaze mogu biti aktivirane na 3 načina. Dva se uobičajeno opisuju kao unutrašnji (ili mitohondrijalni) i spoljašnji put apoptoze (ili put receptora smrti). Oba puta na kraju vode do zajedničkog puta egzekucione (izvršne) faze apoptoze. Treći put inicijacije apoptoze je manje poznat i to je unutrašnji put endoplazmatskog retikuluma (162). Termin „spoljašnja apoptoza“ se uglavnom koristi za slučajeve kada je apoptotska smrt ćelije indukovana vanćelijskim stres signalima, koji su primljeni i prosleđeni putem specifičnih transmembranskih

receptora (163-165). Može je indukovati vezivanje letalnih liganda kao što su FAS/CD95 ligand (FASL/CD95L), TNF α i TNF (ligand) superfamilija, član 10 (TNFSF10, poznat kao ligand povezan sa TNF koji indukuje apoptozu, *engl.* TNF-related apoptosis inducing ligand, TRAIL), različiti receptori smrti (npr. FAS/CD95, TNF α receptor 1 (TNFR1) i TRAIL receptor (TRAILR)1-2) (163). Spoljašnji proapoptotski signal može biti poslat i od strane tzv. zavisnih receptora (*engl.* dependence receptors) kao što su netrinski receptori (npr. UNC5A-D i deleted in colorectal carcinoma, DCC), koji ispoljavaju letalne funkcije samo kada koncentracija njihovih liganda padne ispod kritičnog praga (165). Sa druge strane, apoptotska smrt ćelije može biti okinuta različitim stresnim stanjima unutar ćelije, kao što su oštećenje DNK, oksidativni stres, preveliki ulazak kalcijuma u citosol, blaga ekscitotoksičnost uzrokovana preteranom stimulacijom glutamatnog receptora u nervnom sistemu, akumulacija nesavijenih proteina u endoplazmatskom retikulumu, i brojni drugi. Svi oni dovode do „unutrašnje apoptoze“ koja može biti zavisna od kaspaza (klasičan put programirane ćelijske smrti, u ovom putu obično učestvuje kaskada kaspaza -8, -9, -12, -7 i -3) i nezavisna od njih (nedovoljno razjašnjen mehanizam, ne može se inhibirati inhibitorima kaspaza) (166).

Prema stavu Komiteta za nomenklaturu ćelijske smrti, osim spoljašnjeg i unutrašnjeg puta apoptoze (zavisnog i nezavisnog od kaspaza), u regulisane ćelijske smrti spadaju i anoikiza i piroptoza, u kojima kaspaze takođe imaju važnu ulogu, kao i autofagija, kornifikacija, entoza, mitotska katastrofa, nekroptoza, netoza i partanatoza, koje su nezavisne od kaspaza (166).

1.4.3. POREMEĆAJI APOPTOZE I AUTOIMUNOST

Egzekuciona faza apoptoze sa posledičnim uklanjanjem ćelije predstavlja jak antiinflamatorni signal i omogućava apoptotičnim ćelijama da budu imunološki tihe, a takođe, hvatanje apoptotičnih ćelija indukuje tolerogeni odgovor i omogućava pravilno prepoznavanje sopstvenih proteina, čime se izbegava aktivacija stečenog imunskog sistema prema apoptotskom materijalu (167). Sve

ovo zajedno omogućava brz i efikasan proces apoptoze, sa minimalnom kolateralnom štetom i održavanjem homeostaze tkiva. Jedna od glavnih osobina apoptotičnih ćelija koja omogućava ovakvo uklanjanje ćelijskih fragmenata je stabilna ćelijska membrana (168). Suprotna od apoptoze je nekroza, kod koje dolazi do neadekvatne lize ćelija i oslobađanja sadržaja koji dovodi do inflamatornog odgovora (169). Ćelije koje prolaze kroz sekundarnu nekrozu oslobađaju „alarmine“ koji se prepoznaju kao signali opasnosti i koji indukuju ćelije urođenog imunskog odgovora da pređu u proinflamatorno stanje. Prototip alarma je HMGB1 (*engl.* high-mobility group protein B1) (170). Da bi se izbegla dezintegracija ćelija (sekundarna nekroza), apoptotične ćelije moraju biti vrlo efikasno i brzo odstranjene od strane profesionalnih (makrofaga, dendritičnih ćelija) ili, u nekim slučajevima, neprofesionalnih fagocita (endotelne i glatkomišićne ćelije krvnih sudova i fibroblasti) (171).

Uklanjanje apoptotičnih ćelija se sastoji iz 3 glavna koraka:

1. privlačenje fagocita putem solubilnih „nađi me (*engl.* find me)“ signala. Premda priroda ovih signala nije u potpunosti razjašnjena, poslednje studije su pokazale da apoptotska telašca luče fosfolipid lizofosfatidilholin (LPC) koji privlači fagocite prema apoptotičnim ćelijama u procesu zavisnom od kaspaze 3 (172). Ostali signali koji regrutuju makrofage su S10 (ribozomalni protein dimer), razdvojena humana tirozil-tRNK sintetaza i trombospondin-1 (TSP-1) (171).

2. prepoznavanje i fagocitoza putem prikazivanja „pojedi me (*engl.* eat me)“ molekula koji omogućavaju prepoznavanje apoptotskih ćelija od strane fagocita, i u odsustvu „nemoj me pojesti (*engl.* don't eat me)“ signala. Najviše studiran „pojedi me“ signal je gubitak simetrije fosfolipida i translokacija fosfatidil serina (PS) u spoljašnji list plazma membrane tokom apoptoze (173).

3. izmenjena proizvodnja pro- i anti-inflamatornih citokina (171). Uklanjanje apoptotičnih ćelija dovodi do smanjenja oslobađanja proinflamatornih medijatora i pojačane sekrecije anti-inflamatornih citokina TGF β i IL-10 (174), dok preuzimanje nekrotičnih ćelija (uključujući i sekundarne nekrotične ćelije

nastale od neobuhvaćenih apoptotičnih ćelija) stimuliše oslobađanje proinflamatornih medijatora $\text{TNF}\alpha$, IL-1b i azot monoksida (175).

U prethodnim radovima je pokazano da je komplement veoma važan za uklanjanje apoptotičnih ćelija *in vitro* i *in vivo*, kao i da deficit komponenti komplementa, posebno ranih faza, kao što su C1q i C4, često dovodi do razvoja SLE kod čoveka (176). Takođe, za uklanjanje hromatina iz seruma, koji potiče iz nekrotičnih ćelija, najvažnija je saradnja DNaze I i C1q (177). C1q povećava aktivnost DNaze I na 2 moguća načina: C1q olakšava DNazi I da pristupi DNK iz nukleoproteinskog kompleksa i ometa inhibiciju DNaze I aktinom iz citoskeleta (177, 178).

U okviru samog imunskog sistema se svakodnevno ukloni više od 10^{12} apoptotičnih ćelija iz organizma (179). Njihova smrt je integralni deo razvoja, kao i normalne homeostaze tkiva, tako da je neophodno da imunsko uklanjanje ovih ćelija prođe bez indukcije procesa zapaljenja. Apoptotične ćelije se stvaraju većinom u centralnim limfoidnim organima kao što su timus i kostna srž putem rearanžmana antigenskih receptora, negativne selekcije i prostog zanemarivanja. Značajna količina apoptotičnih ćelija se produkuje u perifernom imunskom sistemu zbog relativno kratkog života limfocita i mijeloidnih ćelija, kao i sekundarne selekcije B ćelija visokog afiniteta u germinativnim centrima. Ova specijalizovana mesta (timus, kostna srž, limfni folikuli) imaju izrazito efikasne fagocite koji brzo uklanjaju umiruće ćelije. Brojni proteini koji su uključeni u proces apoptoze, ali i zapaljenja (receptori, adaptori, efektori i inhibitori) sadrže module, odnosno domene koji su strukturno slični i evolutivno konzervirani (171, 179).

Danas je široko prihvaćen stav da poremećaj uklanjanja apoptotičnih ćelija i posledična sekundarna nekroza mogu dovesti do razvoja oboljenja koja imaju autoimunsku komponentu kao što su SLE i dijabetes tip II (171). Poremećaj uklanjanja apoptotičnih ćelija, zajedno sa gubitkom produkcije citokina (npr. IL-10), koji održavaju anti-inflamatorno okruženje, može dovesti do pogoršanja inflamacije i oštećenja tkiva (175). Nasuprot tome, povećanje fagocitnog

kapaciteta uklanjanja interleukinom 10 može dovesti do stvaranja sredine u kojoj dolazi do obnavljanja tkiva i rezolucije inflamacije (180). Efikasno uklanjanje apoptotičnih ćelija sprečava nekrozu ćelije i stimuliše proizvodnju antiinflamatornih medijatora od strane fagocita. U jednoj takvoj sredini dolazi do inhibicije antigen prezentujućih ćelija i imunskog odgovora. Sa druge strane, kada je poremećeno njihovo uklanjanje, akumulirane apoptotične ćelije prolaze kroz proces sekundarne nekroze, što dovodi do stvaranja autoantigena i proinflamatornih medijatora u čijem prisustvu dolazi do indukcije sazrevanja dendritičnih ćelija. Zrele dendritične ćelije nakon sticanja mogućnosti pristupa autoantigenu, prezentuju ove antigene T helper ćelijama, što je praćeno proizvodnjom autoantitela od strane B limfocita i, na kraju, razvojem autoimunosti (175).

1.4.4. POREMEĆAJI APOPTOZE KOD LUPUSA

Brojni dokazi govore u prilog tezi da je autoimunost kod SLE povezana sa poremećenim ili odloženim uklanjanjem apoptotskih ćelija (181). Iako većina podataka o poremećaju uklanjanja apoptotičnih ostataka kod SLE dolazi iz studija na mišjim modelima, postoje i brojne studije na pacijentima sa SLE koje su pokazale povećanu koncentraciju apoptotskih telašaca (182), povećan broj cirkulišućih endotelnih ćelija kao rezultat poremećenog uklanjanja i pojačane apoptoze (183), pojačanu apoptozu limfocita izolovanih i kultivisanih od pacijenata sa SLE, pojačanu apoptozu neutrofila kod juvenilnog SLE (184), povećan broj ekstracelularnih nukleozoma (185), apoptozu keratinocita indukovanu UV zračenjem, zavisnu od doze (186), smanjen broj CD43+ ćelija u koštanoj srži pacijenata sa SLE kao rezultat apoptoze posredovane Fas-om (187), kao i morfološke abnormalnosti makrofaga kultivisanih iz seruma pacijenata sa SLE praćene poremećenom fagocitozom apoptotskih ćelija (182, 188). Serumi pacijenata sa SLE imaju veći kapacitet da indukuju apoptozu u odnosu na ostale autoimunske i infektivne bolesti, kao i zdrave osobe (181, 189); ova apoptoza je zavisna od kaspaza i nezavisna od receptora smrti (189).

Perzistirajuće apoptotske ćelije mogu progredirati do sekundarne nekroze koja je povezana sa signalima opasnosti, dostupnošću modifikovanim autoantigenima i indukcijom autoimunske reakcije. HMGB 1, koji nakon oslobađanja iz apoptotskih ćelija prolazi kroz posttranslacionu oksidativnu modifikaciju i deluje kao proinflamatorni medijator (190), nalazi se u povećanoj koncentraciji u serumu pacijenata sa lupusom (190), a takođe i u UV-indukovanim lezijama kože kod pacijenata sa kutanim lupusom, gde njegova koncentracija korelira sa kliničkom aktivnosti bolesti (191, 192). Mikropartikule ili vezikule iz plazma membrana su male vezikule koje se oslobađaju iz plazma membrana umirućih ćelija. One sadrže citoplazmatske proteine kao što su citokini, faktori rasta, proteine akutne faze, DNK i RNK. Povećan broj ovih mikropartikula je detektovan kod pacijenata sa SLE i sekundarnim antifosfolipidnim sindromom (193). Neutrofilne ekstracelularne zamke (*engl.* neutrophil extracellular traps, NETs) oslobađaju aktivisani neutrofili u vidu hromatinske mreže koja sadrži DNK, histone i neutrofilne proteine; služe za hvatanje i ubijanje mikroorganizama (194). Normalno ih uklanja DNaza I, a ukoliko su prisutni inhibitori DNaze ili antiNET antitela, DNaza I ne može da pristupi NETs i efikasno ih ukloni, što dovodi do izmene nuklearnih autoantigena i stvaranja antihromatinskih autoantitela. Poremećaj uklanjanja NETs je dokazan kod pacijenata sa SLE i korelira sa stepenom lupus nefritisa (195).

1.4.4.1. Značaj apoptoze za kutani lupus, merenje apoptoze u kutanim lezijama

Uloga apoptoze indukovane UV zracima u patogenezi kutanih lezija kod lupusa je podvučena u većem broju radova. Noris (196) je postavio hipotezu da antitela, posebno Ro i/ili La, mogu indukovati lizu keratinocita putem ADCC čiji su medijatori brojne različite mononuklearne efektorske ćelije prisutne u infiltratu kod lupusa. Vezivanju ovih antitela prethodi translokacija antigena na plazma membranu, koja je indukovana faktorima kao što su UV zračenje i

estrogeni (197, 198). Oni oslobađaju epidermalne i dermalne citokine i medijatore zapaljenja, koji indukuju lokalne promene u dermu i epidermu, a takođe i leukocite, koji migriraju i vezuju se za epiderm. Antitela se vezuju za translocirane nukleusne antigene, te nastupa liza keratinocita putem ADCC, citotoksičnih T limfocita ili imunskih kompleksa, što dovodi do daljeg oslobađanja epidermalnih citokina. Lokalna aktivacija T limfocita, aktivacija endotelnih ćelija, kao i drugi faktori mogu igrati ulogu u perzistiranju i širenju lezija. Na osnovu studije u kojoj su našli ekstenzivnu apoptozu u skoro čitavom epidermu pacijenata sa kutanim LE (sa izuzetkom LE profundus-a), kao i značajno povećanje Ki-67- i p53-pozitivnih keratinocita, Chung i saradnici (199) su pretpostavili da, nakon oštećenja bazalnih keratinocita koje nastupa putem ADCC, u cilju popravke oštećenje, dolazi do proliferacije bazalnih keratinocita koji eksprimiraju Ki-67 u jedru. Povećana proliferacija ćelija indukuje ekspresiju p53 proteina, koji može regulisati proliferaciju ćelija, nishodno reguliše bcl-2 i aktivira apoptotski put u epidermu. Jedan broj drugih radova je potvrdio pojačanu apoptozu u lezijama kod kutanog lupusa, posebno u akutnijim formama (ACLE i SCLE), kao i smanjenu ekspresiju bcl-2 (100, 191, 200).

Zlatni standard za detekciju i merenje nivoa apoptoze u tkivima predstavlja TUNEL metod (*engl.* terminal deoxynucleotidyl transferase - mediated dUTP nick end labeling, TUNEL), kojim se označavaju slobodni 3'-hidroksilni krajevi fragmenata DNK nastalih u procesu apoptoze pomoću modifikovanih nukleotida (201). Međutim, TUNEL esej je selektivan, ali ne i specifičan za apoptotska jedra koja imaju daleko izraženiju fragmentaciju DNK nego ne-apoptotska. TUNEL može imati visoke vrednosti i tamo gde postoje znaci transkripcije i cepanja RNK (202). Zbog toga se u poslednje vreme sve više koriste i druge tehnike, među kojima i imunohistohemijska analiza za detekciju aktivisane (razdvojene) efektorske kaspaze-3, za koju je dokazano da je pouzdan i senzitivni model za detekciju apoptoze u tkivu (203).

1.5. DEZOKSIRIBONUKLEAZE - ISTORIJAT, VRSTE, ULOGA U PATOGENEZI LUPUSA

DNaza se javlja kod skoro svih živih bića i predstavlja grupu enzima sposobnih da hidroliziraju DNK; poznata su bar 2 gena, DNaza I i II. Od otkrića u bovinom pankreasu 1905. godine (204), DNaza I je smatrana primarno enzimom digestivnog trakta. Ovaj enzim luče žlezde povezane sa digestivnim traktom, prvenstveno parotidna žlezda i pankreas, i njegova glavna uloga je da hidrolizira egzogenu DNK (205).

DNaza I hidrolizira dvostruko uvijenu DNK stvarajući tri i/ili tetraoligonukleotide koji imaju 5'-fosfatni i 3'-hidroksilni kraj. Za punu enzimsku aktivnost neophodna je pH oko 7,5 i mikromolarne koncentracije dvovalentnih jona kalcijuma, magnezijuma ili mangana (206). Njenu enzimsku aktivnost inhibira G-aktin (207, 208). Ova inhibicija zahteva ATP i dovodi, kako do inhibicije DNaze, tako i do depolimerizacije aktina (209). Osim aktina, DNazu I inhibišu i cink i helatori dvovalentnih jona (210). DNaza I je osetljiva na konformaciju dvostrukog heliksa, te brzina hidrolize značajno zavisi od strukture: najbolji supstrat za DNazu predstavlja B-oblik DNK mešovitog sastava (211).

Molekul DNaze I ima molekulsku masu od 31 do 34 kD, zavisno od aminokiselinskog sastava i obima glikozilacije, što sve zavisi od vrste i tkiva. DNaza I je sekretorni protein koji sadrži amino-terminalni signalni peptid koji je odgovoran za translaciju u granulirani endoplazmatski retikulum, koja je praćena sazrevanjem, transportom i sekrecijom kroz sekretorni put (212). Četiri aminokiselinska ostatka (Glu78, His134, Asp212, and His252) odgovorna za katalitičku aktivnost (213), kao i 2 cistinska ostatka na pozicijama 173 i 209, koja stvaraju disulfidnu vezu odgovornu za strukturnu stabilnost enzima (214), su isti kod svih kičmenjanka. Gen za Dnazu I je smešten na hromozomu 20, dugačak je oko 3.2 kilobaze i ima 9 egzona i 8 introna. Sadrži 3 kodominatna alela: DNASE*1, DNASE*2, DNASE*3, DNASE*4 (215). Postoje još 3 člana ove

porodice proteina koja imaju visoku sličnost u sekvenciji nukleotida, odnosno aminokiselina, one se označavaju kao DNaza I-like 1, 2 i 3 i eksprimiraju se u srčanom i skeletnom mišiću, mozgu i makrofagima (216). DNaza I kod sisara postoji u 3 oblika - pankreasni, parotidni i mešoviti (217). Raspored DNaza u tkivima odražava navike u ishrani - omnivore, u koje spada i čovek, imaju pankreasni tip DNaze I (205). Međutim, visoka ekspresija gena za DNazu I je registrovana u parotidnoj i submandibularnoj žlezdi, bubregu i dvanaestopalačnom crevu. Intermedijarna ekspresija gena je registrovana u ileumu, mezenteričnim limfnim čvorovima, jetri, prostati, epididimisu, jajniku i želucu, dok je niska ekspresija zabeležena u sublingvalnim, prepucijalnim i pituitarnoj žlezdi, kao i u suznoj i štitastoj žlezdi, mokraćnoj bešici i oku miša (212).

U prošlosti su korišćeni različiti metodi kvantifikacije DNaze I: kolorimetrija, precipitacija, fluorimetrija, viskometrija, imunoreaktivnost DNaze I je merena radioimunoesejom. Za određivanje enzimske aktivnosti korišćen je esej sa ³²P obeleženom E.coli DNK kao supstratom, a u tkivima i esej pojedinačne radijalne enzimske difuzije (*engl.* Single Radial Enzyme Diffusion, SRED), koja se bazira na hidrolizi DNK u pločama sa DNK agarom (218). U poslednje vreme se najviše koristi ELISA metod, dok se za brzu detekciju DNaze I u serumu potrebnu za dijagnostiku infarkta koristi mikročip elektroforeza (219).

Danas se zna da je DNaza I glavna nukleaza prisutna u serumu i urinu, kao i u semenju tečnosti (217). Aktivnost enzima u urinu je višestruko izraženija nego u serumu (220). DNaza I ima značajnu ulogu u apoptozi (221), kako u fiziološkim uslovima, tako i u farmakološki izazvanoj apoptozi (222). DNaza I ulazi u ćelije vezujući se za receptor za manozu 6-fosfat. Jedna od funkcija, osim hidrolize DNK, je i ushodna regulacija transkripcije Fas-a putem interakcije sa promotorom gena za Fas (223). Slično apoptozi, dokazana je uloga DNaze i u efikasnom uklanjanju DNK nakon farmakološki izazvane nekroze ćelija, u saradnji sa plazminogen sistemom (224).

Smatra se da je DNaza I jedan od ključnih molekula u razvoju SLE (225). Postoji nekoliko razloga za ovu tvrdnju: prvo, dsDNA je dominantan autoantigen kod pacijenata sa SLE (226), drugo, DNaza iz bovinog pankreasa uništava antigenost DNK, i na kraju, aktivnost DNaze I u serumu pacijenata sa SLE je često niska i to sniženje je veće kod pacijenata sa aktivnijim SLE (227). Značajnu potporu stavu da DNaza I izrazito utiče na razvoj SLE daje i rad u kome miševi sa deficitom DNaze I razvijaju sindrom sličan SLE sa prisutnim ANA, deponovanjem imunskih kompleksa u glomerule bubrega, visokim titrom anti-dsDNA antitela i potpuno razvijenim glomerulonefritisom, sve u zavisnosti od nivoa DNaze I (228). Prisustvo ANA i glomerulonefritisa je bilo značajno češće kod ženki miševa nego kod mužjaka, kao i kod DNaza^{-/-} životinja u odnosu na DNaza^{+/-} miševe. Ženke miševa sa deficitom DNaze I su imale antitela na dsDNA. Macanović i saradnici (229) su pokazali da NZB/NZW miševi imaju značajno nižu koncentraciju DNaze I u serumu i urinu nego zdravi miševi, kao i da sniženje DNaze I nije povezano sa prisustvom aktina ili anti DNK antitela. Takođe, postavili su hipotezu da smanjena aktivnost DNaze I u urinu dozvoljava većoj količini imunskih kompleksa da se zadržava u bubrezima i na taj način omogućava progresiju bolesti. U radu Fentonove i saradnika (230) je, na (NZBxNZW)F1 miševima, pokazano da u ranoj fazi lupus nefritisa dolazi do odlaganja hromatin-IgG kompleksa u matriks mezangijuma, što korelira sa pojavom anti-dsDNA antitela, a ovim događajima prethodi nishodna regulacija bubrežne DNaze I, što dovodi do niske aktivnosti enzima i do nedovoljne fragmentacije hromatina iz mrtvih ćelija, zbog čega se veliki fragmenti zadržavaju i akumuliraju u bazalnoj membrani glomerula. Istovremeno dolazi do pojačane aktivnosti metaloproteinaza matriksa (verovatno veći fragmenti hromatina stimulišu *Toll-like* receptore u npr. dendritičnim ćelijama).

Niska aktivnost DNaze I je registrovana i u studijama na pacijentima sa SLE (231-235). Međutim, u njima nije nađena koherentna korelacija između

aktivnosti DNaze I u serumu i stepena aktivnosti SLE, odnosno biomarkera SLE.

Kod pacijenata sa SLE, infekcija je čest okidač ataka bolesti i jedan od glavnih uzroka smrti. U odgovoru na infekciju učestvuju i neutrofilni polimorfonukleari koji stvaraju NETs koje su sačinjene od DNK, histona i proteina neutrofila i imaju antimikrobna svojstva. Uklanjanje ovih zamki može biti ključalno za održavanje homeostaze tkiva i izbegavanje prezentacije sopstvenih antigena. DNaza I je najvažniji enzim koji uklanja NETs. Za jedan broj pacijenata sa SLE dokazano je da je ovo uklanjanje poremećeno, i to iz 2 razloga: prisustvo inhibitora DNaze I ili prisustvo anti-NET antitela koja sprečavaju DNazu I da pristupi NETs-u. Poremećaj funkcije DNaze I i poremećaj uklanjanja NETs korelira sa kliničkim manifestacijama SLE, a posebno sa težinom zahvatanja bubrega (195, 236).

Sa druge strane, kod japanskih pacijenata je registrovana jedna *nonsense* mutacija u egzonu 2 DNaze I (237), međutim, u kasnijim radovima na evropskim, afričkim i korejskim pacijentima nije nađena ova mutacija (238-240). Nadalje, u studiji Tew i saradnika (241) je potvrđeno da je DNaza I zaista glavna nukleaza u serumu, ali je je pokazano i da niža aktivnost DNaze I kod pacijenata sa lupusom nije rezultat samo mutacije gena, već i posttranslacionih i mehanizama specifičnih za tkiva.

Iako je etiologija kutanog LE nejasna, nekoliko studija sugerišu da povećano oslobađanje ili poremećaj uklanjanja kompleksa DNK-histon nakon smrti ćelija, koje normalno vrši enzim DNaza I, mogu dovesti do razvoja ili širenja oboljenja. U studiji Drosera i saradnika pokazano je da je, od 59 pacijenata sa LE i kutanim lezijama, 7% imalo nisku aktivnost DNaze I u serumu, a smanjenje aktivnosti se dominantno dešavalo kod pacijenata sa SLE (242). Takođe, sniženje aktivnosti DNaze I je delimično uzrokovano i prisustvom inhibitornih antiDNaza antitela koja prepoznaju konzervisani epitop u blizini katalitičkog centra, u studiji Yeh i saradnika oko 62% pacijenata sa SLE je imalo prisutna antiDNaza antitela, za razliku od samo 8% zdravih osoba (243). U istoj studiji je

nađena i pozitivna korelacija između koncentracija anti-DNaza i anti-DNK antitela u serumima pacijenata sa SLE. Takođe, u studiji Puccettija i saradnika (244) pokazano je da anti-DNK antitela pacijenata sa lupusom mogu da se vezuju za DNazu I. Sa druge strane, kod nefritičkih MRL-lpr/lpr miševa je aktivnost DNaze I, kao i nivo njene informacione RNK, ostao stabilan tokom progresije kutane bolesti, za razliku od progresivnog gubitka renalne aktivnosti i nivoa informacione RNK za DNazu I tokom bubrežne bolesti. Gubitak bubrežne DNaze I objašnjava oslobađanje fragmenata hromatina dok povećana aktivnost metaloproteinaza matriksa može dovesti do oštećenja membrana čineći ih dostupnim kompleksima koje čine hromatinski fragmenti i IgG. Ovi kompleksi, uz dokazanu ushodnu regulaciju metaloproteinaza matriksa derma, mogu biti ključni u deponovanju imunskih kompleksa u koži ovih miševa (245).

DNaza I kao potencijalni terapijski agens. Nekoliko pokušaja lečenja SLE DNazom I, pojedinačnih i u manjim grupama, nije dalo uspeha - prva pacijentkinja je umrla (246), jedna grupa je lečena bovinom DNazom I koja je indukovala razvoj antitela kod svih pacijenata (247), koja su poništila njeno dejstvo, dok su u poslednjoj studiji sa rekombinantnom DNazom I postignute stabilne koncentracije enzima, ali bez efekta na serumske markere aktivnosti bolesti (248). Sa druge strane, dodavanje rekombinantne murine DNaze I je kod NZB/WF1 miševa dovela do usporavanja progresije SLE (249). Terapija DNazom I snižava broj B ćelija koje sekretuju anti-dsDNA antitela, ali ne deluje na proizvodnju citokina, razvoj glomerulonefritisa i ne produžava preživljavanje miševa (250). Rekombinantna DNaza I je 1990. godine uvedena u terapiju pacijenata sa cističnom fibrozom radi smanjivanja viskoznosti sputuma (251).

Osim lupusa, u poslednjih nekoliko godina aktivnost DNaze I je povezivana sa razvojem drugih oboljenja. Nađeno je da je aktivnost DNaze I u serumu kod pacijenata sa inflamatornom bolešću creva (IBD) niža nego kod zdravih, ali viša nego kod pacijenata sa SLE (252). Aktivnost DNaze I je u negativnoj korelaciji sa koncentracijom anti nukleozomalnih antitela u serumu (i kod IBD i kod SLE)

(252). Nadalje, sve veći značaj se pridaje DNazi I u patogenezi infarkta miokarda. Hipoksija, verovatno putem ushodne regulacije gena za DNazu I, može podići nivo DNaze I u serumu pacijenata sa infarktom. DNaza I ulazi u ćelije nakon vezivanja za receptor za manoza-6-fosfat i služi kao transkripcioni faktor koji moduliše ekspresiju Fas dovodeći do indukcije apoptoze (u ovom slučaju ćelija miokarda) (253). Nedostatak gelsolina značajno smanjuje apoptozu indukovanu DNazom I, te inhibicija gelsolina može biti novi cilj terapije za zastoj srca (254). Takođe, modifikovana humana rekombinantna DNaza I može efikasno eliminisati ćelije raka (naročito melanoma) koje su otporne na apoptozu (255), što je čini kandidatom za novu, personalizovanu terapiju karcinoma (256).

1.6. RADNA HIPOTEZA

Kod pacijenata sa LE koji imaju kutane manifestacije sa jedne strane postoji povećan nivo apoptoze izazvan UV zračenjem, a sa druge strane poremećaj uklanjanja ostataka apoptotičnih ćelija nastao prvenstveno kao rezultat smanjene aktivnosti enzima DNaza I u serumu. Navedeni poremećaji doprinose nastanku kutanih lezija, produkciji spektra antihromatinskih autoantitela i povećanoj aktivnosti bolesti.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Na osnovu dosadašnjih saznanja o ulozi poremećaja apoptoze i aktivnosti DNaze I u patogenezi LE, postavljeni su sledeći ciljevi istraživanja:

- I. Ispitati da li postoji korelacija između nivoa aktivnosti DNaze I u serumu, zahvatanja pojedinih organa i indeksa aktivnosti bolesti kod pacijenata sa CLE i SLE.
- II. Ispitati da li postoji korelacija između nivoa aktivnosti DNaze I u serumu i imunoseroloških parametara SLE (ANA, antihromatinska antitela /anti-dsDNA, anti-nukleozomalna, anti-histonska/, komponente komplementa).
- III. Utvrditi stepen apoptoze u koži lezije i zdravoj fotoprotektovanoj koži kod pacijenata sa LE.
- IV. Ispitati da li postoji korelacija između stepena apoptoze u koži lezije i fotoprotektovanoj koži i nivoa aktivnosti DNaze I u serumu.

3. PACIJENTI I METODE

Ova studija preseka je obuhvatila pacijente sa LE lečene u Kliničkom centru Srbije i Institutu za reumatologiju od 1.3.2011. do 1.6.2013. godine. Studija je izvedena u skladu sa pravilima Helsinške deklaracije i odobrena je od strane Etičkog odbora Kliničkog centra Srbije i Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

3.1. SELEKCIJA ISPITANIKA

Kriterijumi za uključivanje pacijenata u studiju bili su sledeći:

1. Za pacijente sa isključivo kutanim LE: postavljena dijagnoza kutanog LE na osnovu kliničke slike, odnosno kliničke slike i histopatološkog nalaza
2. Za pacijente sa SLE: postavljena dijagnoza SLE na osnovu ACR kriterijuma, a za pacijente kojima je ispitivan stepen apoptoze u koži - prisustvo i specifičnih kutanih lezija verifikovano kliničkim pregledom
3. Pacijenti u vreme uzimanja uzoraka nisu smeli biti na dozama prednizona većim od 20mg dnevno, niti su smeli primati drugu imunosupresivnu terapiju
4. Lezija kože koja se bioptira nije smela biti tretirana lokalnom kortkosteroidnom terapijom minimum 2 nedelje
5. Potpisan informisani pristanak za učešće u studiji

U ovoj studiji je ispitano ukupno 146 konsektivnih pacijenata sa LE koji su zadovoljili navedene inkluzione kriterijume. Od toga je bila 121 žena (82,9%) i 25 muškaraca (17,1%), odnos žene:muškarci je bio 4,84:1. Prosečna starost ispitanika prilikom uključivanja u studiju je bila $41,7 \pm 13,8$ godina, sa opsegom od 16 do 78 godina. Prosečno trajanje kutanog LE kod 115 pacijenata koji su ga imali je bilo $6,1 \pm 7,9$ godina (opseg: 0-30 godina), prosečno trajanje SLE kod 107 pacijenata koji su ga imali je bilo $3,7 \pm 4,8$ godina (opseg: 0-23 godina). Kontrolnu grupu je činilo 67 zdravih osoba, dobrovoljnih davaoca krvi, 55 žena i 12

muškaraca (odnos žene:muškarci=4,58:1), prosečne starosti 32.5 ± 9.6 godina (opseg: 20-56 godina).

Pacijenti koji su ispunjavali navedene inkluzione kriterijume su bili stratifikovani na osnovu vrste i tipa LE. Svaki od ispitanika potpisao je informisani pristanak o učestvovanju u studiji, u slučaju maloletnih pacijenata pristanak su potpisivali roditelji. U vreme uključivanja u studiju registrovani su sledeći podaci: uzrast, pol, trajanje bolesti (kutanih lezija i SLE) i aktuelna terapija (sistemska i lokalna). Pacijentima su određeni indeksi aktivnosti bolesti i uzeti su im uzorci venske krvi bez koagulansa, koji su podeljeni u 3 dela. Dva dela su poslata u Biohemijsku i Imunološku laboratoriju Kliničkog centra Srbije gde su urađene imunoserološke analize, a iz trećeg dela krvi centrifugiranjem je izdvojen serum, ti uzorci su smrznuti na -80°C i u njima je kasnije određena aktivnost DNaze I.

Ukupno 35 pacijenata sa SLE je praćeno, u proseku 5.6 ± 2.8 meseci, i na kontrolnim pregledima su registrovani indeksi aktivnosti bolesti, aktivnost DNaze I u serumu i imunoserološke analize.

Ispitivanje indeksa apoptoze je sprovedeno kod 69 pacijenata sa LE, i to kod 30 pacijenata sa SLE i kutanim manifestacijama i 39 pacijenata sa isključivo kutanim formama LE. Od ovih 69 pacijenata, 53 su bile žene (76,8%), a 16 muškarci (23,2%), odnos žena i muškaraca je bio 3,31:1. Prosečna starost ispitanika iz ove grupe je bila $47,5 \pm 13,9$ godina, sa opsegom od 16 do 78 godina. Prosečno trajanje kutanog LE kod ove grupe pacijenata je bilo 6,1 godina (opseg: 0-30 godina), dok je prosečno trajanje SLE kod ove grupe pacijenata je bilo 4,8 godina (opseg: 0-23 godine). Pacijentima kojima je ispitivan stepen apoptoze u koži su uzete biopsije kože lezije i zdrave kože sa fotoprotektovane regije gluteusa. Svaki uzorak kože je podeljen u 2 segmenta, jedan je fiksiran u formalinu i kalupljen u parafinu i u njemu je određen stepen apoptoze imunohistohemijskom metodom, a drugi je smrznut u tečnom azotu i u njemu je izveden DIF test.

3.2. INSTRUMENTI MERENJA

Kod pacijenata su registrovane sledeće varijable:

- **Aktivnost DNaze I u serumu**

Ovaj parametar je meren novom ELISA metodom (Orgentec Diagnostika, Mainz, Germany). Serumi su nakon odmrzavanja razblaženi 1:11 i razliveni na ploču sa 96 bazenčića obloženih sa DNK. Nakon inkubacije na 37°C u trajanju od 1 sata oni su isprani. Nakon toga je dodat enzim (peroksidaza rena) konjugovan sa anti-DNaza I supstratom i inkubiran 15 minuta na sobnoj temperaturi da bi reagovao sa preostalim (nerazgrađenom) DNK. Nakon dodavanja supstrata, tokom enzimske reakcije se razvija žuta boja čiji se intenzitet meri spektrofotometrijski na 450nm. Njen intenzitet je obrnuto proporcionalan aktivnosti DNaze I. U analizu je uključena i serija standarda, kao i pozitivna i negativna kontrola. Prema proizvođačkoj specifikaciji, u studiji opsega normalnih vrednosti sa zdravim davaocima krvi, granična vrednost za značajnu redukciju enzimske aktivnosti je bila 25%/mL, stoga je aktivnost DNaze I u serumu manja od 75%/mL smatrana smanjenom.

Međutim, prilikom analize drugog seta uzoraka koji potiču od 69 pacijenata sa kutanim lupusom kod kojih je ispitivana i apoptoza, uočeno je da je aktivnost DNaze I u serumu kod skoro svih pacijenata značajno niža od očekivane, te je urađena analiza sa enzimom iz istog pakovanja na 30 zdravih davaoca krvi, nakon koje je ustanovljeno da je za ovu grupu pacijenata granična vrednost za značajnu redukciju enzimske aktivnosti = aritmetička sredina - 1 standardna devijacija (SD) vrednosti u kontrolnoj grupi, odnosno da se smanjenom smatra aktivnost DNaze I u serumu niža od 45,6%/mL. Takođe, sve statističke analize koje su uključivale poređenje apsolutnih vrednosti aktivnosti DNaze I sa ostalim kliničkim i imunoserološkim markerima, urađene su zasebno za prvu grupu od 77 pacijenata sa SLE i drugu grupu od 69 pacijenata sa LE (kojima je urađena i analiza apoptoze) i zasebno su prikazane.

- **Klinički indeksi aktivnosti bolesti - SLEDAI-2K, SLICC/ACR, CLASI**

Indeks aktivnosti SLE - SLEDAI-2K i indeks oštećenja tkiva SLICC/ACR su određeni na osnovu prisustva simptoma i znakova u kliničkoj slici, kao i laboratorijskih parametara - Prilozi 1 i 2 (84, 85). Podaci potrebni za izračunavanje navedenih indeksa su dobijeni iz bolničke dokumentacije (istorije bolesti, ambulantni kartoni). Vrednost SLEDAI-2K ≥ 7 je označavala umereno do visoko aktivnu bolest, dok je vrednost SLEDAI-2K < 7 označavala SLE niske aktivnosti (257).

Indeksi težine bolesti kod kutanog LE - CLASI i RCLASI su određeni na osnovu kliničke slike, prilikom pregleda pacijenta, u vreme uzimanja uzoraka krvi i tkiva kože - Prilozi 3 i 4 (140, 145).

- **Laboratorijski pokazatelji aktivnosti oboljenja - sedimentacija eritrocita (SE), fibrinogen u serumu**

Navedeni pokazatelji su određeni iz uzoraka krvi standardnim metodama (za SE - modifikovana metoda po Westergreenu, a za fibrinogen - koagulometrija). Vrednosti SE u prvom satu preko 15 mm za muškarce mlađe od 50 godina i preko 20 mm za starije od 50 godina, kao i vrednosti preko 20 mm za žene mlađe od 50 godina i preko 30 mm za starije od 50 godina su smatrani povišenom, dok su vrednosti fibrinogena veće od 3,7 g/L takođe smatrani patološkim.

- **Parametri urođene imunosti - komponente komplementa (C3 i C4), C-reaktivni protein (CRP)**

Navedeni parametri su određeni iz uzoraka krvi standardnim metodama - automatska nefelometrija za komponente komplementa (Orion Diagnostika, Espoo, Finland), a za CRP nefelometrija i turbidimetrija. Normalne vrednosti za C3 komponentu komplementa (C3) su 0,9-2,1 g/L, a za C4 komponentu komplementa (C4) su 0,1-0,4 g/L, dok su vrednosti CRP veće od 3 mg/L (mereno nefelometrijski), odnosno 8 mg/l (mereno turbidimetrijski) smatrane patološkim.

- **Parametri stečene imunosti - ANA, anti-nukleozomalna, anti-histonska, anti-dsDNA antitela**

Titar IgG izotipa ANA je meren metodom indirektno imunofluorescencije (IIF) na 2 supstrata - jetri pacova i HEp-2 ćelijama. Titar ANA \geq 1:80 je smatran patološkim. Pacijenti sa SLE i negativnim nalazom ANA su testirani na prisustvo anti-Ro(SSA) antitela ELISA metodom (Orgentec Diagnostika, Mainz, Germany).

Koncentracija anti-dsDNA antitela je određena selektivnom ELISA metodom za određivanje visoko aviditetnih anti-dsDNA. Normalne vrednosti visoko aviditetnih anti-dsDNA antitela određenih ovom metodom su 0-30 IU/mL (Farrzyme™, The Binding Site Ltd, Birmingham, UK) kod prve grupe od 77 pacijenata sa SLE, odnosno 0-80 IU/ml (Genesis Diagnostics, Cambridgeshire, UK) kod druge grupe od 69 pacijenata sa LE.

Anti-nukleozomalna i anti-histonska antitela IgG izotipa su izmerena takođe ELISA metodom (Orgentec Diagnostika, Mainz, Germany). Prema proizvođačkoj specifikaciji, koncentracije anti-nukleozomalnih antitela manje od 20 U/mL i anti-histonskih antitela ispod 40 U/mL su smatrane normalnim.

- **Stepen apoptoze u koži**

Keratinociti koje ispoljavaju apoptozu su identifikovani u uzorcima kože komercijalno dostupnim imunohistohemijskim bojenjem na razdvojenu (aktiviranu) kaspazu 3, prema uputstvu proizvođača (Cell Signaling Technology, Beverly, Massachusetts, USA). Preparati su najpre deparafinisani ksilolom, a potom rehidrirani 100% i 95% etanolom po 2 puta, kao i destilovanom vodom. Demaskiranje antigena izvršeno je 0,01M natrijum citratnim puferom (pH 6,0) na temperaturi ključanja, a potom je izvršena supresija peroksidaze blokirajućim rastvorom i blokirajućim peptidom, uz dodavanje primarnog antitela i ispiranje. Potom je dodato sekundarno antitelo sa biotinom i AB agens, a zatim i supstrat sa hromogenom, i na kraju je izvršena dehidracija 95% i 100% etanolom i čišćenje ksilolom. Nakon montiranja pokrovnog stakalca preparati su posmatrani pod svetlosnim mikroskopom

(LEICA DM1000LED, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). Mesta specifičnog vezivanja antitela su smeđe boje, dok hematoksilin, nespecifično vezan za jedra svih ćelija, boji ih plavo (Fotografije 1-4). Kao pozitivna kontrola je, prema preporukama proizvođača, korišćen preparat limfoma (limfni čvor), a kao negativna – preparat kod koga se tokom pripreme izostavljena faza nakon dodavanja primarnog antitela.

U svakom preparatu su pregledana po 3 vidna polja (400x) i prebrojani svi keratinociti u vidnom polju, kao i svi markirani apoptotični keratinociti, a potom je izračunat procenat apoptotičnih keratinocita u odnosu na ukupan broj u sva 3 vidna polja. Stepenn apoptoze (apoptotski indeks, AI) se označava, zavisno od procenta ćelija koje ispoljavaju apoptozu, skalom od 0 do 5, po sledećoj šemi (100):

0 - bez bojenja,

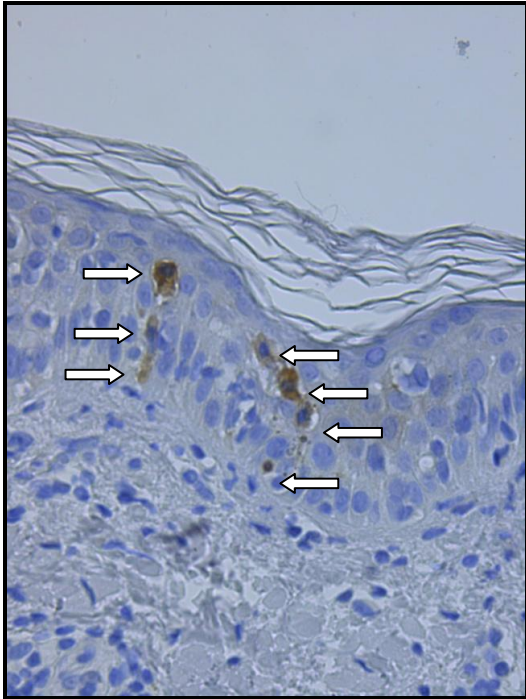
1 - sporadično bojenje (<5% ćelija epiderma) - fotografija 1 i 2

2 - minimalno bojenje (5-25% ćelija epiderma) - fotografija 3

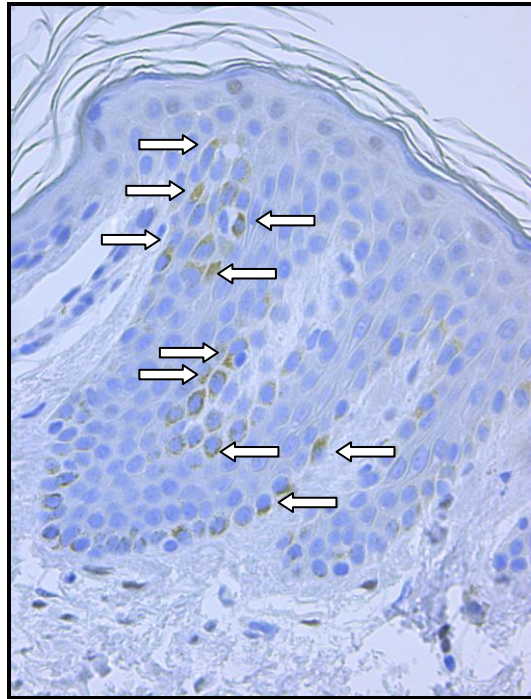
3 - umereno bojenje (26-50% ćelija epiderma)

4 - izraženo bojenje (51-75% ćelija epiderma)

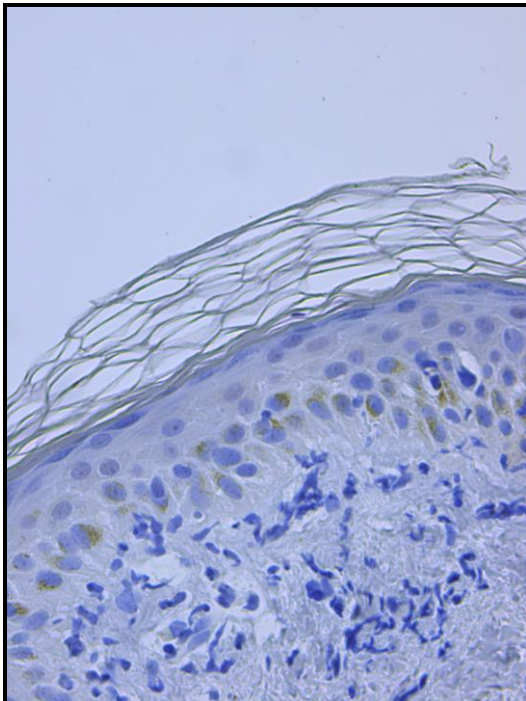
5 - bojenje čitavog epiderma (>75% ćelija epiderma) - fotografija 4



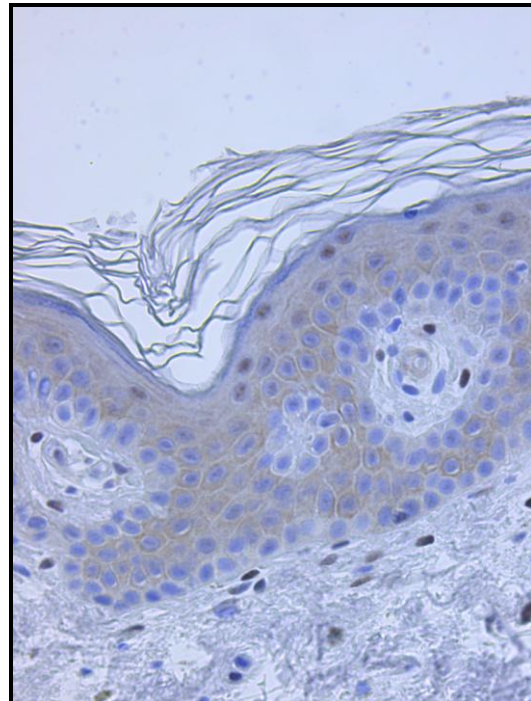
Fotografija 1. Apoptotične ćelije u koži lezije pacijenta sa LE (obeležene strelicama) (HE, x400). AI=1



Fotografija 2. Apoptotične ćelije u zdravoj koži pacijenta sa LE (obeležene strelicama) (HE, x400). AI=1



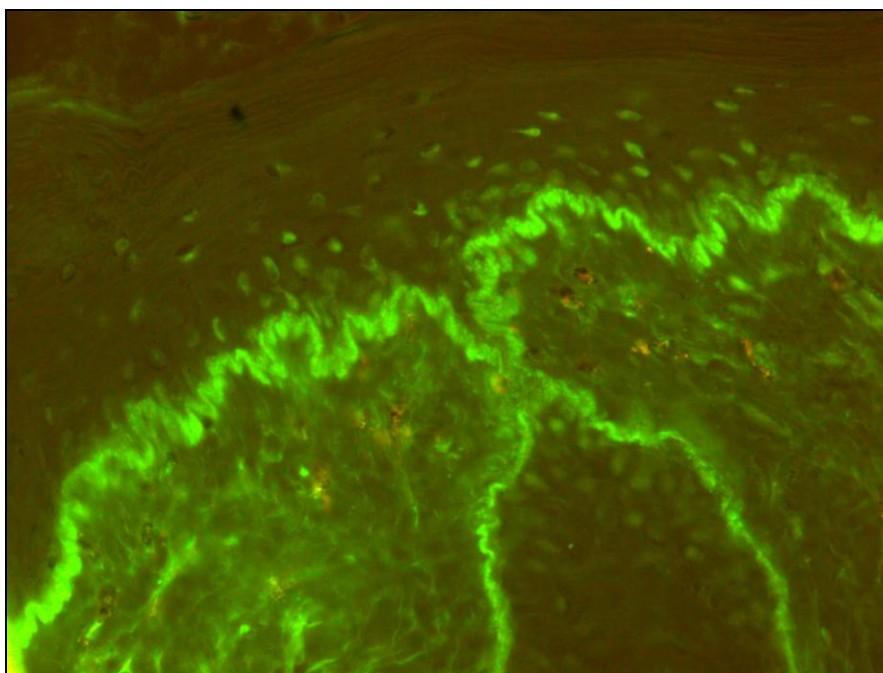
Fotografija 3. Apoptotične ćelije u koži lezije pacijenta sa LE (HE, x400). AI=2



Fotografija 4. Apoptotične ćelije u koži lezije pacijenta sa LE (HE, x400). AI=5

- **Nalaz direktnog imunofluorescentnog (DIF) testa - lupus band testa (LBT) sa kože lezije i fotoprotektovane zdrave kože gluteusa**

Uzorci kože su brzo smrzavani i sečeni, preparati su sušeni, ispirani u PBS (*engl.* phosphate buffered saline) i inkubirani sa fluoresceinom konjugovanim antihumanim imunoglobulinima IgG, IgA i IgM i antihumanom komponentom komplementa C3c. Preparati su potom ponovo ispirani u PBS, prekriveni rastvorom 10% glicerola u PBS i pokrovnim stakalcem, a zatim su posmatrani pod fluorescentnim mikroskopom. Pozitivan LBT/DIF test je definisan kao prisustvo karakteristične fluorescencije bilo kog imunoreaktanta (IgG, IgA, IgM, C3c) u zoni bazalne membrane, u bilo kojoj kombinaciji, obliku i distribuciji (fotografija 5), dok je negativan LBT definisan kao odsustvo imunoreaktanata u zoni bazalne membrane.



Fotografija 5. Kontinuirani depoziti imunoglobulina u vidu trake (*engl.* band) u zoni bazalne membrane - pozitivan DIF test/LBT (DIF, x400)

3.3. STATISTIČKA ANALIZA

Za statističku analizu je korišćen softverski paket SPSS (*engl.* Statistical Package for Social Sciences) za Windows, verzija 17.0 (SPSS, Inc, Chicago, IL, USA). U radu su korišćene metode deskriptivne i inferencijalne statistike.

Podaci su prvo analizirani metodama deskriptivne statistike, od kojih su korišćene: mere centralne tendencije (aritmetička sredina i medijana), mere varijabiliteta (interval varijacije, standardna devijacija i interkvartilni rang) i relativni brojevi. Vrednosti kontinuiranih varijabli su prikazane kao prosečna vrednost ± 1 SD, a diskontinuiranih varijabli kao brojevi i procenti.

Od metoda analitičke statistike korišćene su:

- a) metode identifikacije empirijskih raspodela,
- b) metode za procenu značajnosti razlike, i to: za numeričke varijable Student-ov t test i jednofaktorska numerička analiza varijanse (ANOVA) sa testom najmanjih značajnih razlika (*engl.* Least Significant Difference test, LSD test) za međugrupna poređenja, dok je za kategorijalne varijable korišćen Hi-kvadrat test, i
- c) metode za procenu značajnosti povezanosti - Pearson-ov koeficijent linearne korelacije.

Za utvrđivanje najvažnijeg modela povezanosti različitih nezavisnih varijabli sa SLEDAI skorom korišćena je multipla regresiona analiza. Za utvrđivanje prognostičkih faktora kutanog lupusa korišćena je logistička regresiona analiza uz računanje relativnog rizika i njemu pripadajućeg 95% intervala poverenja.

Podaci su prikazani tabelarno i grafički. U svim testovima vrednosti verovatnoće, *p*-vrednosti manje od 0,05 smatrane su značajnim, a manje od 0,01 - visoko značajnim.

4. REZULTATI

4.1. DEMOGRAFSKI PODACI, KLINIČKI, IMUNOLOŠKI I SEROLOŠKI PARAMETRI BOLESTI

Osnovni demografski podaci, klinički i imunoserološki parametri u studijskoj populaciji su prikazani u tabeli 5. Od 146 pacijenata sa LE, izolovani CLE je imalo njih 39, a SLE 107. Od tog broja je SLE bez kutanih manifestacija su imala 31 pacijenta, dok je preostalih 76 pacijenata imalo i kutani lupus i kriterijume za SLE.

Kod pacijenata sa SLE, od organskih manifestacija je najčešće zabeleženo zahvatanje kože (71,0% pacijenata), a potom hematološki poremećaji (55,1% pacijenata), kao i manifestacije od strane zglobova (52,3%) i bubrega (43,9% pacijenata).

Opšti pokazatelji aktivnosti oboljenja, SE i fibrinogen, su bili povišeni kod većine pacijenata, dok je od poremećaja parametara urođene imunosti kod pacijenata sa LE najčešće zabeležen povišen CRP. Od praćenih parametara stečene imunosti - antitela, najčešće su bila prisutna ANA u povišenom titru (kod 69,9% svih pacijenata sa LE), kao i anti-nukleozomalna antitela (kod 47,9% svih pacijenata sa LE). Snižena aktivnost DNaze I u serumu je zabeležena kod 64 pacijenta (43,8%).

Tabela 5. Osnovni demografski, klinički i laboratorijski parametri kod 146 pacijenata sa LE

Demografski i dijagnostički parametri	n = 146
Starost (godine): prosek ± SD ^a (opseg)	41,6±13,9 (16-78)
Pol: Ž/M	121/25
Broj pacijenata sa SLE (%)	107 (73,3%)
Broj pacijenata sa izolovanim CLE (%)	39 (26,7%)
Broj pacijenata sa SLE i CLE (%)	76 (52,0%)
Ukupan broj pacijenata sa CLE (%)	115 (78,8%)
Prosečno trajanje SLE u godinama (opseg)	3,7 (0-23)
Prosečno trajanje CLE u godinama (opseg)	6,1 (0-30)
Zahvatanje organa kod 107 pacijenata sa SLE	
Koža (%)	76 (71,0)
Zglobovi (%)	56 (52,3)
Bubrezi (%)	47 (43,9)
Neuropsihijatrijske manifestacije (%)	9 (8,4)
Serozitis (%)	23 (21,5)
Hematološki poremećaji (%)	59 (55,1)
Biomarkeri LE	
Povišena sedimentacija eritrocita (%)	101 (69,2)
Povišen fibrinogen (%)	84 (57,5)
Povišen CRP (%)	70 (47,9)
Povišena ANA (%)	102 (69,9)*
Povišena anti-dsDNA antitela (%)	57 (39,0)
Povišena anti-nukleozomalna antitela (%)	82 (56,2)
Povišena anti-histonska antitela (%)	44 (30,1)
Snižen C3 (%)	42 (28,8)
Snižen C4 (%)	65 (44,5)
Snižena aktivnost DNaze I u serumu	64 (43,8)

^aSD, standardna devijacija

* Pacijenti sa SLE i negativnim ANA su imali anti-Ro(SSA) antitela

4.2. KORELACIJA AKTIVNOSTI DNaze I U SERUMU SA KLINIČKIM I IMUNOSEROLOŠKIM PARAMETRIMA LE

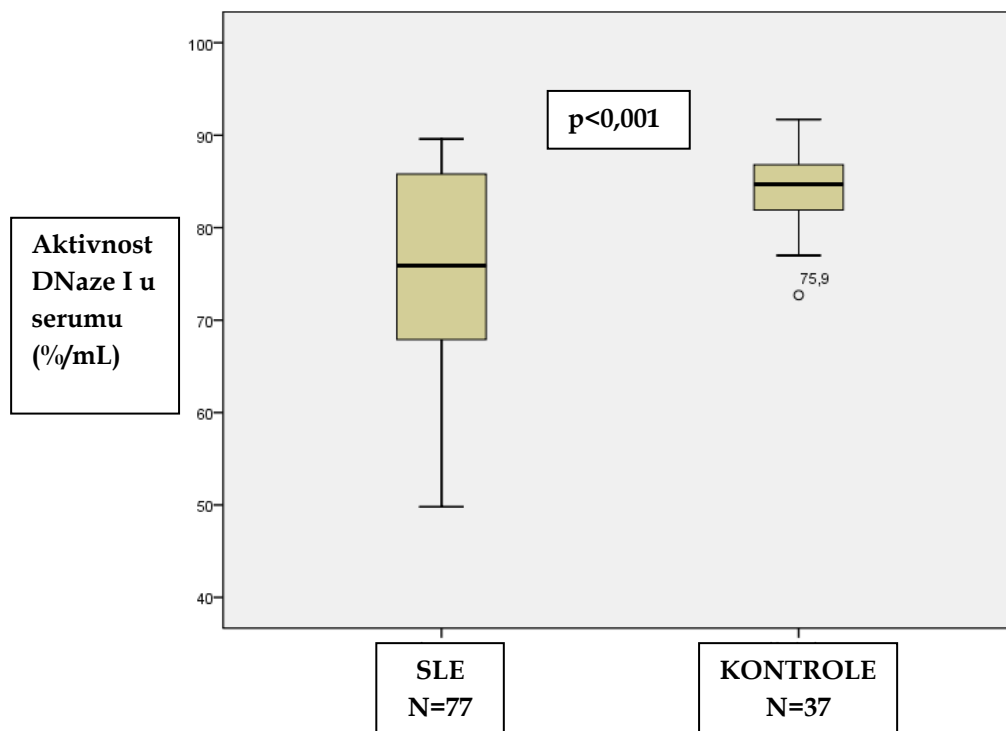
4.2.1. Razlike u aktivnosti DNaze I u serumu kod različitih populacija pacijenata sa LE

Nisku aktivnost DNaze I u serumu je imalo 64/146 pacijenata (43,8%), i to 8/25 muškaraca (32,0%) i 56/121 žena (46,3%), razlika među polovima nije bila statistički značajna (hi kvadrat test, $p=0,19$).

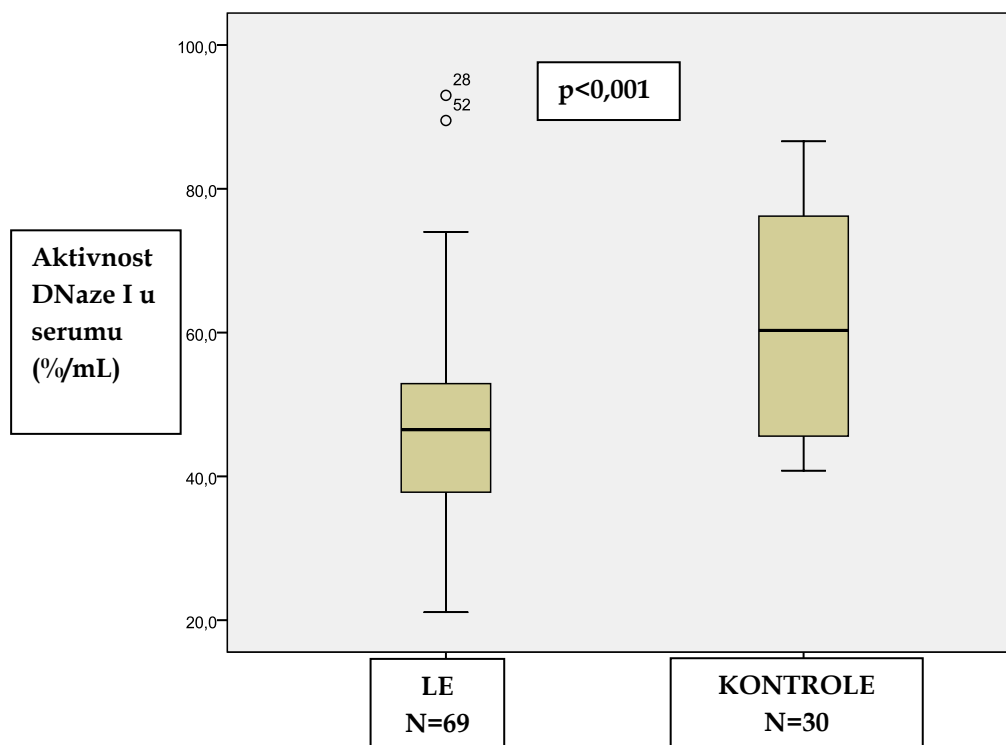
Nisku aktivnost je imalo 46/107 pacijenata sa SLE (31,5%) i 18/39 (46,1%) pacijenata sa izolovanim kutanim lupusom, ove 2 grupe se takođe nisu statistički značajno razlikovale (hi kvadrat test, $p=0,733$).

Niska aktivnost DNaze I je zabeležena i kod 6 od 67 pacijenata iz kontrolne grupe (8,9%).

Prosečna aktivnost DNaze I u serumu pacijenata sa LE je bila značajno niža nego kod zdravih osoba iz kontrolne grupe (t test, $p<0,001$). U prvoj grupi od 77 pacijenata sa SLE prosečna aktivnost DNaze I je bila $76,8\pm 11,5$ (opseg 72,7-91,7%/mL), a u njihovoj kontrolnoj grupi $84,3\pm 4,1$ %/mL (opseg 48,8-96,0 %/mL), dok je u drugoj grupi od 69 pacijenata sa CLE ona iznosila $47,2\pm 13,9$ %/mL (opseg 21,1-93,0 %/mL), a u njihovoj kontrolnoj grupi $61,0\pm 15,4$ %/mL (opseg 40,8-86,6 %/mL) (Grafikoni 1 i 2).

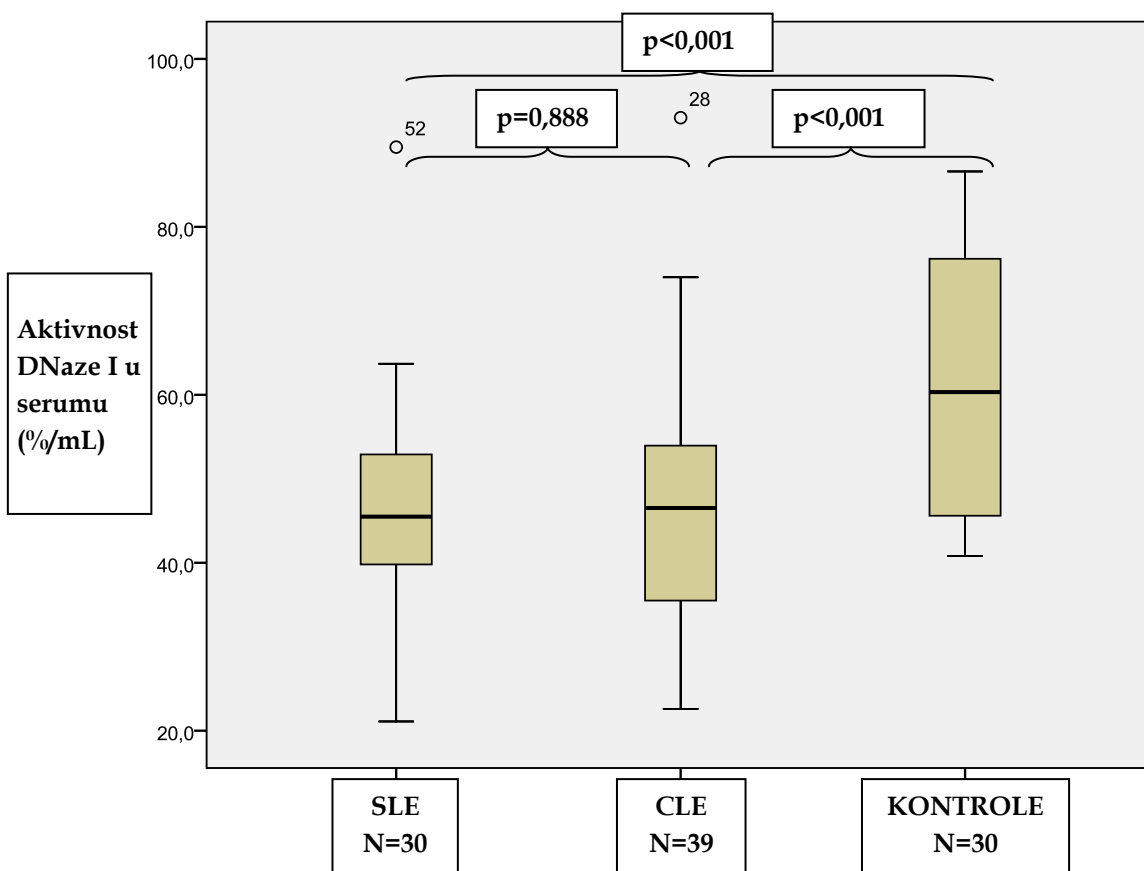


Grafikon 1. Razlika u aktivnost DNaze I u serumu kod 77 pacijenata sa SLE i 37 zdravih osoba



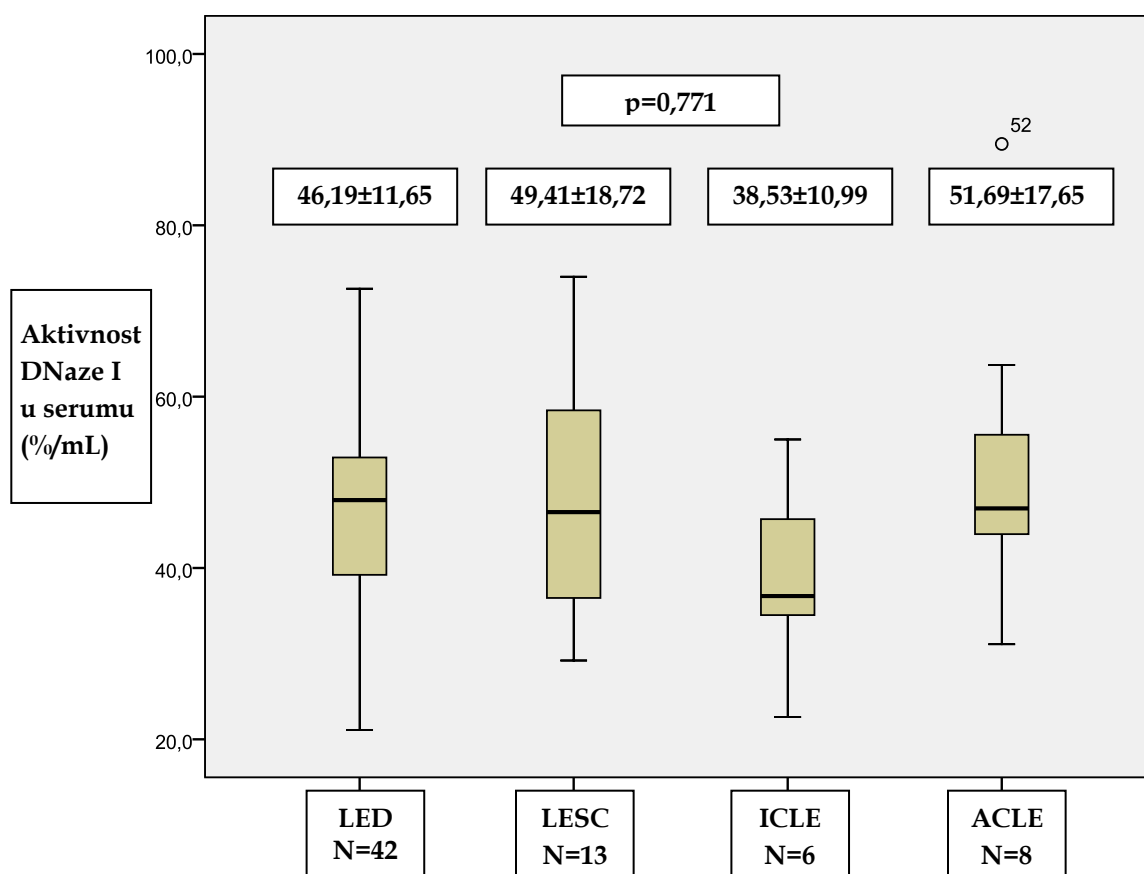
Grafikon 2. Razlika u aktivnost DNaze I u serumu kod 69 pacijenata sa LE i 30 zdravih osoba

Ukoliko se uporede pacijenti sa SLE i pacijenti sa izolovanim kutanim CLE sa zdravim osobama, uočava se da su obe grupe pacijenata imale statistički značajno nižu aktivnost DNaze I u odnosu na zdrave ($46,9 \pm 13,1$ %/mL kod pacijenata sa SLE i $47,4 \pm 14,7$ %/mL kod pacijenata sa izolovanim CLE, a kod zdravih kontrola $61,0 \pm 15,4$ %/mL), a da između 2 grupe pacijenata nije bilo statistički značajne razlike ($p < 0,001$, ANOVA sa *post hoc* analizom pomoću LSD testa za međugrupna poređenja) - grafikon 3.



Grafikon 3. Razlike u aktivnosti DNaze I u serumu između pacijenata sa SLE, pacijenata sa izolovanim kutanim LE i zdravih osoba

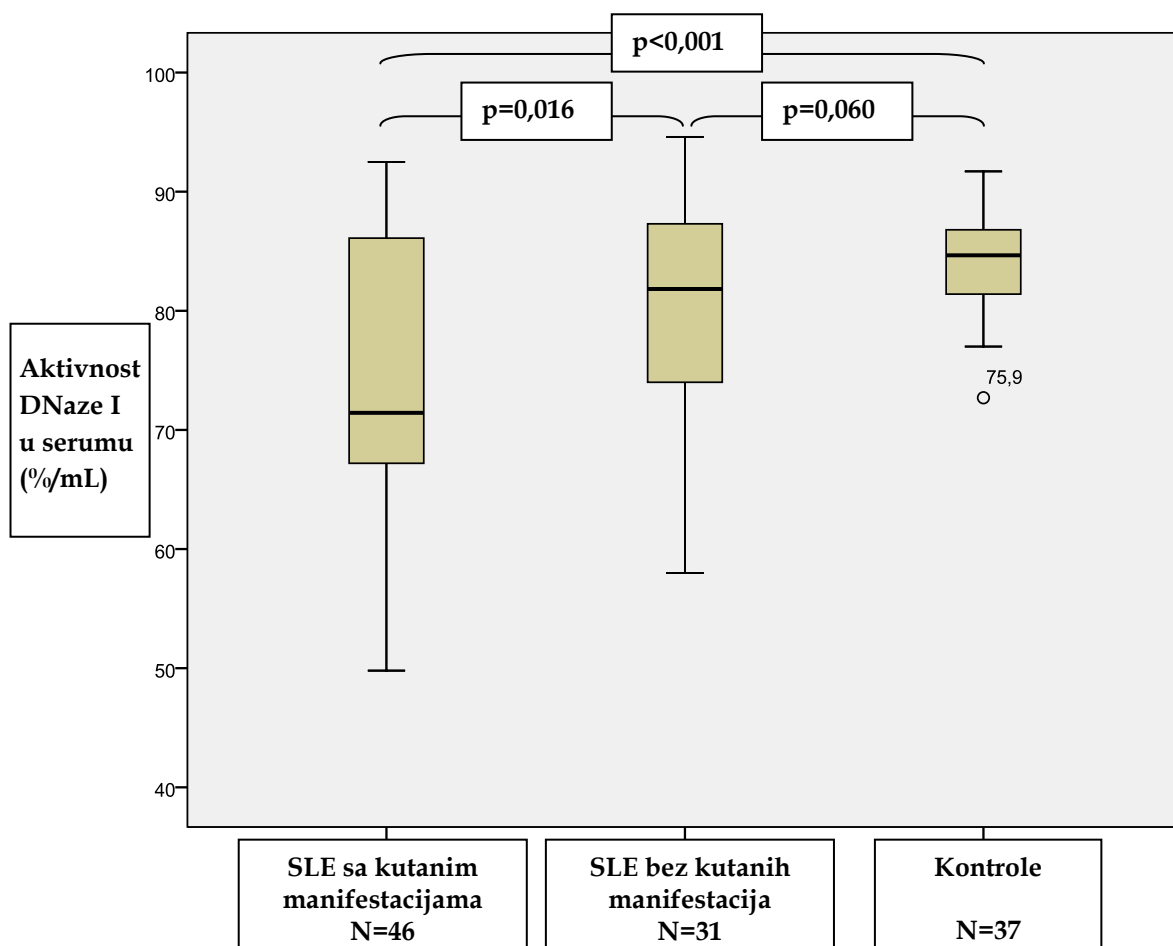
Razlika između pacijenata sa SLE i CLE u ovoj grupi ne postoji ni ukoliko se uporede proporcije pacijenata sa sniženom aktivnošću DNaze I u svakoj grupi (15/30 pacijenata sa SLE i 18/39 pacijenata sa CLE), $p=0,811$, hi-kvadrat test. Nadalje, nije nađena razlika u prosečnoj aktivnosti DNaze I u serumu između pacijenata sa različitim podtipovima CLE (ANOVA, $p=0,771$) - grafikon 4.



Grafikon 4. Aktivnost DNaze I u serumu kod pacijenata sa različitim podtipovima CLE

Sa druge strane, u prvoj grupi od 77 pacijenata sa SLE uočeno je da je prosečna aktivnost DNaze I u serumu kod 46 pacijenata sa kutanim manifestacijama ($74,5 \pm 12,1$ %/mL) značajno niža nego kod 31 pacijenta sa SLE bez kutanih manifestacija ($79,9 \pm 10,0$ %/mL, $p=0,016$), kao i da je niža u odnosu na aktivnost DNaze I kod zdravih ($84,3 \pm 4,1$ %/mL, $p<0,001$), ANOVA sa *post*

hoc analizom pomoću LSD testa za međugrupna poređenja - grafikon 5. Aktivnost DNaze I u serumu kod pacijenata sa SLE bez kutanih manifestacija i zdravih osoba se nije značajno razlikovala ($p=0,06$).



Grafikon 5. Razlike u aktivnosti DNaze I u serumu između pacijenata sa SLE sa kutanim manifestacijama i bez njih (u prvoj grupi od 77 pacijenata), kao i zdravih osoba

4.2.2. Aktivnost DNaze I i zahvatanje organa kod SLE

Kod 107 pacijenata sa SLE analizirano je da li aktivnost DNaze I ima uticaja na zahvatanje pojedinačnih organa, odnosno organskih sistema. Hi-kvadrat testom su poređene proporcije pacijenata sa niskom i normalnom aktivnošću DNaze I u odnosu na manifestacije određenih organa. Nađeno je da pacijenti sa niskom DNazom I u serumu imaju značajno češće specifične kutane lezije u poređenju sa pacijentima sa SLE i normalnom aktivnošću DNaze I, dok zahvatanje drugih organa/sistema nije imalo statističku vezu sa sniženjem DNaze I (Tabela 6).

Tabela 6. Aktivnost DNaze I u serumu i zahvatanje organa kod pacijenata sa SLE (N=107)

Organ/ sistem	Niska DNaza (N=46)	Normalna DNaza (N=61)	p(hi kvadrat)
Koža (%)	38 (82,6)	38 (62,3)	0,022
Zglobovi (%)	22 (47,8)	34 (55,7)	0,417
Bubrezi (%)	21 (45,7)	26 (42,6)	0,755
CNS (%)	6 (13,0)	3 (4,9)	0,134
Serozitis (%)	7 (15,2)	16 (26,2)	0,170
Hematološki (%)	22 (47,8)	37 (60,7)	0,187

4.2.3. Odnos aktivnosti DNaze I u serumu i indeksa aktivnosti bolesti

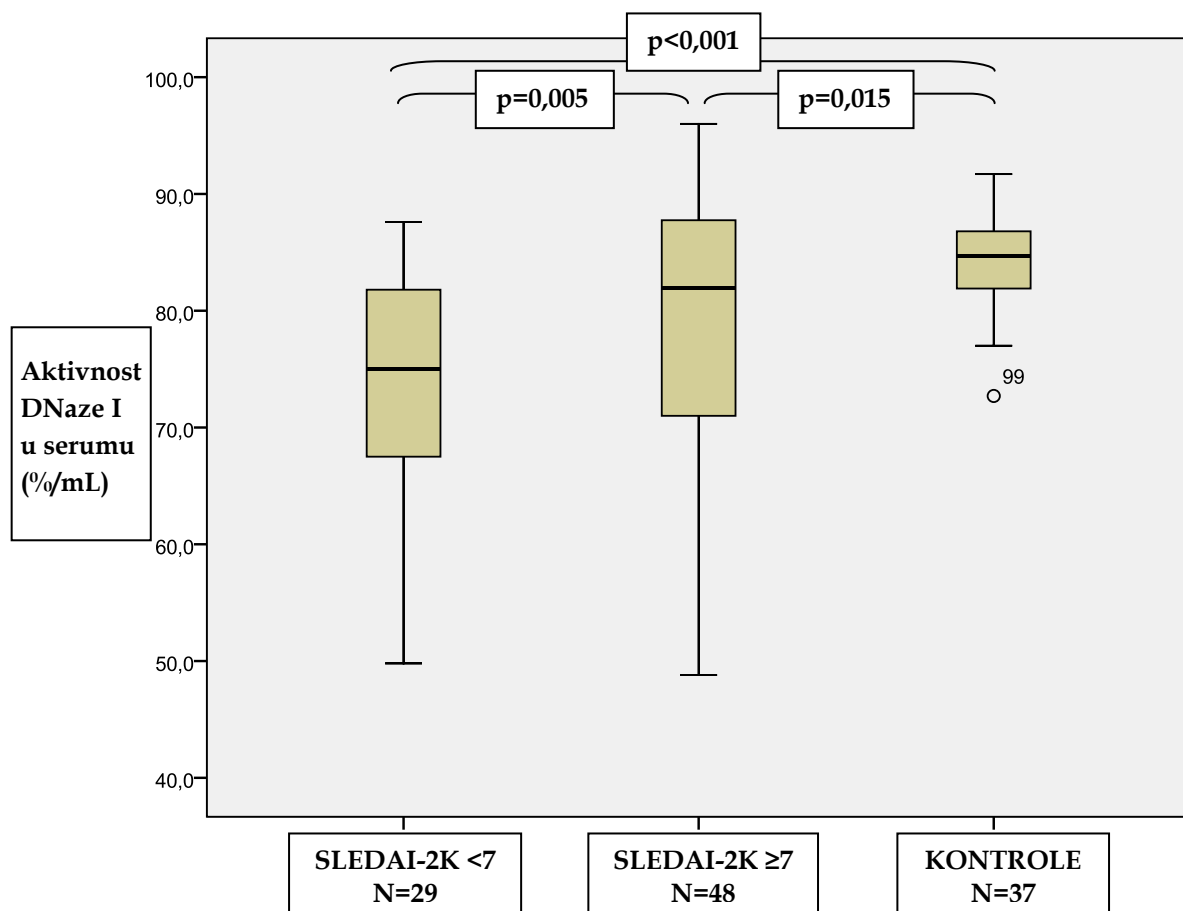
Kod 107 pacijenata sa SLE analizirali smo odnos aktivnosti DNaze I u serumu i aktivnosti bolesti merene SLEDAI-2K indeksom i ACR/SLICC indeksom oštećenja tkiva.

Prosečna vrednost SLEDAI-2K u grupi pacijenata sa SLE je iznosila 11,1±9,1 (opseg 0-41). Pacijenti su podeljeni u 2 grupe, zavisno od vrednosti SLEDAI-2K,

jednu grupu su činili pacijenti sa manje aktivnom bolešću, čiji je SLEDAI-2K<7, a drugu pacijenti sa umerenom do teškom bolešću, čiji je SLEDAI-2K ≥7.

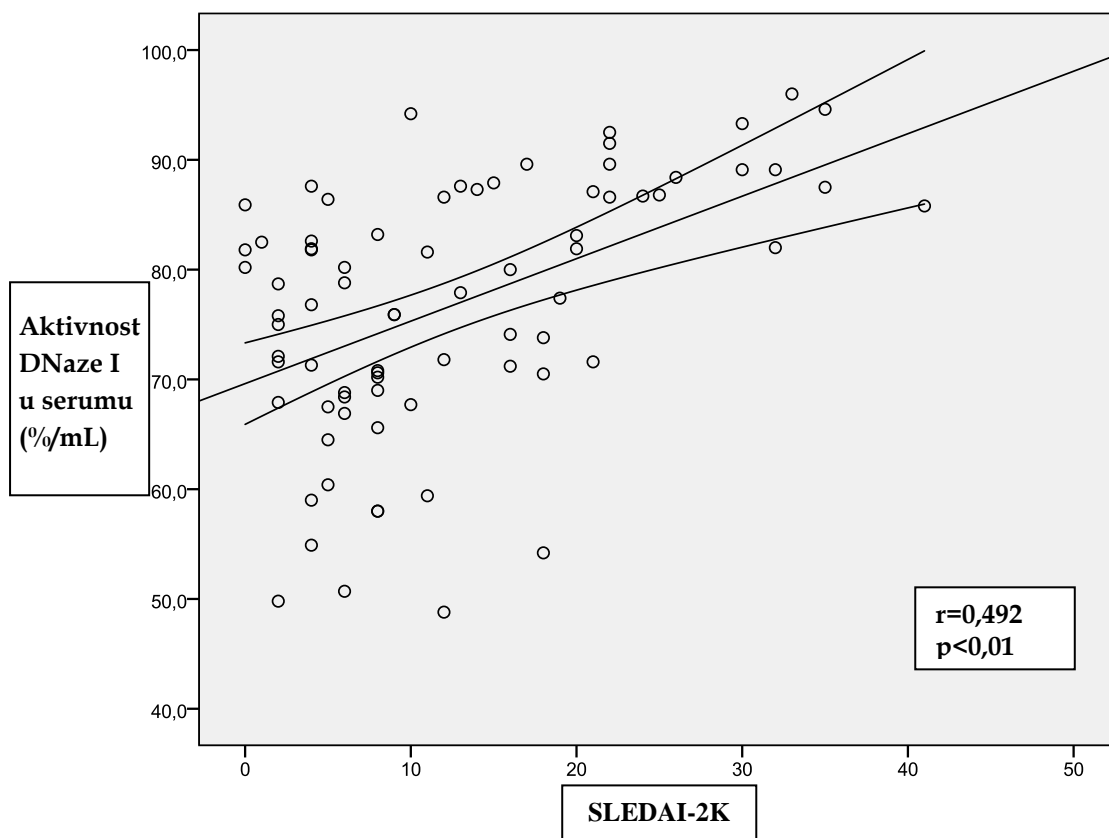
Poređenje aktivnosti DNaze I između grupa je vršeno posebno za grupu od 77 pacijenata sa SLE (prosečan SLEDAI-2K 12,6±10,0, opseg 0-41) i grupu sa 30 pacijenata sa SLE i predominantno kutanim manifestacijama (prosečan SLEDAI-2K 7,4±4,7, opseg 2-18), zbog različitih graničnih vrednosti za aktivnost DNaze I u ove dve grupe.

U prvoj grupi je bilo 48/77 (62,3%) pacijenata sa SLEDAI-2K ≥7 (prosečan SLEDAI-2K=18,0±8,8) i 29/77 (37,7%) pacijenata sa SLEDAI-2K <7 (prosečan SLEDAI-2K=3,5±2,0). Poredeći ove dve grupe međusobno i sa zdravim osobama iz kontrolne grupe, zaključili smo da je prosečna aktivnost DNaze I u grupi pacijenta sa aktivnijom bolešću veća nego kod pacijenata sa manje aktivnom bolešću (79,2±11,5 %/mL nasuprot 72,8±10,5 %/mL), mada obe prosečne vrednosti ne dostižu nivo zabeležen kod zdravih osoba (84,3±4,1%/mL). Sve 3 razlike su dostigle statističku značajnost (ANOVA, $p<0,001$, sa *post hoc* analizom pomoću LSD testa za međugrupna poređenja) - grafikon 6.



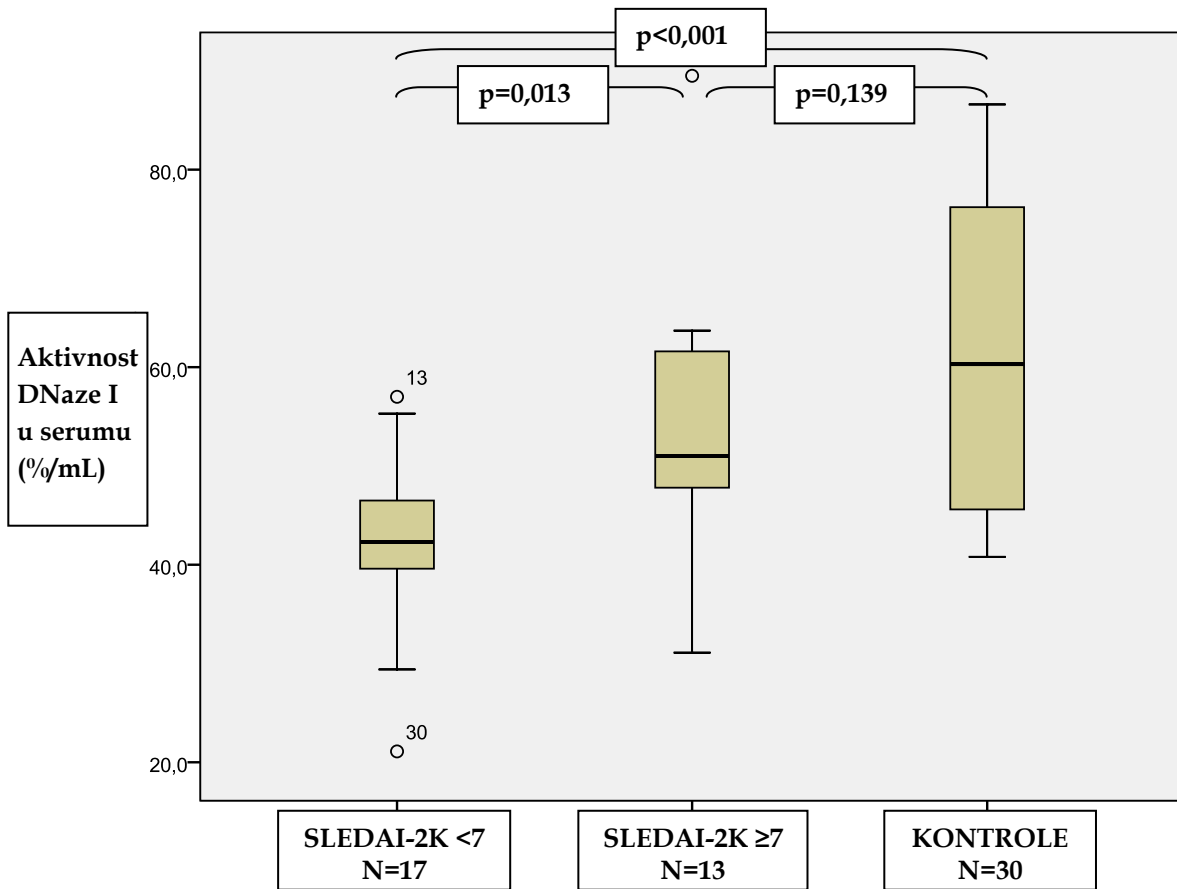
Grafikon 6. Razlika u aktivnosti DNaze I u serumu kod 77 pacijenata sa nisko i visoko aktivnim SLE i kontrola

Takođe, u ovoj grupi pacijenata je nađena pozitivna korelacija između SLEDAI-2K i aktivnosti DNaze I u serumu ($p < 0,01$, Pearson-ov koeficijent 0,492) - grafikon 7.



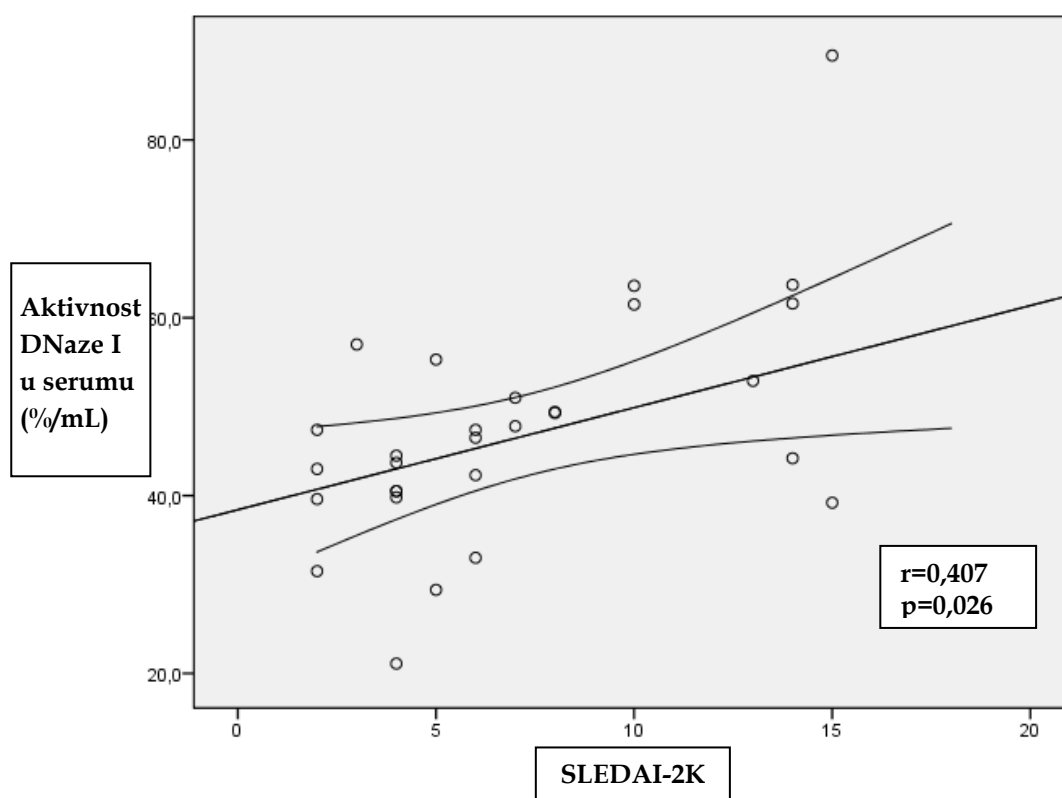
Grafikon 7. Korelacija između aktivnosti DNaze I u serumu i aktivnosti SLE merene SLEDAI-2K indeksom kod 77 pacijenata

U drugoj grupi je bilo 13/30 (43,3%) pacijenata sa SLEDAI-2K ≥ 7 (prosečan SLEDAI-2K=11,8 \pm 3,6) i 17/30 (56,7%) pacijenata sa SLEDAI-2K < 7 (prosečan SLEDAI-2K=4,1 \pm 1,5). Poredeći ove dve grupe međusobno i sa zdravim osobama iz kontrolne grupe, takođe smo zaključili da je prosečna aktivnost DNaze I u grupi pacijenata sa aktivnijom bolešću veća nego kod pacijenata sa manje aktivnom bolešću (54,2 \pm 14,4 %/mL nasuprot 41,3 \pm 9,0 %/mL), mada obe prosečne vrednosti ne dostižu nivo zabeležen kod zdravih osoba (61,0 \pm 15,4%/mL). Razlike između 2 grupe pacijenata, kao i između pacijenata sa nisko aktivnom bolešću i zdravih osoba su dostigle statističku značajnost (ANOVA, $p < 0,01$, sa *post hoc* analizom parova pomoću LSD testa za međugrupna poređenja) - grafikon 8.



Grafikon 8. Razlika u aktivnosti DNaze I u serumu kod 30 pacijenata sa manje i više aktivnim SLE i kontrola

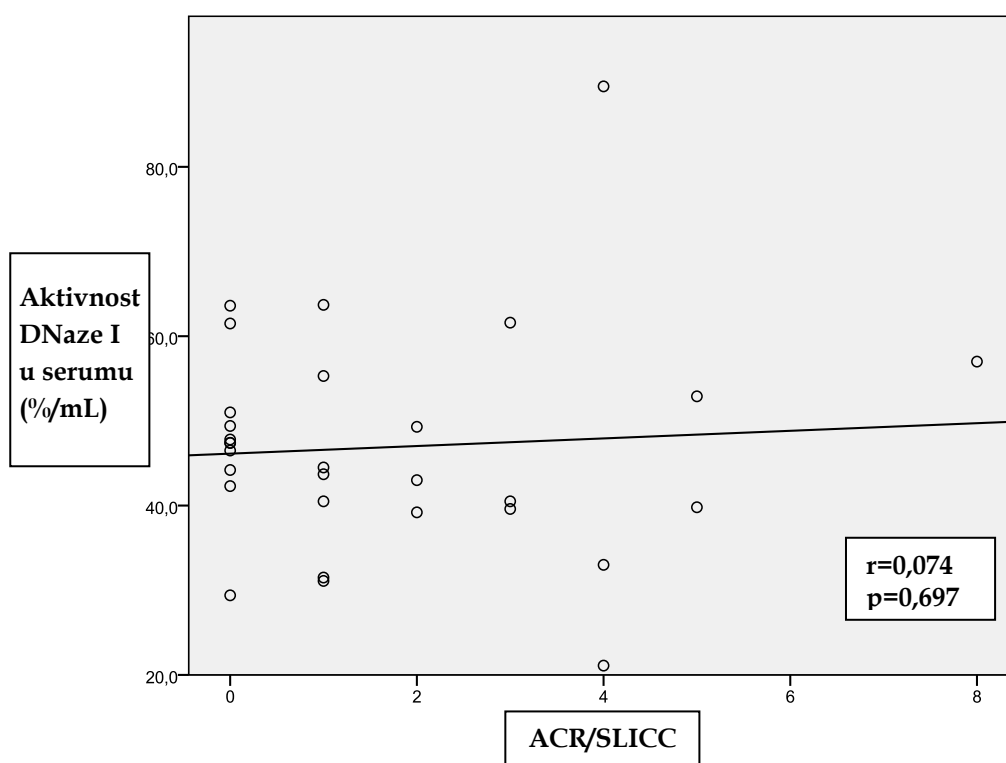
Takođe, i u ovoj grupi pacijenata je nađena pozitivna korelacija između SLEDAI-2K i aktivnosti DNaze I u serumu ($p=0,026$, Pearson-ov koeficijent $0,407$) - grafikon 9.



Grafikon 9. Korelacija između aktivnosti DNaze I u serumu i aktivnosti SLE merene SLEDAI-2K indeksom u drugoj grupi od 30 pacijenata

Dakle, u obe grupe pacijenata je nađena statistički značajna pozitivna korelacija aktivnosti DNaze I u serumu sa aktivnošću SLE izraženom SLEDAI-2K indeksom. Pozitivna korelacija je potvrđena i kada se uporede grupe pacijenata sa različitom aktivnošću SLE - pacijenti sa aktivnijim SLE imaju i višu aktivnost DNaze I u serumu, uz napomenu da prosečna vrednost aktivnosti DNaze I ne dostiže aktivnost zabeleženu kod zdravih osoba iz kontrolne grupe.

Sa druge strane, indeks oštećenja tkiva kod SLE - SLICC/ACR je izračunat kod 30 pacijenata sa SLE iz druge grupe i nije pokazao korelaciju sa vrednostima DNaze I u serumu ($p=0,697$, Pearsonov koeficijent 0,074) - grafikon 10.



Grafikon 10. Odnos aktivnosti DNaze I i ACR/SLICC indeksa oštećenja tkiva kod 30 pacijenata sa SLE

Korelacija aktivnosti DNaze I sa parametrima aktivnosti kutanog lupusa je urađena kod 69 pacijenata sa CLE kod kojih su bili dostupni detaljniji podaci o lokalizaciji i obimu zahvaćenosti kože, te je izračunat CLASI i RCLASI skor. Oba skora nose u sebi zasebne skorove aktivnosti oštećenja tkiva, i nijedan od elemenata ova 2 skora nije pokazao korelaciju sa aktivnošću DNaze I (Tabela 7).

Tabela 7. Odnos aktivnosti DNaze I sa indeksima aktivnosti CLE kod 69 pacijenata sa kutanim lupusom

Aktivnost Dnaze <i>vs.</i>	Pearson-ov koeficijent	p
CLASI A	0,099	0,419
CLASI D	-0,056	0,650
RCLASI A	0,155	0,204
RCLASI D	-0,105	0,390

4.2.4. Odnos aktivnosti DNaze I u serumu i biomarkera LE

Analiza odnosa aktivnosti DNaze I u serumu sa parametrima zapaljenja (SE, fibrinogen i CRP u serumu) je urađena kod svih 146 pacijenata.

Zbog različitih referentnih vrednosti za aktivnost DNaze I, anti-dsDNA antitela i druge imunoserološke parametre, pacijenti su bili podeljeni u dve grupe. U prvoj se nalazilo 77 pacijenata sa SLE kod kojih je aktivnost DNaze I određena reagensima iz prvog kompleta. Oni su generalno imali aktivniju bolest (prosečan SLEDAI-2K je iznosio $12,6 \pm 10,0$). U drugoj grupi je bilo 69 pacijenata sa CLE kod kojih je aktivnost DNaze I određena reagensima iz drugog kompleta i kod kojih je rađena analiza apoptoze u koži. Od njih je 30 imalo i kriterijume, uglavnom kutane i laboratorijske, za SLE. SLE je kod ovih pacijenata bio značajno manje aktivan (prosečan SLEDAI-2K je iznosio $7,4 \pm 4,7$) od pacijenata u prvoj grupi (t test nezavisnih uzoraka, $p=0,007$). Kod ovih pacijenata je, osim niske aktivnosti bolesti, zabeležena i vrlo niska učestalost prisustva ANA i ostalih antitela, te su korelacije između imunoseroloških parametara i aktivnosti DNaze I računane samo za prvu grupu od 77 pacijenata sa SLE. Prikaz osnovnih demografskih, kliničkih i laboratorijskih pokazatelja kod pacijenata iz ove grupe je dat u tabeli 8.

Tabela 8. Osnovni demografski, klinički i laboratorijski parametri kod 77 pacijenata sa SLE

Demografski i dijagnostički parametri	n = 77
Starost (godine): prosek ± SD ^a (opseg)	39,6±13,1 (20-76)
Pol: Ž/M	70/7
Novonastali SLE (%)	20 (26)
Prosečno trajanje SLE u godinama (opseg)	2,4 (0-10,5)
Zahvatanje organa	
Koža (%)	46 (59,7)
Zglobovi (%)	38 (49,3)
Bubrezi (%)	43 (55,8)
Neuropsihijatrijske manifestacije (%)	6 (7,8)
Serozitis (%)	21 (27,3)
Hematološki poremećaji (%)	42 (54,5)
Leukopenija (%)	26 (33,8)
Trombocitopenija (%)	18 (23,4)
Anemija, Coombs + (%)	18 (23,4)
Biomarkeri LE	
Povišena sedimentacija eritrocita (%)	56 (72,7)
Povišen fibrinogen (%)	49 (63,6)
Povišen CRP (%)	50 (64,9)
Povišena ANA (%)	75 (97,4)*
Povišena anti-dsDNA antitela (%)	64 (83,1)
Povišena anti-nukleozomalna antitela (%)	54 (70,1)
Povišena anti-histonska antitela (%)	43 (55,8)
Snižen C3 (%)	37 (48,0)
Snižen C4 (%)	16 (20,8)
Snižena aktivnost DNaze I u serumu	31 (40,3)

^aSD, standardna devijacija

* Dva pacijenta sa SLE i negativnim ANA su imali anti-Ro(SSA) antitela

4.2.4.1. Odnos aktivnosti DNaze I sa parametrima SE, fibrinogen i CRP u serumu

S obzirom da SE ima različite vrednosti kod muškaraca i žena, kao i pre i posle 50. godine života, da je vrednost CRP u serumu merena dvema metodama koje imaju različite referentne vrednosti, kao i da je u većini izdatih laboratorijskih nalaza povišena vrednost fibrinogena u serumu označena kao >3,7 bez konkretnih vrednosti, odnos aktivnosti DNaze I sa navedenim parametrima je procenjen hi-kvadrat testom. Grupe pacijenata sa sniženom i normalnom aktivnošću DNaze I u serumu se statistički nisu razlikovale po procentu pacijenata sa povišenim vrednostima SE, CRP i fibrinogena - tabela 9.

Tabela 9. Odnos aktivnosti DNaze I u serumu sa vrednostima SE, CRP i fibrinogena

Parametar	Niska DNaza I (N=64)	Normalna DNaza I (N=82)	p(hi kvadrat)
Povišena SE (%)	44 (68,8)	57 (69,5)	0,921 (p>0,05)
Povišen CRP (%)	27 (42,2)	43 (52,4)	0,219 (p>0,05)
Povišen fibrinogen (%)	32 (50,0)	52 (63,4)	0,104 (p>0,05)

4.2.4.2. Odnos aktivnosti DNaze I sa antitelima - markerima lupusa, kao i komponentama komplementa

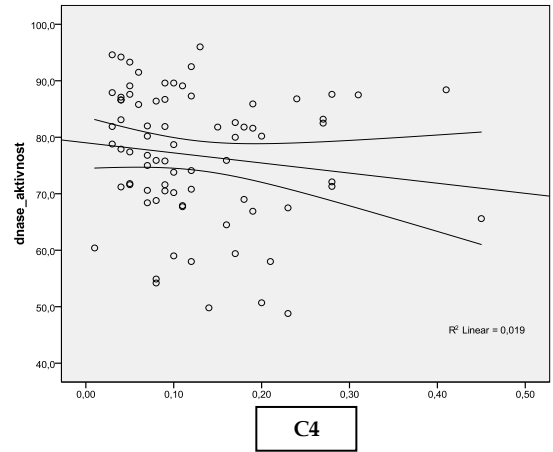
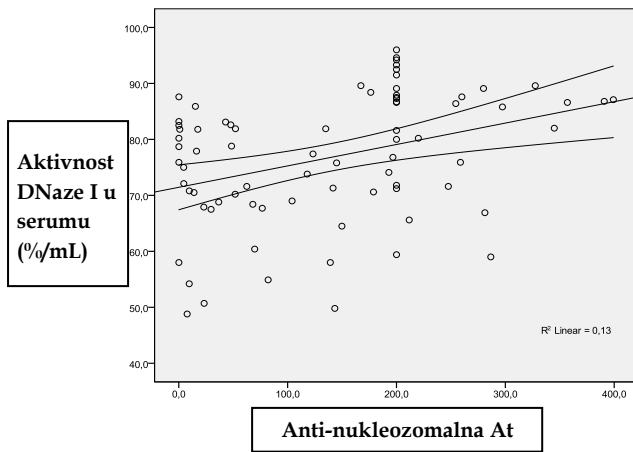
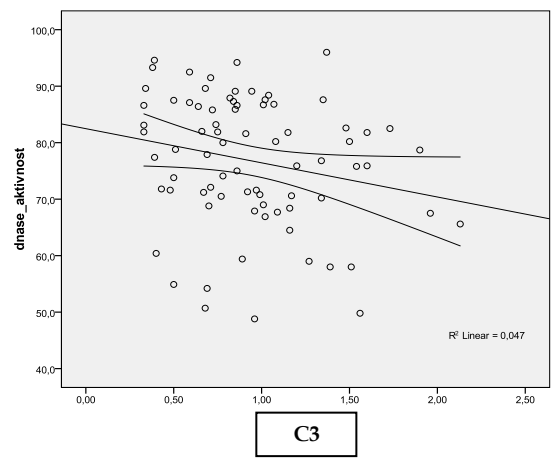
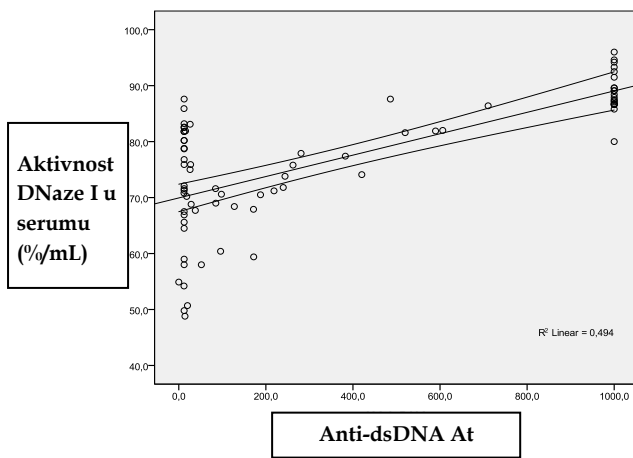
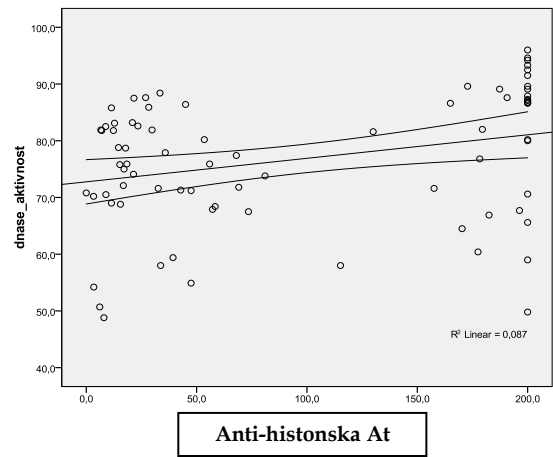
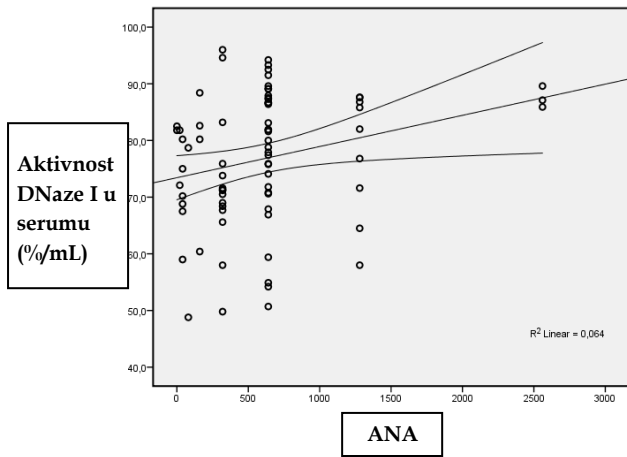
Ovaj odnos je procenjen na osnovu korelacije vrednosti pojedinačnih markera sa aktivnošću DNaze I i računanjem Pearson-ovog koeficijenta kod 77 pacijenata sa SLE iz prve grupe- tabela 10.

Tabela 10. Odnos aktivnosti DNaze I u serumu sa biomarkerima lupusa kod 77 pacijenata sa SLE

Aktivnost DNaze I vs.	Pearson-ov koeficijent	p
ANA titar	0,254	0,026
Anti-dsDNA At	0,703	<0,001
Anti-nukleozomalna At	0,361	0,001
Anti-histonska At	0,295	0,009
C3	-0,217	0,058
C4	-0,138	0,232

At, antitela

Dobijene su statistički značajne pozitivne korelacije, sa različitim vrednostima Pearson-ovog koeficijenta, između aktivnosti DNaze I u serumu i nivoa ANA, anti-dsDNA, anti-nukleozomalnih i anti-histonskih antitela. Nije nađena značajna korelacija između aktivnosti DNaze I i koncentracije komponenti komplementa C3 i C4 - grafikon 11.



Grafikon 11. Korelacija aktivnosti DNaze I sa biomarkerima lupusa kod prve grupe od 77 pacijenata sa SLE

Na kraju, da bi se bolje sagledalo mesto aktivnosti DNaze I u odnosu na druge biomarkere lupusa, urađena je komparacija korelacije SLEDAI-2K sa DNazom I i ostalim biomarkerima SLE - tabela 11.

Tabela 11. Korelacija SLEDAI-2K sa različitim imunoserološkim parametrima kod pacijenata sa SLE (N=77)

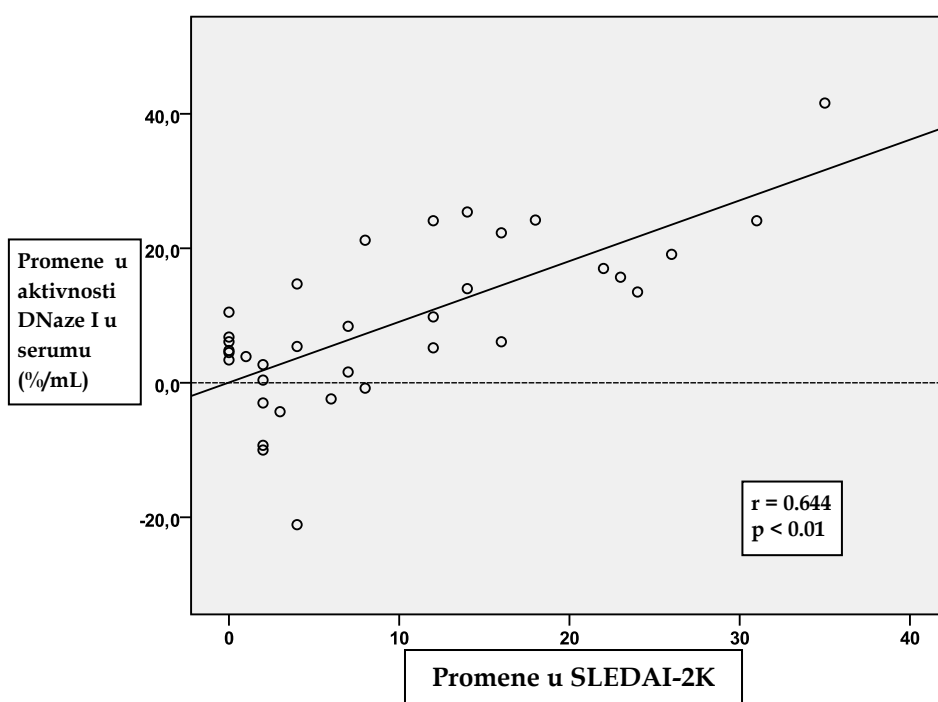
SLEDAI-2K vs.	Pearson-ov koeficijent	p
Aktivnost DNaze I	0,492	<0,001
ANA titar	0,303	0,001
Anti-dsDNA At	0,602	<0,001
Anti-nukleozomalna At	0,546	<0,001
Anti-histonska At	0,386	<0,001
C3	-0,427	<0,01
C4	-0,208	0,031

At, antitela

S obzirom da su nađene različite vrednosti Pearsonov-og koeficijenta i različite p-vrednosti, urađena je multipla regresiona analiza koja je pokazala da su u ovoj grupi pacijenata biomarkeri koji su najjače bili povezani sa SLEDAI-2K bili visok nivo anti-dsDNA antitela ($p < 0,001$) i niska koncentracija C3 ($p < 0,01$).

4.2.5. Podaci o praćenju 35 pacijenata sa SLE

Od 77 pacijenata sa SLE iz prve grupe, njih 35 je praćeno (32 žene i 3 muškarca), u proseku 5.6 ± 2.8 meseci (opseg 3-12 meseci). Analizom parnih uzoraka seruma nađeno je da postoji pozitivna korelacija između promena u aktivnosti DNaze I u serumu i promena u SLEDAI-2K indeksu. Korelacija je bila visoko statistički aktivna ($p < 0,01$) sa Spearman-ovim koeficijentom 0,644 - grafikon 12.



Grafikon 12. Korelacija između razlike u aktivnosti SLE (merene razlikom u SLEDAI-2K skor) i razlike u aktivnosti DNaze I u serumu tokom praćenja 35 pacijenata

Da bi se procenila važnost ovog nalaza, urađena je ista analiza i za ostale imunoserološke markere SLE koji su praćeni - tabela 12. Podaci iz tabele 12 pokazuju da promene u SLEDAI-2K jače koreliraju sa promenama aktivnosti

DNaze I u serumu nego sa promenama titra ANA ili nivoa anti-nukleozomalnih i anti-histonskih antitela.

Tabela 12. Korelacija između promena u SLEDAI-2K skoru i promena u vrednostima imunoseroloških parametara kod 35 pacijenata sa SLE

Promene u SLEDAI-2K skoru <i>vs.</i> promene u vrednosti	Spearman-ov <i>rho</i>	p
Aktivnosti DNaze I	0.644	<0.01
ANA	0.385	<0.05
Anti-dsDNA At	0.680	<0.01
Anti-nukleozomalna At	0.558	<0.01
Anti-histonska At	0.460	<0.01
C3	-0.267	>0.05
C4	-0.154	>0.05

At, antitela

Od 35 praćenih pacijenata, kod 7 je zabeležen neočekivan pad aktivnosti DNaze I tokom aktivacije SLE (Grafikon 12, deo ispod isprekidane linije). Kod ovih pacijenata zabeležen je i nepovoljan odgovor na standardnu terapiju, koji je rezultirao u povećanju doze postojećih i uvođenju novih imunosupresiva.

4.3. STEPEN APOPTOZE U KOŽI

Stepen apoptoze u koži, odnosno apoptotski indeks je meren kod 69 pacijenata sa kutanim lupusom, od kojih je 30 imalo SLE, a 39 njih je imalo izolovani CLE. Indeks apoptoze je meren kod svih pacijenata paralelno u 2 bioptata kože. Jedan bioptat je pripadao leziji, koja je po pravilu bila u fotoekspaniranoj regiji kože i u njemu je izvođen i DIF test, kao i histopatološka analiza na osnovu koje je i postavljena dijagnoza kutanog lupusa. Drugi bioptat kože je uziman sa klinički neizmenjene, fotoprotektovane kože glutealnog regiona i u njemu je izveden i LBT.

4.3.1. Demografski podaci, klinički, imunološki i serološki parametri bolesti

Osnovni demografski podaci, klinički i imunoserološki parametri lupusa kod 69 pacijenata sa kutanim LE kod kojih je ispitivana apoptoza u koži su prikazani u tabeli 13. Od ovih 69 pacijenata, hronični lupus je imalo 39 pacijenata, subakutni - 12, akutni 7, a intermitentni 6 pacijenata; 4 pacijenta je imalo istovremeno prisutne znakove akutnog i hroničnog lupusa u momentu uzimanja biopsije, a jedan pacijent znakove akutnog i subakutnog lupusa, prilikom računanja indeksa apoptoze u pojedinim podtipovima lupusa svi ovi pacijenti su ubrajani u akutni CLE.

Tabela 13. Osnovni demografski i dijagnostički parametri kod 69 pacijenata sa CLE kod kojih je ispitivan nivo apoptoze u koži

Demografski i dijagnostički parametar	n = 69
Starost (godine): prosek ± SD ^a (opseg)	47,5±13,9 (16-78)
Pol: Ž/M	16/53
Prosečno trajanje CLE u godinama (opseg)	6,1 (0-30)
Sistemska terapija u vreme uzimanja uzoraka*	
Kortikosteroidi, %	13 (21,7)
Antimalarici, %	22 (36,7)
Bez sistemske terapije, %	42 (70,0)
Biomarkeri LE	
Povišena sedimentacija eritrocita (%)	46 (65,2)
Povišen fibrinogen (%)	35 (50,7)
Povišen C-reaktivni protein (%)	20 (29,0)
ANA (%)	35 (50,7)
Anti-dsDNA antitela (%)	14 (20,3)
Anti-nukleozomalna antitela (%)	28 (40,6)
Anti-histonska antitela (%)	1 (1,4)
Snižen C3 (%)	19 (27,5)
Snižen C4 (%)	14 (20,3)

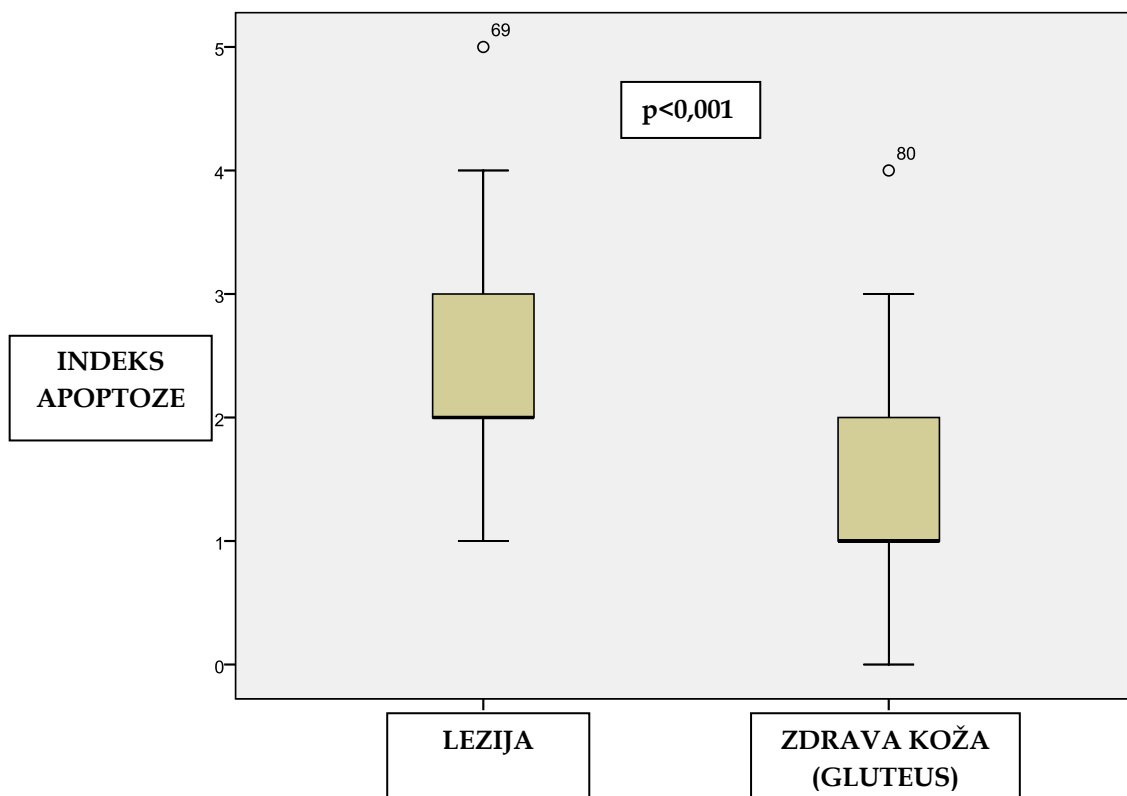
^aSD, standardna devijacija;

* 9 pacijenata je primalo i antimalarik i kortikosteroid

4.3.2. Razlika u indeksu apoptoze u koži između lezije i zdrave kože

Prosečan apoptotski indeks u leziji je bio značajno viši i iznosio $2,49 \pm 0,88$, dok je u zdravoj koži on iznosio $1,36 \pm 0,92$ (t test, $p < 0,001$) - grafikon 13.

Od 69 pacijenata, njih 48 je imalo veći apoptotski indeks u koži lezije, a kod 21 je on bio isti ili manji nego u zdravoj koži. Od tih 21 pacijenata, 8 (38,1%) je imalo SLE, učestalost SLE se nije razlikovala od one zabeležene u prvoj grupi ($22/48 = 45,8\%$), hi kvadrat test, $p = 0,606$.

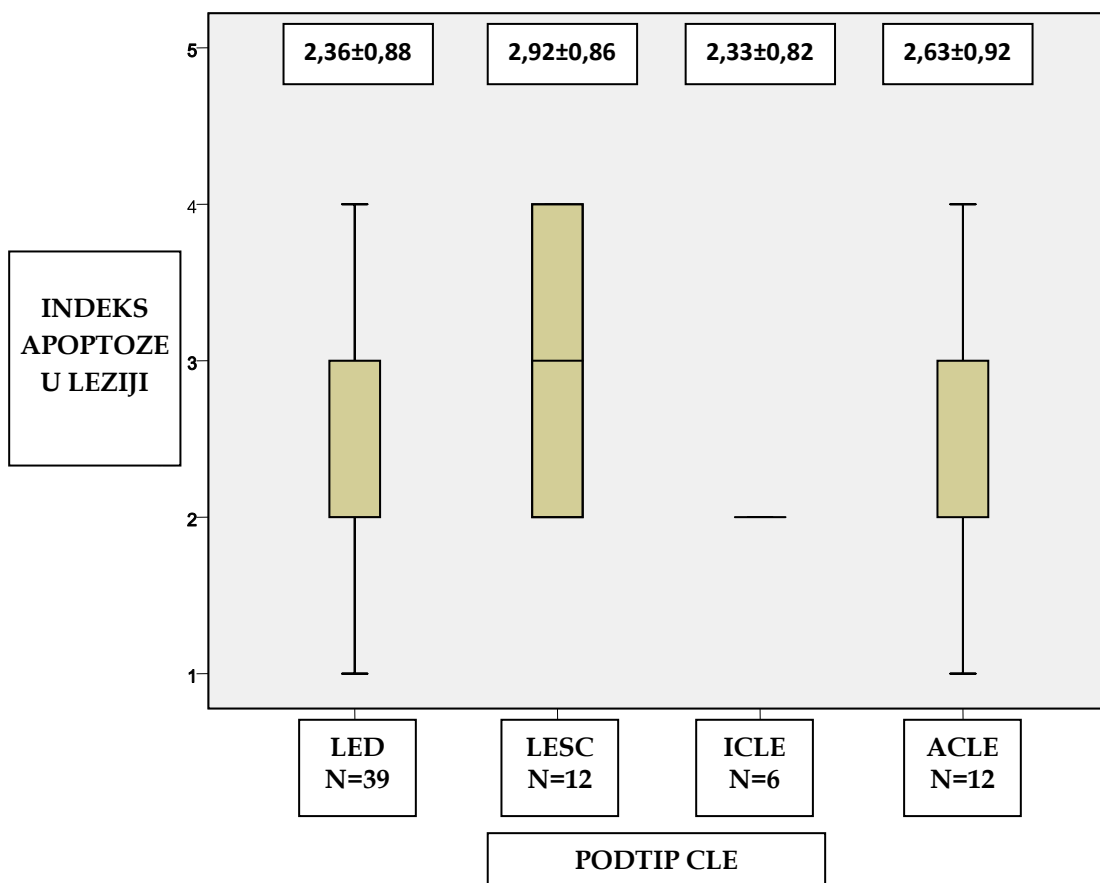


Grafikon 13. Razlika u indeksu apoptoze merenom u koži lezije i klinički zdravoj, fotoprotektovanoj koži gluteusa kod 69 pacijenata sa CLE

4.3.3. Odnos stepena apoptoze u koži između različitih podgrupa pacijenata sa LE

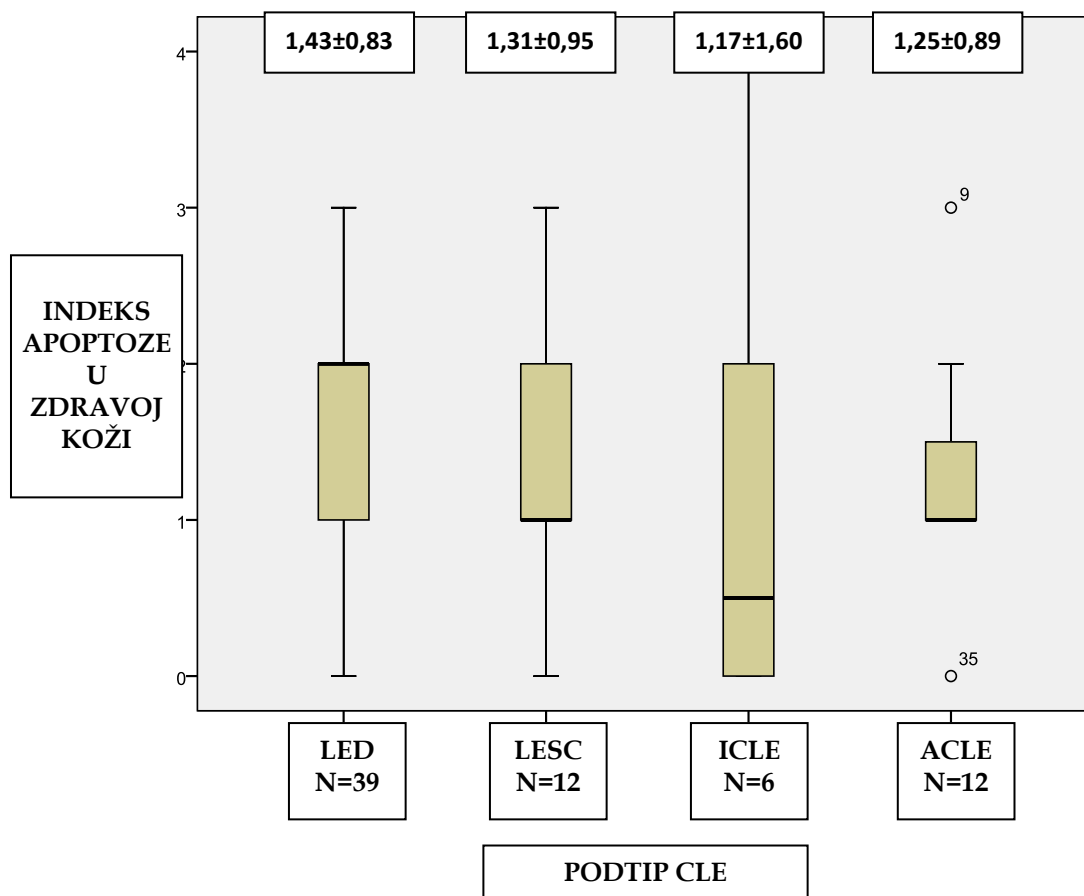
Pacijenti koji su imali kutani lupus i kriterijume za SLE su imali apoptotske indekse u leziji $2,40 \pm 0,86$ i u zdravoj koži $1,30 \pm 0,79$, dok su pacijenti sa izolovanim kutanim LE imali nešto više indekse, $2,56 \pm 0,91$ i $1,41 \pm 1,02$, ali bez statističke značajnosti (t test, $p=0,449$ i $p=0,626$).

Nalaz apoptotskog indeksa u leziji kod pacijenata sa različitim vrstama CLE je dat u grafikonu 14. Apoptotski indeks je bio nešto veći kod akutnijih oblika kutanog lupusa, SCLE i ACLE, ali bez statistički značajne razlike (ANOVA). Međutim, kada se LSD testom porede parovi podtipova CLE, dolazi se do nalaza da je indeks apoptoze u leziji kod SCLE značajno veći nego kod DLE ($p=0,046$).



Grafikon 14. Apoptotski indeks u lezijama kod različitih tipova kutanog lupusa (N=69)

Ista analiza je urađena i kada je u pitanju apoptotski indeks u zdravoj koži - grafikon 15. Nije bilo značajne razlike između različitih tipova kutanog lupusa (ANOVA, $p=0,16$).



Grafikon 15. Apoptotski indeks u zdravoj koži kod različitih tipova kutanog lupusa (N=69)

4.3.4. Odnos indeksa apoptoze sa indeksima aktivnosti lupusa

Ispitana je korelacija apoptotskih indeksa u leziji i zdravoj koži sa indeksima aktivnosti bolesti, tabela 14. Nađena je značajna pozitivna korelacija između AI u leziji sa indeksima CLASI A i RCLASI D, dok ostale korelacije nisu dostigle statističku značajnost.

Tabela 14. Odnos apoptotskog indeksa sa indeksima aktivnosti bolesti kod pacijenata sa kutanim lupusom

AI vs.	Lezija		Zdrava koža	
	Pearsonov koeficijent	p	Pearsonov koeficijent	p
CLASI A	0,253	0,036 (p<0,05)	-0,038	0,759
CLASI D	0,144	0,238	0,008	0,949
RCLASI A	0,083	0,497	-0,224	0,065
RCLASI D	0,297	0,013 (p<0,05)	0,064	0,600

SLEDAI-2K (N=30)	0,080	0,676	0,088	0,645
ACR/SLICC (N=30)	0,042	0,825	-0,023	0,905

AI, apoptotski indeks

Kod 30 pacijenata sa SLE poređena je vrednost AI između pacijenata sa niskom (SLEDAI-2K <7) i visokom aktivnom bolešću (SLEDAI-2K ≥7) i nije nađena razlika između ove 2 grupe pacijenata ni u AI u kutanim lezijama niti u AI u fotoprotektovanoj zdravoj koži (hi kvadrat test).

4.3.5. Odnos stepena apoptoze u koži sa imunoserološkim parametrima LE

Nije nađena korelacija stepena apoptoze u leziji i zdravoj koži (bilo da je izražen apoptotskim indeksom ili procentom apoptotičnih ćelija) ni sa jednim opštim markerom inflamacije (SE, CRP, fibrinogen), niti sa imunoserološkim parametrom LE (C3, C4, ANA, anti dsDNA antitela, anti nukleozomalna antitela, antihistonska antitela) - tabela 15.

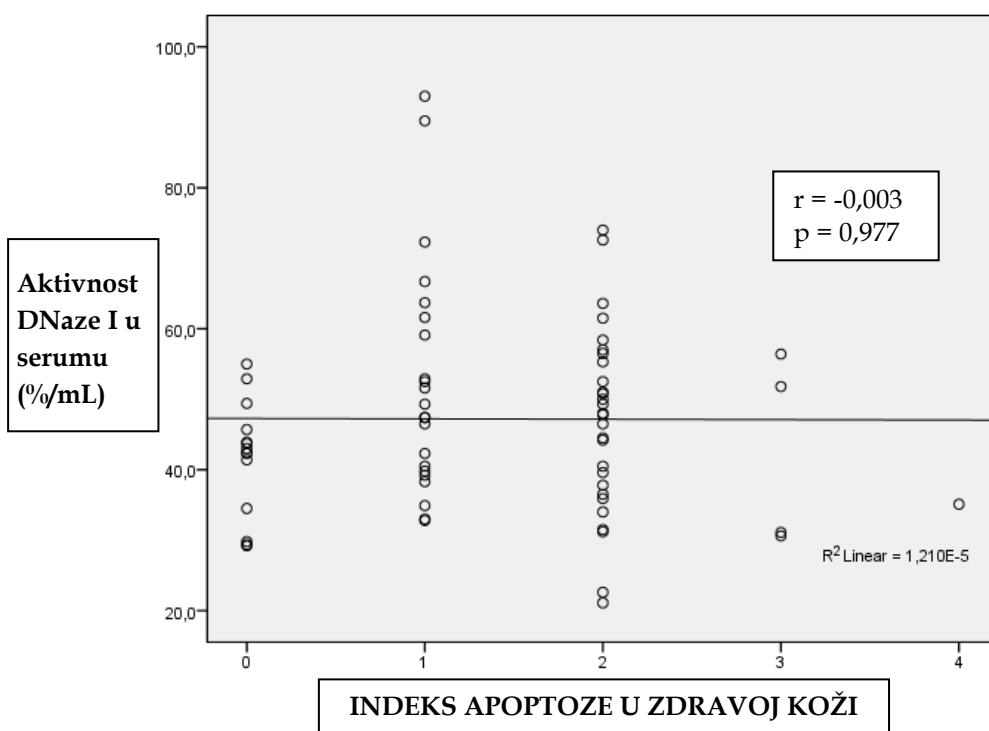
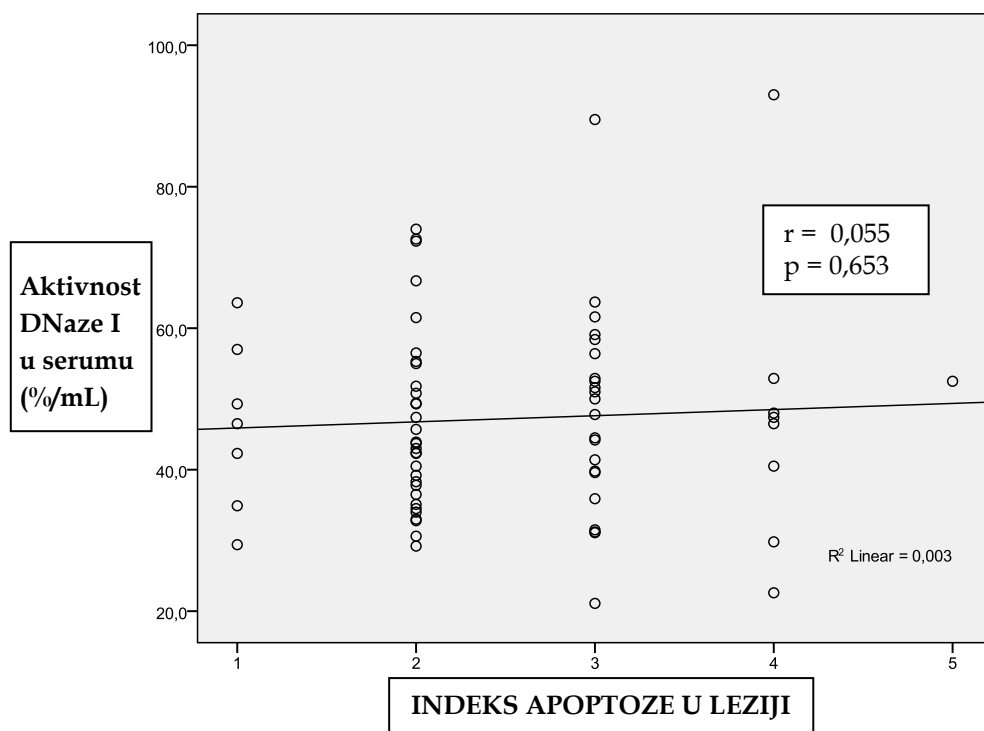
Tabela 15. Odnos apoptotskog indeksa sa biomarkerima LE

AI vs.	Lezija		Zdrava koža	
	Pearson-ov koeficijent	p	Pearson-ov koeficijent	p
SE	0,148	0,223	-0,005	0,969
CRP	-0,059	0,633	0,056	0,647
Fibrinogen	-0,017	0,887	-0,043	0,728
ANA	-0,206	0,090	0,077	0,531
Anti dsDNA	-0,041	0,738	0,005	0,969
Anti-nukleozom	-0,145	0,235	-0,112	0,361
Anti-histon	0,028	0,818	-0,088	0,473
C3	-0,064	0,601	0,076	0,533
C4	-0,121	0,323	0,047	0,702

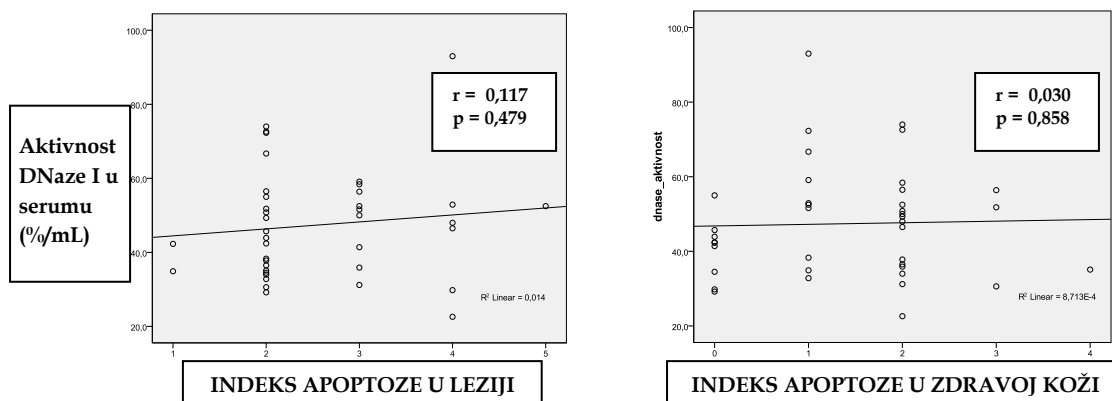
AI, apoptotski indeks

4.3.6. Odnos aktivnosti DNaze I u serumu sa stepenom apoptoze

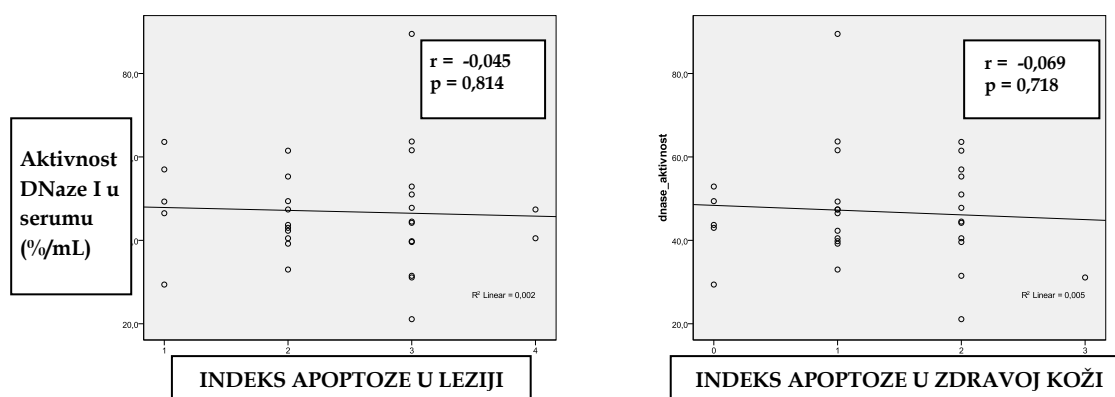
Sniženu aktivnost DNaze I u serumu je imalo 33/69 (47,8%) pacijenata. Statistička analiza je pokazala da ne postoji korelacija između stepena apoptoze u koži lezije i zdravoj fotoprotektovanoj koži, i aktivnosti DNaze I u serumu, bilo da je on izražen procentom apoptotičnih ćelija ili apoptotskim indeksom - grafikon 16. Takođe, ukoliko se razdvoje pacijenti sa izolovanim CLE od pacijenata koji imaju CLE i kriterijume za SLE, ne uočava se korelacija između stepena apoptoze u koži lezije i zdravoj fotoprotektovanoj koži, i aktivnosti DNaze I u serumu, ni u jednoj novoformiranoj grupi - grafikoni 17 i 18.



Grafikon 16. Odnos aktivnosti DNaze I u serumu sa apoptotskim indeksom u koži lezije i zdravoj koži gluteusa (N=69)



Grafikon 17. Odnos aktivnosti DNaze I u serumu sa apoptotskim indeksom u koži lezije i zdravoj koži gluteusa kod 39 pacijenata sa izolovanim CLE



Grafikon 18. Odnos aktivnosti DNaze I u serumu sa apoptotskim indeksom u koži lezije i zdravoj koži gluteusa kod 30 pacijenata sa CLE i kriterijumima za SLE

4.3.7. Nalazi DIF testa i njihov odnos sa stepenom apoptoze i aktivnošću DNaze I u serumu

DIF test sa lezije je bio pozitivan kod 38/69 pacijenata (55,1%). Vrednost apoptotskog indeksa izračunata u istoj leziji se statistički nije razlikovala između pacijenata sa pozitivnim DIF testom ($2,47 \pm 1,01$) u odnosu na DIF negativne pacijente ($2,48 \pm 0,96$) - t test nezavisnih uzoraka, $p=0,966$. Razlika nije

postojala ni među pacijentima sa izolovanim CLE niti među pacijentima sa CLE i kriterijumima za SLE - tabela 16.

Od 69 pacijenata sa CLE, njih 10 (14,5%) je imalo pozitivan LBT sa zdrave kože gluteusa. Apoptotski indeks sa istog mesta se nije statistički razlikovao kod ovih pacijenata ($1,40 \pm 1,17$) u odnosu na 51 pacijenta kod kog je LBT bio negativan ($1,39 \pm 0,89$) - t test nezavisnih uzoraka, $p=0,975$. Isti test je urađen posebno za grupu pacijenata sa izolovanim CLE i pacijente sa CLE i SLE i nije nađena razlika u apoptotskim indeksima ni u jednoj grupi pacijenata - tabela 16.

Tabela 16. Razlike u apoptotskom indeksu između pacijenata sa pozitivnim i negativnim DIF/LBT

Broj pacijenata	Broj pacijenata (prosečan AI u leziji)			Broj pacijenata (prosečan AI u zdravoj koži)		
	DIF pozitivni	DIF negativni	P	LBT pozitivni	LBT negativni	P
Izolovani CLE (N=39)	16 ($2,69 \pm 1,01$)	23 ($2,48 \pm 0,85$)	0,504	5 ($1,60 \pm 1,52$)	34 ($1,38 \pm 0,95$)	0,769
CLE+SLE (N=30)	22 ($2,27 \pm 0,83$)	8 ($2,75 \pm 0,89$)	0,210	5 ($1,20 \pm 0,84$)	25 ($1,32 \pm 0,80$)	0,779
UKUPNO (N=69)	38 ($2,47 \pm 1,01$)	31 ($2,48 \pm 0,96$)	0,966	10 ($1,40 \pm 1,17$)	51 ($1,39 \pm 0,89$)	0,975

Takođe, aktivnost DNaze I se nije značajno razlikovala između pacijenata koji su imali pozitivan i negativan DIF test (t test nezavisnih uzoraka, $p=0,191$), odnosno između pacijenata koji su imali pozitivan i negativan LBT (t test nezavisnih uzoraka, $p=0,407$).

4.4. ODNOS AKTIVNOSTI DNAZE I U SERUMU I UČESTALOSTI KUTANIH LEZIJA

Logističkom regresijom je kod 146 pacijenata sa LE dokazano da pacijenti koji imaju sniženu aktivnost DNaze I u serumu imaju 2,9 puta veću šansu da

razviju kutane lezije nego pacijenti sa normalnim nivoom DNaze I u serumu (95% CI za RR iznosi 1,2-7,0).

4.5. KORELACIJA SLEDAI I CLASI/RCLASI SA KOMBINACIJOM NISKE AKTIVNOSTI DNAZE I U SERUMU I VEĆE APOPTOZE U KOŽI

Uzimajući iz literature (258) granične vrednosti za apoptotski indeks u leziji od 1 (5%) i referentne granične vrednosti za aktivnost DNaze I u serumu, formirane su sledeće 4 grupe pacijenata:

I - pacijenti sa normalnom aktivnošću DNaze I u serumu i normalnim indeksom apoptoze,

II - pacijenti sa normalnom aktivnošću DNaze I u serumu i povišenim indeksom apoptoze,

III - pacijenti sa sniženom aktivnošću DNaze I u serumu i normalnim indeksom apoptoze, i

IV - pacijenti sa sniženom aktivnošću DNaze I u serumu i povišenim indeksom apoptoze

Kod ove 4 grupe pacijenata izvršeno je međusobno poređenje aktivnosti SLE merene SLEDAI-2K skorom i aktivnosti CLE merene CLASI i RCLASI skorovima (ANOVA sa *post hoc* analizom pomoću LSD i t testa) i nađeno je da se značajno razlikuju pacijenti koji imaju normalnu aktivnost DNaze I u serumu i normalan indeks apoptoze (grupa I) od svih drugih grupa (II, III ili IV) u CLASI A indeksu, odnosno da je ovaj indeks značajno niži u I grupi pacijenata u odnosu na ostale grupe ($p=0,017$). Grupe se nisu međusobno statistički značajno razlikovale u ostalim indeksima aktivnosti bolesti.

5. DISKUSIJA

LE je kompleksno autoimunsko oboljenje koje ima složenu patogenezu i heterogenu kliničku sliku. Brojni faktori - genetski, hormonski, imunski poremećaji (imunski kompleksi, autoantitela, autoreaktivni limfociti, dendritične ćelije), kao i faktori sredine dovode do nastanka lezija kod lupusa. Među faktorima sredine se ističe UV zračenje kao faktor koji pogoršava ne samo kutani, već i sistemski lupus, i koje različitim mehanizmima dovodi do oštećenja i inflamacije kože, ali, putem indukcije apoptoze, i stvaranja proinflamatornog miljea i različitih autoantitela (3).

Poremećaj apoptoze ili smanjeno uklanjanje apoptotičnih ćelija od strane fagocita kod lupusa dovodi do povećane izloženosti apoptotičnih nukleozoma imunskom sistemu. Nukleozomi koji uspeju da izbegnu to uklanjanje postaju modifikovani tokom procesa apoptoze, a ove modifikacije dovode do stvaranja epitopa na koje imunski sistem nije razvio toleranciju, što dalje dovodi do poremećaja balansa između tolerancije i autoimunosti tako da se formiraju T ćelije specifične za nukleozome, a potom i anti-nukleozomalna, anti-histonska i anti-DNK antitela.

Klinička slika LE se, osim izrazite heterogenosti (mogu biti pogođena skoro sva tkiva i organi), karakteriše i različitom težinom, odnosno obimim zahvaćenosti organa kod različitih pacijenata, kao i tokom sa remisijama i egzacerbacijama. Zbog izrazite genetske heterogenosti, razlika u toku bolesti između polova, različitog profila autoantitela i različitog intenziteta zahvaćenosti organa, jedan broj autora danas smatra da LE zapravo predstavlja grupu oboljenja. Drugi autori opet imaju stav da, i pored različitih kliničkih slika, pacijenti sa LE još uvek imaju dovoljno sličnosti u patogenezi da i dalje može da se tvrdi da se radi o jednoj bolesti. Istina je po pravilu u sredini, te je sve više autora koji lupus smatraju ne jedinstvenom bolešću, već jedinstvenim sindromom, koji po definiciji obuhvata grupu simptoma i znakova koji se javljaju zajedno i sugerišu određenu abnormalnost (259).

Takođe, iz istih razloga, teško je proceniti aktivnost LE kao bolesti, a u nekim slučajevima čak i obim zahvaćenosti pojedinih organa. Proizvodnja autoantitela, deponovanje imunskih kompleksa i aktivacija komplementa su glavni imunski događaji u LE. Kod pacijenata sa SLE je opisano preko 100 različitih autoantitela (71), ali ni za jedno od njih se ne može reći da je toliko specifično za LE da je samo po sebi dovoljno za postavljanje dijagnoze. Postoji velika potreba za novim biomarkerima lupusa, koji bi označili susceptibilnost za razvoj SLE, pomogli u postavljanju dijagnoze i praćenju toka bolesti i bili povezani sa zahvatanjem pojedinih organa. U poslednjih nekoliko godina se pojavilo nekoliko desetina kandidata za nove biomarkere LE, među kojima i DNaza I, odnosno nivo njene aktivnosti u serumu (260).

Slično SLE, etiopatogeneza kutanog lupusa je takođe multifaktorijelna i nedovoljno razjašnjena. Ovde je značaj UV zračenja u stvaranju i razvoju promena još veći u odnosu na SLE; do sada je identifikovano više mehanizama kojima UV zraci dovode do pojave lezija na koži (100-111), među kojima je svakako najvažnija indukcija apoptoze keratinocita. Kutani lupus ima različite kliničke prezentacije, a pojedini podtipovi se, osim po izgledu lezija na koži, značajno razlikuju i po verovatnoći razvoja sistemskih lezija, odnosno SLE. Premda je u prethodnih 50 godina u literaturi objavljen veliki broj radova koji razmatra ovu temu i iako su identifikovani neki faktori rizika za tranziciju iz izolovanog CLE u SLE (95) - prisustvo diseminovanog DLE, promene na noktima i zglobovima, citopenije, visoka sedimentacija eritrocita i visok titar ANA, ne postoje jasni biomarkeri rizika za razvoj oštećenja drugih organa i organskih sistema kod pacijenata sa CLE, odnosno rizika za razvoj SLE.

Osnovni demografski podaci

Prosečna starost ispitanika u studijskoj populaciji je iznosila $41,6 \pm 13,9$ godina, a odnos žena i muškaraca je bio 4,84:1. Ovi podaci se slažu sa podacima

iz literature koje navode da je lupus prvenstveno oboljenje žena u generativnom periodu (14,17,19,20,21).

Uloga DNaze I u razvoju lupusa

Proizvodnja antitela protiv delova jedra je jedna od glavnih osobina SLE. Čelije koje umiru predstavljaju glavni rezervoar nukleozoma koji se stvaraju nakon cepanja hromatina koji vrše enzimi nukleaze (261). U fiziološkim uslovima fagociti efikasno uklanjaju apoptotične ćelije i na taj način preveniraju oslobađanje intracelularnih komponenti na koje se nije razvila tolerancija i koje su potencijalno opasne po tkiva. Poremećaji apoptoze, kao i uklanjanja apoptotičnih ćelija predstavljaju važan korak u razvoju autoimunskih bolesti, među kojima i SLE (171, 175). Hromatin, koji se oslobađa zbog neadekvatnog uklanjanja mrtvih ćelija, biva razgrađen dejstvom DNaze I koja je glavna nukleaza u serumu (210, 224, 228, 229). Niska aktivnost ovog enzima može da dovede do insuficijentne fragmentacije hromatina, njegove modifikacije i stvaranja neoepitopa, što je osnov za produkciju spektra antihromatinskih autoantitela.

Aktivnost DNaze I je niža kod pacijenta sa lupusom nego kod zdravih

U ovoj studiji, kao i u našoj prethodnoj (234), dokazano je da je aktivnost DNaze I u serumu niža kod pacijenata sa SLE nego kod zdravih osoba iz kontrolne grupe. Takođe, u ovoj studiji je pokazano i da pacijenti sa izolovanim CLE imaju značajno nižu aktivnost DNaze I u serumu od zdravih osoba i da se ta aktivnost ne razlikuje statistički od aktivnosti DNaze I kod pacijenata sa SLE. Pacijenti sa različitim podtipovima CLE su imali sličnu aktivnost DNaze I u serumu.

Chitrabamrung i saradnici su 1981. godine otkrili da je aktivnost DNaze I u serumu pacijenata sa SLE niska, što je i u kasnijim studijama potvrđeno (195, 227, 231-234). U studiji na 276 pacijenata sa SLE i 368 zdravih osoba nađeno je

da je aktivnost DNaze I u serumu značajno smanjena kod bolesnika sa SLE, kao i da osobe sa polimorfizmom pojedinačnog nukleotida za Gln244Arg imaju veće rizik za razvoj SLE (235). Macanović i saradnici (229) su objavili da je prosečna koncentracija DNaze I u serumu miševa sa lupusom (NZB/NZW hibridni soj) niža nego kod zdravih miševa. Napirei i saradnici (228) su u laboratorijskim uslovima generisali miša čija je DNaza I deficijentna i dokazali da ove životinje pokazuju klasične simptome SLE.

Za sada ne postoji potpuno jasno objašnjenje uzroka ovog fenomena. Yasutomo sa saradnicima (237) je opisao 2 pacijenta sa SLE koji su imali heterozigotnu *nonsense* mutaciju u egzonu 2 gena za DNazu I, smanjenu aktivnost DNaze I u serumu i visoke titrove anti-nukleozomalnih antitela. Međutim, učestalost ove mutacije među pacijentima sa SLE je niska (238, 239, 241). Nadalje, u literaturi postoje suprotstavljeni stavovi u vezi sa prisustvom specifičnog inhibitora odgovornog za smanjenje aktivnosti DNaze I u serumu pacijenata sa SLE. Sa jedne strane, Lazarides and Lindberg su identifikovali aktin kao inhibitor DNase I koji je osetljiv na toplotu (207), a nađeno je i da je visok nivo ovog inhibitora povezan sa prisustvom ANA (262). Međutim, uticaj ovog inhibitora na aktivnost DNaze I nije dokazan u drugim studijama (227, 241). Na kraju, Yeh i saradnici (243) su opisali prisustvo antitela koji inhibiraju DNazu I u serumu pacijenata sa SLE, ali ova antitela su verovatnije uključena u progresiju bolesti, nego u njeno započinjanje.

Aktivnost DNaze I se ne razlikuje među polovima

Martinez-Valle sa saradnicima (231) je našao da je aktivnost DNaze I viša kod zdravih žena nego kod muškaraca. Pokušao je to da objasni hipotezom da žene imaju veću stopu apoptoze od muškaraca, te da im je zbog toga potrebna veća količina DNaze I. Drugi autori su takođe primetili da žene mogu imati veće količine cirkulišuće DNK, posebno u stresnim situacijama (263, 264), verovatno zbog poremećaja funkcije makrofaga. Maličkova i saradnici (252)

nisu našli ovu razliku, ali su ustanovili da žene sa SLE (i inflamatornom bolešću creva) imaju značajno nižu aktivnost DNaze I u serumu od muškaraca. Međutim, drugi autori, kao ni mi, nisu našli razliku u aktivnosti DNaze I među polovima, kako među zdravim osobama, tako ni među pacijentima sa LE.

Aktivnost DNaze I u serumu je u pozitivnoj korelaciji sa SLEDAI-2K

U ovoj studiji je nađeno da je aktivnosti DNaze I u serumu i aktivnost SLE (merena indeksom SLEDAI-2K) pozitivno koreliraju. Nalaz je potvrđen u obe grupe pacijenata sa SLE, a takođe je nađeno da pacijenti sa aktivnijom bolešću (SLEDAI-2K \geq 7) imaju značajno višu aktivnost DNaze I nego pacijenti sa bolešću niske aktivnosti (SLEDAI-2K $<$ 7). Aktivnost DNaze I u ovim grupama pacijenata nije dostigla vrednosti zabeležene kod zdravih osoba iz kontrolne grupe.

Odnos aktivnosti DNaze I u serumu i aktivnosti SLE koja je u ovoj studiji opisana, nije nađena u prethodnim studijama. Martinez-Valle i saradnici (231) su imali grupu od 66 pacijenata sa SLE, a Sallai i saradnici (232) su imali grupu od 113 pacijenata sa SLE; ni jedna ni druga grupa autora nije našla korelaciju između aktivnosti DNaze I i SLEDAI skora. Osim toga, u studiji Martinez-Valle (231) pacijenti koji su imali SLEDAI \leq 4 i SLEDAI $>$ 4 se nisu razlikovali u aktivnosti DNaze I. U ovoj studiji je korišćena granična vrednost SLEDAI-2K od 7 (258), i to može biti izvor neslaganja između navedena 2 rada. Nadalje, Martinez-Valle sa saradnicima (233) je kod 45 pacijenata sa SLE nefritisom našao da nije bilo razlike u aktivnosti DNaze I u uzorcima uzetim u vreme aktivne bubrežne bolesti i u fazi remisije. Međutim, kada se upare uzorci istog pacijenta, aktivnost DNaze I je bila niža kada su pacijenti imali aktivnu bubrežnu bolest nego kada je ona bila u remisiji.

Opservacija da pacijenti sa višim SLEDAI-2K indeksom imaju i višu aktivnost DNaze I (koja ne dostiže vrednosti zabeležene kod zdravih osoba) registrovana u ovoj studiji može delovati kotradiktorno, međutim, ona može biti i posledica reaktivnog povećanja aktivnosti DNaze I u prisustvu povećane

količine nuklearnog debrisa koji je nađen u serumu pacijenata sa SLE (265).

Povećanje aktivnosti DNaze I ne mora nužno da odražava povećanje samog enzima, jer i neke druge komponente seruma, kao što je laktoferin, mogu pokazivati DNaznu aktivnost (266), a takođe, u serumu pacijenata sa SLE i drugim autoimunskim bolestima su nađena i antitela sa katalitičkim osobinama - abzimi, koji mogu da hidrolizuju DNK (267). Abzimi bi mogli pripadati i grupi anti-DNK antitela i njihova povećana koncentracija ili aktivnost bi mogla pratiti povećanje anti-dsDNA antitela i aktivnosti SLE. Ovo bi moglo objasniti i naš nalaz da postoji korelacija između aktivnosti DNaze I i koncentracije anti-dsDNA antitela. U našoj prethodnoj studiji (234) je nađeno da se pozitivna korelacija između aktivnosti DNaze I i aktivnosti SLE zadržava i tokom praćenja pacijenata, na osnovu čega je pretpostavljeno da povećanje aktivnosti DNaze I može biti jedan od odbrambenih mehanizama zbog visoke količine DNK koja se stvara kod pacijenata sa SLE (265), te da identifikacija pacijenata koji smanje ili ne povećaju aktivnost DNaze I tokom aktivacije SLE može biti od značaja u planiranju terapijske strategije.

Aktivnost DNaze I u serumu ne korelira sa indeksom oštećenja SLE i indeksima aktivnosti i oštećenja CLE

Za razliku od korelacije sa SLEDAI-2K, u ovom radu nije nađena korelacija sa indeksom oštećenja tkiva kod SLE - SLICC/ACR indeksom. Korelacija aktivnosti DNaze I u serumu sa indeksima oštećenja tkiva kod pacijenata sa SLE nije do sada publikovana u literaturi. Moguće objašnjenje izostanka korelacije u ovom slučaju prvenstveno leži u činjenici da se indeks oštećenja tkiva kod SLE značajno razlikuje od indeksa aktivnosti bolesti, jer meri oštećenje prisutno u prethodnih 6 meseci. Za razliku od indeksa aktivnosti koji se odnose samo na aktivan lupus, oštećenje tkiva može biti rezultat kako same bolesti, tako i neželjenih efekata lekova ili prisustva komorbiditeta, tako da vrednosti skorova aktivnosti bolesti i oštećenja tkiva ne koreliraju (87).

SLICC/ACR indeksi su kod naših pacijenata generalno bili niski, a uz to, samo oštećenje tkiva (nastalo u prethodnih 6 meseci) ne mora nužno da označava aktivnost apoptotske mašinerije u datom momentu, te ne mora da korelira ni sa aktivnošću DNaze I.

Slično navedenom, nije nađena korelacija aktivnosti DNaze I u serumu i indeksa aktivnosti i oštećenja kože kod CLE. Ni ova korelacija do sada nije publikovana u literaturi. S obzirom da sa CLASI i RCLASI indeksi odnose na kliničke parametre inflamacije koja se viđa kod CLE, kao i na njegove posledice, a da aktivnost DNaze I kao enzima prvenstveno odražava nivo cirkulišućeg nuklearnog debrisa, jasno je da aktivnost ovog enzima ne mora nužno da prati klinički vidljive posledice aktivnosti kutane bolesti.

Odnos aktivnosti DNaze I sa imunoserološkim parametrima lupusa

U literaturi postoji vrlo ograničen broj informacija koje se tiču odnosa aktivnosti DNaze I kod pacijenata sa lupusom i biomarkera LE. Sve studije su rađene na manjem broju pacijenata sa SLE i istovremeno je, uz analizu odnosa sa imunoserološkim parametrima, rađena i procena odnosa aktivnosti DNaze I sa aktivnošću SLE i manifestacijama pojedinih organa, naročito bubrega. Tako je u radu Sallai i saradnika (232) nađeno da su pacijenti sa SLE imali nižu aktivnost DNaze I od zdravih kao i veće količine antinukleozomalnih antitela. Serumi sa visokom koncentracijom ovih antitela su imali i nisku aktivnost DNaze I, odnosno aktivnost DNaze I u serumu je negativno korelirala sa logaritamskom vrednošću koncentracije anti-nukleozomalnih antitela. SLEDAI i prisustvo bubrežne lezije nisu imali uticaja na aktivnost DNaze i titar antinukleozomalnih antitela. Sa druge strane, Martinez-Valle i saradnici (231) nisu, kod 66 pacijenata sa SLE, našli povezanost između aktivnosti DNaze I i zahvatanja pojedinačnih organa (kliničkog i/ili laboratorijskog - proteinurije). Pacijenti koji su imali nižu koncentraciju komponenti komplementa C3 i C4 i pacijenti koji su imali prisutna antitela u serumu karakteristična za SLE (anti-DNA, anti-Sm, anti-RNP, anti-Ro, anti-La, antikardiolipinska antitela, lupus

antikoagulans) se nisu razlikovali po aktivnosti DNaze I od pacijenata koji su imali normalne koncentracije komponenti komplementa i pacijenata koji nisu imali navedena antitela u serumu. U svom drugom radu isti autor (233) je našao da nema razlike u aktivnosti DNaze I u uzorcima pozitivnim i negativnim na antiDNK antitela, odnosno uzorcima sa normalnim i niskim vrednostima C3 i C4.

U ovom radu je nađena statistički značajna pozitivna korelacija između aktivnosti DNaze I u serumu i nivoa ANA, anti-dsDNA, anti-nukleozomalnih i anti-histonskih antitela. Nije nađena značajna korelacija između aktivnosti DNaze I i koncentracije komponenti komplementa C3 i C4.

Razlog za prisustvo razlike u rezultatima u odnosu na podatke iz literature možda leži u razlici u veličini uzoraka, kao i u činjenici da je aktivnost DNaze I u serumu merena različitim tehnikama (prethodni autori su uglavnom koristili metod enzimske radijalne difuzije, a u ovom radu je korišćen noviji ELISA test). Nadalje, razlike u aktivnosti DNaze I koja je zabeležena u prethodnim radovima može biti posledica različitog izvora supstrata za DNazu I. Naime, DNK iz različitih izvora može sadržati različite količine određenih konformacionih oblika DNK, a poznato je da DNaza najbrže razgrađuje DNK u B obliku (211, 268).

Premda je nađena korelacija aktivnosti DNaze I u serumu sa SLEDAI-2K kao markerom aktivnosti SLE, nije nađena relevantna korelacija između aktivnosti DNaze I u serumu i nivoa opštih markera zapaljenja - SE, CRP i fibrinogena u serumu. Ovaj podatak ne predstavlja veliko iznenađenje jer navedeni markeri, iako je u nekim od prethodnih studijama registrovano da su povišeni kod pacijenata sa SLE i to aktivnijim formama (269), nisu ni senzitivni niti specifični za SLE, a takođe ne ulaze u sastav SLEDAI-2K skora.

Mesto DNaze I među biomarkerima lupusa

Biomarker je, po definiciji, parametar (genetski, biološki, biohemijski, molekularni, imidžing) čije promene koreliraju sa patogeneom ili

manifestacijama neke bolesti i koji se može evaluirati u laboratoriji kvalitativno i/ili kvantitativno (260). Ovako široka definicija, uz heterogenost LE kao oboljenja, jasno onemogućava izbor samo jednog ili malog broja markera koji bi označili sve važne patogenetske faktore i sve važne kliničke manifestacije LE. Zbog toga kod LE postoji veliki broj markera, a postoji i još veći broj kandidata za biomarkere susceptibilnosti, aktivnosti i kliničkih manifestacija SLE (260).

Dobar biomarker mora da bude patofiziološki relevantan, jednostavan za određivanje u rutinskoj praksi i mora precizno i senzitivno da odgovara na promene u aktivnosti bolesti (260).

Uloga snižene aktivnosti DNaze I u serumu kod pacijenata sa SLE je pokazana kako u ovoj, tako i u prethodnim studijama (225-227, 231-235). Nadalje, ELISA metod, kao rutinski metod u laboratorijskoj praksi, omogućava jednostavno i jeftino određivanje ovog parametra u svakodnevnom radu. Na kraju, u ovom radu smo pokazali da aktivnost DNaze I u serumu značajno korelira sa aktivnošću SLE izraženom SLEDAI-2K indeksom.

Da bi se bolje sagledalo mesto DNaze I među ostalim, poznatim biomarkerima lupusa, izvršena je korelacija svih ovih markera sa SLEDAI-2K indeksom i poređenje odgovarajućih Pearson-ovih koeficijenata (koji pokazuju jačinu korelacije) - tabela 11. S obzirom na različite nivoe statističke značajnosti korelacija, urađena je multipla regresiona analiza koja je pokazala da su u ovoj grupi pacijenata biomarkeri koji su najjače bili povezani sa SLEDAI-2K bili nivo anti-dsDNA i koncentracija C3. Vrednost Pearson-ovog koeficijenta za aktivnost DNaze I je bila manja samo od koeficijenta korelacije za anti-dsDNA i anti-nukleozomalna antitela kod prve grupe pacijenata sa SLE. Navedeni podaci čine aktivnost DNaze I u serumu značajnim kandidatom za biomarker aktivnosti LE.

Apoptoza u koži pacijenata sa LE

Apoptoza je uključena u određivanje sudbine ćelije - njene smrti i preživljavanja. Okidači apoptoze su brojni signali, a proces je kontrolisan i regulisan različitim ćelijskim signalnim putevima. Značaj apoptoze indukovane UV zracima za razvoj i perpetuaciju kutanog i sistemskog lupusa je naglašen u većem broju radova.

Odavno je poznata činjenica da UVB izaziva apoptozu i nalete lupusa (181). Chung i saradnici (199) su, koristeći TUNEL metodu, dokazali ekstenzivnu apoptozu u skoro čitavom epidermu pacijenata sa kutanim LE, sa izuzetkom LE profundusa. Slični nalazi su viđeni i kod pacijenata sa dermatomiozitisom, ali ne i sklerodermijom. Autori su našli da koža sa kutanim LE, osim LE profundusa, pokazuje značajno povećanje Ki-67- i p53-pozitivnih keratinocita, koji su uglavnom locirani u bazalnom sloju epiderma i folikula, kao i drastičan pad broja bcl-2-pozitivnih ćelija u bazalnom sloju, i pokazali da produkt bcl-2 gena Bax ubrzava apoptozu te da odnos bcl-2 i Bax određuje da li će ćelija preživeti nakon apoptotskog stimulusa. Slične nalaze su objavili i Baima i Sticherling (100) koji su našli da je smanjenje ekspresije Bcl-2 u bazalnim ćelijama povezano sa preteranom ekspresijom Fas antigena i da korelira direktno sa obimom apoptoze u epidermu, kao i da bi obim apoptoze u epidermu i dermalnom infiltratu mogao da korelira sa hronološkim razvojem kutanih lezija kod LE. Nadalje, autori su našli da se FasL pozitivnih mononulearne ćelije akumuliraju oko folikula kod diskoidnog LE, kao i da je apoptotski indeks kod akutnijih formi LE (SCLE I ACLE) veći nego kod DLE.

Caricchio i saradnici (186) su objavili rad u kome ishod apoptoze izazvane UVB zracima zavisi od njihove doze: niska doza izaziva neinflamatornu apoptozu, a visoka - proinflamatornu. Reefman i saradnici (270, 271) su nakon toga poredili odnos apoptoze i nekroze nakon UVB zračenja energije 200 mJ/cm² kod 14 pacijenata sa SLE i 16 zdravih osoba. Premda senzitivnost SLE na UVB nije bila povezana sa brojem apoptotičnih ili nekrotičnih keratinocita u

koži, kutane lezije indukovane UVB zracima su bile povezane sa prisustvom apoptotičnih keratinocita.

UV zračenje je sposobno da izazove pogoršanja lokalne i sistemske autoimunosti tako što indukuje promene u ekspresiji i vezivanju keratinocitnih antigena (198, 272, 273). Casciola-Rosen et al. (274) su pokazali da se u kulturi keratinocita koji su u procesu apoptoze indukovane UV zracima, na njihovoj površini grupišu autoantigeni. Translokacija antigena na površinu apoptotičnog mehurića može dozvoliti cirkulišućim autoantitelima da dospeju do ovih antigena, koji su inače sekvestrirani unutar ćelija. Vezivanje autoantitela dovodi do oštećenja tkiva dejstvom komplementa ili inflamatornih ćelija (196), što posebno može biti značajno ukoliko je anti-inflamatorno uklanjanje poremećeno ili odloženo, pa apoptotske ćelije konsektivno prolaze kroz sekundarnu nekrozu (174, 175). Korišćenjem *in situ* metoda za otkrivanje preloma lanca DNK nađen je povećan broj apoptotičnih keratinocita u primarnim lezijama kod pacijenata sa CLE u poređenju sa kontrolama (100, 101, 275). Takođe, povećan broj apoptotičnih jedara se viđa u bioptatima kože lezije nakon provokativnog fototestiranja (200). Nakon 1 dana od pojedinačnog izlaganja UV zracima vidi se povećan broj apoptotičnih jedara u epidermu kontrolnih osoba u odnosu na pacijente sa CLE pre formiranja lezije. Nakon 3 dana dolazi do značajnog pada broja apoptotičnih jedara kod zdravih osoba, što odgovara pravilnom uklanjanju apoptotičnih ćelija, za razliku od većine pacijenata sa CLE kod kojih je došlo do povećanja broja apoptotičnih jedara, odnosno akumulacije apoptotičnih ćelija.

Analogno pacijentima sa SLE (182, 276), autori predlažu hipotezu da je poremećeno ili odloženo uklanjanje apoptotičnih ćelija kod pacijenata sa CLE odgovorno za akumulaciju apoptotičnih ćelija koje prolaze kroz sekundarnu nekrozu i dovode do lokalne inflamacije tkiva (277-279).

Međutim, kakav je intenzitet apoptoze u koži lezije kod pojedinih oblika kutanog lupusa, da li je UV zračenje jedini induktor apoptoze kod lupusa,

odnosno da li je apoptoza intenzivna samo u lezijama ili i u ostaloj koži, nije poznato. Takođe, mali broj radova se bavio vezom intenziteta apoptoze sa parametrima aktivnosti kutanog i sistemskog lupusa i da li pojačana apoptoza na neki način promoviše tranziciju od kutanog lupusa ka sistemskom.

U radu Salema i saradnika (280), na 50 pacijenata sa SLE, od kojih je 25 imalo kutane manifestacije, a 25 nije, nađeno je da pacijenti sa kutanim lezijama imaju veći SLEDAI, veće nivoe apoptoze keratinocita i limfocita u koži, kao i nivo neopterina u serumu (koji označava aktivnost makrofaga), a takođe i veću učestalost težeg glomerulonefritisa. Apoptotične ćelije su detektovane u bazalnim, suprabazalnim i srednjim slojevima epiderma i unutar inflamatornog infiltrata. Autori zaključuju da je akumulacija apoptotičnih keratinocita i limfocita u kutanim lezijama kod pacijenata sa SLE povezana sa težom kliničkom slikom i lošijom prognozom. Ovi autori, kao i Reefman i saradnici (270) sa slažu da pacijenti sa SLE bez kutanih lezija nemaju izraženu UV-indukovanu apoptozu u koži.

Takođe, Salem i saradnici (280) su našli obilniju količinu infiltrata u dermu kod pacijenata sa SLE i kutanim lezijama, i zaključili da ovaj podatak potvrđuje činjenicu da se tokom apoptoze (a i zbog dejstva samih UV zraka) stvara proinflamatorni citokinski milje koji i dovodi do stvaranja infiltrata. Autori su kod pacijenata sa SLE i kutanim lezijama našli i niske vrednosti C4, koji pomaže uklanjanje apoptotičnih ćelija tako što olakšava njihovu opsonizaciju i fagocitozu od strane makrofaga, te su zaključili da zbog toga nizak nivo C4 može posredno dovesti do akumulacije apoptotičnih ćelija. Povišen nivo neopterina u serumu govori u prilog pojačanoj funkciji makrofaga u pokušaju da uklone višak apoptotskog materijala iz kože i seruma. Ali, on ukazuje i na druge moguće mehanizme deficijencije u uklanjanju apoptotičnih ćelija, osim primarnog defekta u funkciji makrofaga.

Ovo je prvi rad o vezi apoptoze i aktivnosti bolesti (oštećenja tkiva) kod SLE. Jedan prethodni rad je ukazao na pozitivnu korelaciju između apoptoze u perifernim limfocitima i aktivnosti SLE (281). Autori Salem i saradnici predlažu

sledeću hipotezu o sledu događaja kod SLE sa kutanim manifestacijama: UV zraci dovode do apoptoze većeg broja keratinocita, čija akumulacija dovodi do inflamacije koja dovodi do stvaranja kutanih lezija. UV zraci dalje perpetuiraju inflamaciju stvarajući proinflamatorne citokine kao što je TNF- α . Poremećaj uklanjanja uz pojačanu apoptozu dodatno dovodi do akumulacije apoptotičnih ćelija. Ovo dovodi do sistemskog imunskog odgovora zbog preplavlivanja imunskog sistema autoantigenima koji se nalaze na površini apoptotičnih ćelija, sa posledičnom aktivacijom autoreaktivnih T ćelija koje ostanu neregulisane. Određena podvrsta ovih ćelija je odgovorna i za oštećenje bubrega (nefritis) kao i veću aktivnost SLE. Premda povećana apoptoza može biti prisutna i kod SLE bez kutanih lezija (u zdravoj fotoeksponiranoj koži), prisustvo kutanih lezija dovodi do pogoršavanja i/ili okidanja sistemskih manifestacija bolesti.

I u našoj studiji je podvučena uloga UV zraka u apoptozi i nastanku kutanih lezija kod LE. Indeks apoptoze je bio značajno veći u kutanim lezijama koje su se po pravilu nalazile na fotoeksponiranim regijama kože, u odnosu na zdravu fotoprotektovanu kožu glutealnog regiona. UV zraci su izazivali apoptozu na jednak način i kod pacijenata sa izolovanim CLE kao i kod pacijenata sa CLE i kriterijumima za SLE. Takođe, slično jednoj prethodnoj studiji (100), nađen je veći stepen apoptoze u koži lezije kod pacijenata sa SCLE u odnosu na pacijente sa DLE. Imajući u vidu činjenicu da je fotosenzitivnost prisutna kod svih pacijenata sa SCLE i da je direktno izazvana prisustvom Ro/SSA antitela, pretpostavljamo da je i uticaj UV zraka kod ove vrste CLE najizraženiji.

Apoptoza keratinocita kod CLE je, makar delimično, povezana sa inflamacijom kože (277-279). Ova činjenica bi mogla da objasni nalaz u ovoj studiji da pacijenti sa višim AI u leziji kože imaju i viši indeks aktivnosti CLE - CLASI A. Pored ovoga, nađena je pozitivna korelacija između AI u leziji i indeksa oštećenja tkiva kod CLE, RCLASI D. Ovaj nalaz bi se mogao objasniti činjenicom da atrofija kao klinički nalaz ulazi u sastav ovog skora, a da je u jednoj prethodnoj studiji nađeno da AI značajno korelira sa histopatološki

verifikovanom atrofijom epiderma (282). Sa druge strane, u literaturi ne postoje jasni podaci o uticaju nivoa apoptoze keratinocita na aktivnost SLE. U ovoj studiji nije nađena korelacija između AI i SLEDAI-2K, odnosno SLICC/ACR. Takođe, pacijenti sa nižom aktivnošću SLE nisu imali značajno različit AI (bilo lezije, bilo zdrave kože) u odnosu na pacijente sa visoko aktivnim SLE.

UV zračenje se smatra odgovornim i za deponovanje imunoreaktanata koji se detektuju u okviru LBT/DIF testa kod pacijenta sa LE. Poreklo ovih depozita, iako opisano pre oko 50 godina (283), nije potpuno razjašnjeno. Prema jednim autorima (284), depoziti imunoreaktanata nastaju nakon dejstva UV zračenja koje dovodi do denaturacije DNK keratinocita, koja potom prolazi kroz zonu bazalne membrane gde biva "zarobljena" zahvaljujući prirodnom aviditetu native DNK za kolagen tipa IV. Deponovanje kompleksa u kožu olakšava i aktivacija metaloproteinaza matriksa (245). Međutim, pacijenti sa pozitivnim i pacijenti sa negativnim DIF testom u ovoj studiji se nisu razlikovali u stepenu apoptoze izraženim apoptotskim indeksom. Takođe, grupe pacijenata sa pozitivnim i negativnim LBT, odnosno DIF testom se nisu razlikovale ni po aktivnosti DNaze I u serumu. Ovakvi nalazi idu u prilog tezi da poreklo hromatinskih fragmenata koji ulaze u sastav depozita nađenih na epidermodermalnoj granici nije iz epiderma, već iz cirkulacije, a najverovatnije iz bubrega (285).

U literaturi, a i u ovom radu, je više puta navedeno da pacijenti sa LE imaju nižu aktivnost DNaze I u odnosu na zdrave osobe (195, 227, 231-234). Polazeći od osnovne uloge ovog enzima jasno je da su pacijenti sa CLE koji imaju normalnu aktivnost DNaze I zaštićeni od povećane količine apoptotskog debrisa. Ukoliko ti pacijenti imaju i nizak stepen UV-indukovane apoptoze, logično je za pretpostaviti da će oni imati i niži stepen inflamacije kože, koji se klinički očitava u nižem CLASI A skor, a to je upravo nalaz koji je u ovom radu registrovan kroz analizu kombinovanog uticaja aktivnosti Dnaze I i apoptotskog indeksa na kliničke indekse aktivnosti SLE i CLE .

Odnos aktivnosti DNaze I i kutanog lupusa

Značaj snižene aktivnosti DNaze I u serumu za razvoj kutanog lupusa je u ovom istraživanju naznačen na više mesta:

1. Pacijenti sa CLE su ispoljavali sličnu aktivnost DNaze I u serumu kao pacijenti sa SLE

Od 39 pacijenata sa izolovanim CLE, njih 18 (46,1%) je imalo sniženu aktivnost DNaze I u serumu, a od 30 pacijenata sa CLE i kriterijumima za SLE, njih 19 (63,3%) je imalo nisku aktivnost DNaze I. Između ove 2 grupe ne samo da nije bilo razlike u učestalosti sniženja aktivnosti DNaze I u serumu, već se i prosečne vrednosti aktivnosti DNaze I se nisu značajno razlikovale. Dakle, aktivnost DNaze I u grupi pacijenata sa CLE nije igrala presudnu ulogu u pojavi ostalih, „sistemskih“ manifestacija SLE.

Obe navedene učestalosti su značajno veće od one koja je zabeležena u jedinom radu u kome je praćena aktivnost DNaze I kod pacijenata sa CLE, radu Drosera i saradnika (242) koji su našli da samo 7% (4/59) pacijenata sa CLE ima sniženu DNazu I, i to su uglavnom (3/4) bili pacijenti sa 4 i više kriterijuma za SLE. S obzirom da je i u navedenom i u našem radu metod merenja aktivnosti DNaze I bio isti, nemamo jasno objašnjenje za ovu razliku.

2. Pacijenti sa SLE i kutanim manifestacijama su imali nižu aktivnost DNaze I od pacijenata sa SLE bez kutanih manifestacija

Ova analiza je urađena na grupi od 77 pacijenata sa SLE koji su imali težu kliničku sliku i zahvatanje svih organa i organskih sistema. Razlika u aktivnosti DNaze I između navedene 2 grupe pacijenata je statistički značajna.

3. Aktivnost DNaze I je niža kod pacijenata sa SLE kod kojih je zahvaćena koža

Slično prethodnim radovima (231, 232), nismo našli korelaciju između aktivnosti DNaze I i serozitisa, zglobnih, bubrežnih, hematoloških i CNS

manifestacija SLE. Međutim, našli smo da pacijenti sa SLE i specifičnim kutanim lezijama imaju značajno nižu aktivnost DNaze I u serumu.

Ovaj nalaz do sada nije opisan. Drosera i saradnici (242) su, u pomenutom radu, našli da 7% pacijenata koji imaju kutani lupus imaju sniženu aktivnost DNaze I i da ti pacijenti češće imaju kriterijume za SLE, te su zaključili da je pacijente sa kutanim lupusom koji imaju sniženu aktivnost DNaze I potrebno striktno pratiti da bi se sprečilo oštećenje organa. Međutim, studije na životinjama nisu pokazala gubitak aktivnosti DNaze I u koži miševa sa lupusom tokom razvoja SLE (245).

4. Pacijenti koji imaju sniženu aktivnost DNaze I u serumu imaju 2,9 puta veću šansu da razviju kutane lezije nego pacijenti sa normalnim nivoom DNaze I u serumu

Navedeni iskaz je dokazan logističkom regresijom kod svih 146 pacijenata sa LE u ovom istraživanju (95% CI za RR iznosi 1,2-7,0).

Patogenetska uloga DNaze I u razvoju kutanih lezija kod LE nije potpuno razjašnjena. U literaturi se kauzalna veza između nukleaza i kutanog lupusa spominje samo u slučaju DNaze III (TREX 1) i familijarnog chilblain lupusa, retkog autozomno dominantnog oboljenja kod koga se, osim lezija tipa chilblain lupusa, javljaju i ANA i imunski kompleksi (286). Za TREX 1 je dokazano da, pored funkcije egzonukleaze, ima ulogu i u održavanju stabilnosti molekula DNK tokom replikacije, kao i u stimulaciji apoptotskog puta ćelijske smrti, te tako doprinosi ćelijskoj homeostazi i prevenciji autoimunosti. Kod familijalnog chilblain lupusa je detektovana heterozigotna mutacija u genu za TREX 1, što dovodi do parcijalnog gubitka egzonukleazne aktivnosti. Mutacije u genu za TREX 1 su zabeležene i kod pacijenata sa SLE (285). Nije poznato da li i DNaza I na sličan način može da dovede do pojave lezija kod CLE.

6. ZAKLJUČCI

Analizom rezultata dobijenih obradom podataka u ovom istraživanju moguće je izvesti sledeće zaključke:

I.

1. Aktivnost DNaze I u serumu pacijenata sa LE niža je nego kod zdravih kontrola ($p < 0,001$).
2. Pacijenti sa SLE i niskom aktivnošću DNaze I su značajno češće imali zahvaćenu kožu ($p = 0,022$), za razliku od drugih organa. Pacijenti koji imaju sniženu aktivnost DNaze I u serumu imaju 2,9 puta veću šansu da razviju kutane lezije nego pacijenti sa normalnim nivoom DNaze I u serumu (95% CI za RR iznosi 1,2-7,0).
3. Aktivnost DNaze I u serumu pozitivno korelira sa aktivnošću SLE merenom SLEDAI-2K indeksom ($p < 0,05$). Pacijenti sa aktivnijom bolešću (SLEDAI-2K ≥ 7) imaju veću aktivnost DNaze I u odnosu na pacijente sa bolešću niske aktivnosti (SLEDAI-2K < 7), $p < 0,05$. Koncentracija anti-dsDNA antitela, snižena koncentracija C3 i povišena aktivnost DNaze I su najjače bili povezani sa aktivnošću SLE merenom SLEDAI-2K indeksom.
4. Aktivnost DNaze I se nije razlikovala između pacijenata sa SLE i CLE, kao ni između pacijenata sa pojedinim podtipovima CLE. Takođe, među navedenim grupama se nije razlikovala ni učestalost niske aktivnosti DNaze I u serumu.
5. Nije nađena korelacija između aktivnosti DNaze I i indeksa oštećenja tkiva kod SLE - ACR/SLICC indeks.
6. Aktivnost DNaze I u serumu ne korelira sa indeksima aktivnosti CLE, CLASI i RCLASI.

II.

1. Kod pacijenata sa SLE je nađena pozitivna korelacija između aktivnosti DNaze I u serumu i koncentracije anti-dsDNA antitela, anti-nukleozomalnih, anti-histonskih antitela i ANA, dok nije nađena korelacija sa nivoom C3 i C4 u serumu.

2. Tokom praćenja pacijenata sa SLE registrovana je pozitivna korelacija između promena u aktivnosti DNaze I u serumu i promena u SLEDAI-2K indeksu ($p < 0,01$). Promene u SLEDAI-2K su jače korelirale sa promenama aktivnosti DNaze I u serumu nego sa promenama titra ANA ili nivoa anti-nukleozomalnih i anti-histonskih antitela.

III.

1. Prosečan indeks apoptoze je veći u leziji nego u zdravoj fotoprotektovanoj koži pacijenata sa CLE ($p < 0,001$).

2. Pacijenti sa SLE i pacijenti sa izolovanim CLE se nisu razlikovali u apoptotskim indeksima u koži lezije i zdravoj fotoprotektovanoj koži.

3. Pacijenti sa visoko aktivnim SLE i nisko aktivnim SLE se nisu razlikovali u apoptotskim indeksima u koži lezije i zdravoj fotoprotektovanoj koži.

4. Apoptotski indeks u leziji je bio značajno veći kod pacijenata sa SCLE nego kod pacijenata sa DLE ($p = 0,046$), ostali podtipovi lupusa se nisu međusobno značajno razlikovali. Apoptotski indeks u zdravoj koži se nije značajno razlikovao među pacijentima sa različitim podtipovima CLE.

5. Apoptotski indeks u kutanoj leziji kod CLE pozitivno korelira sa indeksima aktivnosti CLASI A ($p < 0,05$) i oštećenja RCLASI D ($p < 0,05$). Apoptotski indeks u zdravoj fotoprotektovanoj koži ne korelira sa indeksima aktivnosti CLE.

6. Apoptotski indeksi ne koreliraju direktno sa aktivnošću DNaze I u serumu.

7. Apoptotski indeksi se ne razlikuju značajno između pacijenata sa pozitivnim i negativnim LBT, odnosno DIF testom. Pacijenti sa pozitivnim i negativnim LBT/DIF testom se ne razlikuju ni po aktivnosti DNaze I u serumu.

IV.

1. Pacijenti koji imaju normalnu aktivnost DNaze I u serumu i normalan indeks apoptoze u leziji kože imaju značajno niži CLASI A skor od pacijenata koji imaju sniženu aktivnost DNaze I u serumu i/ili povišen apoptotski indeks ($p=0,017$).

LITERATURA

1. Tutuncu ZN, Kalunian KC. The Definition and Classification of Systemic Lupus Erythematosus. In: Wallace DJ, Hahn BH, editors. *Dubois' Lupus Erythematosus*, 7th ed. Chicago: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.p.16-20.
2. Mok CC, Lau CS. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Pathol* 2003;56:481-90.
3. Hahn BH. Overview of Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. In: Wallace DJ, Hahn BH, editors. *Dubois' Lupus Erythematosus*, 7th ed. Chicago: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.p.46-53.
4. Holubar K. Terminology and iconography of lupus erythematosus. A historical vignette. *Am J Dermatopathol* 1980;2:239-42.
5. Mallavarapu RK, Grimsley EW. The history of lupus erythematosus. *South Med J* 2007;100:896-8.
6. Fatovic-Ferencic S, Holubar K. Early history and iconography of lupus erythematosus. *Clin Dermatol* 2004;22:100-4.
7. Smith CD, Cyr M. The history of lupus erythematosus. From Hippocrates to Osler. *Rheum Dis Clin North Am* 1988;14:1-14.
8. Cazenave PLA. Lupus érythémateux (érythème centrifuge). *Ann des Maladies de la peau et de la syphilis* 1850/51; 3: 297-9.
9. Hebra F. On diseases of the skin including the exanthemata. Vol 1. Adams F (trans) London, The New Sydenham Society 1866.
10. Kaposi M. Lupus vulgaris. In: Hebra F, Kaposi M, editors. On diseases of the skin including the exanthemata. Vol IV. Tay W (trans) London, The New Sydenham Society 1875.
11. Hutchinson J. Lupus erythematosus. *Med Times Gaz* 1879;1:1-3.
12. Hahn BH. Belimumab for systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2013;368:1528-35.

13. Fessel WJ. Systemic lupus erythematosus in the community. Incidence, prevalence, outcome, and first symptoms; the high prevalence in black women. *Arch Intern Med* 1974;134:1027-35.
14. Siegel M, Lee SL. The epidemiology of systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum* 1973;3:1-54.
15. Hochberg MC. Prevalence of systemic lupus erythematosus in England and Wales, 1981-2. *Ann Rheum Dis* 1987;46:664-6.
16. Jonsson H, Nived O, Sturfelt G. Outcome in systemic lupus erythematosus: a prospective study of patients from a defined population. *Medicine (Baltimore)* 1989;68:141-50.
17. Rus V, Maury EE, Hochberg MC. The Epidemiology of Systemic Lupus Erythematosus. In: Wallace DJ, Hahn BH, editors. *Dubois' Lupus Erythematosus*, 7th ed. Chicago: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.p. 34-44.
18. Uramoto KM, Michet CJ Jr, Thumboo J, Sunku J, O'Fallon WM, Gabriel SE. Trends in the incidence and mortality of systemic lupus erythematosus, 1950-1992. *Arthritis Rheum* 1999;42:46-50.
19. Vilar MJ, Sato EI. Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a tropical region (Natal, Brazil). *Lupus* 2002;11:528-32.
20. Alamanos Y, Voulgari PV, Siozos C, Katsimpri P, Tsintzos S, Dimou G, et al. Epidemiology of systemic lupus erythematosus in northwest Greece 1982-2001. *J Rheumatol* 2003;30:731-5.
21. Kaslow RA, Masi AT. Age, sex, and race effects on mortality from systemic lupus erythematosus in the United States. *Arthritis Rheum* 1978;21:473-9.
22. Hochberg MC. The incidence of systemic lupus erythematosus in Baltimore, Maryland, 1970-1977. *Arthritis Rheum* 1985;28:80-6.
23. Bae SC, Fraser P, Liang MH. The epidemiology of systemic lupus erythematosus in populations of African ancestry: a critical review of the „prevalence gradient hypothesis“. *Arthritis Rheum* 1998;41:2091-9.

24. Lopez-Acuna D, Hochberg MC, Gittelsson AM. Mortality from discoid and systemic lupus erythematosus in the United States,1968-1978. *Arthritis Rheum* 1982;25(Suppl):S80.
25. Helve T. Prevalence and mortality rates of systemic lupus erythematosus and causes of death in SLE patients in Finland. *Scand J Rheumatol* 1985;14:43-6.
26. Nossent JC. Systemic lupus erythematosus on the Caribbean island of Curacao: an epidemiological investigation. *Ann Rheum Dis* 1992;51:1197-201.
27. Bernatsky S, Boivin JF, Joseph L, Manzi S, Ginzler E, Gladman DD, et al. Mortality in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2006;54:2550-7.
28. Wallace DJ. Definition and classification. In: Wallace DJ. *Lupus: The essential clinician's guide*. New York: Oxford University Press; 2008.p. 5-9.
29. Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MB, Scofield RH, Dennis GJ, James JA, et al. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Eng J Med* 2003;349:1526-33.
30. Croker JA, Kimberly RP. Genetics of susceptibility and severity in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 2005;17:529-37.
31. Behrens TW, Graham RR, Kyogoku C, Baechler EC, Ramos PS, Gillett C, et al. Progress toward understanding the genetic pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Novartis Found Symp* 2005;267:145-60.
32. Manderson AP, Botto M, Walport MJ. The role of complement in systemic lupus erythematosus. *Annu Rev Immunol* 2004;22:431-56.
33. Moser KL, Kelly JA, Lessard CJ, Harley JB. Recent insights into the genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Genes Immun* 2009;10:373-9.
34. Tsokos GC. Systemic Lupus Erythematosus. *N Engl J Med* 2011; 365:2110-21.
35. Cui Y, Sheng Y, Zhang X. Genetic susceptibility to SLE: Recent progress from GWAS. *J Autoimmun* 2013;41:25-33.
36. Grimaldi CM, Hill L, Xu X, Peeva E, Diamond B. Hormonal modulation of B cell development and repertoire selection. *Mol Immunol* 2005;42:811-20.

37. Smith-Bouvier DL, Divekar AA, Sasidhar M, Du S, Tiwari-Woodruff SK, King JK, et al. A role for sex chromosome complement in the female bias in autoimmune disease. *J Exp Med* 2008;205:1099-108.
38. Gross AJ, Hochberg D, Rand WM, Thorley-Lawson DA. EBV and systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2005;174:6599-607.
39. McClain MT, Heinlen LD, Dennis GJ, Roebuck J, Harley JB, James JA. Early events in lupus humoral immunity suggest initiation through molecular mimicry. *Nat Med* 2005;11:85-9.
40. Pavlovic M, Kats A, Cavallo M, Shoenfeld Y. Clinical and Molecular Evidence for Association of SLE with parvovirus B19. *Lupus* 2010;19:783-92.
41. Costenbader KH, Kim DJ, Peerzada J, Lockman S, Nobles-Knight D, Petri M, et al. Cigarette smoking and the risk of Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum* 2004;50:849-57.
42. Koskenmies S, Jarvinen TM, Onkamo P, Panelius J, Tuovinen U, Hasan T, et al. Clinical and laboratory characteristics of Finnish lupus erythematosus patients with cutaneous manifestations. *Lupus* 2008;17:337-47.
43. Jewell ML, McCauliffe DO. Patients with cutaneous lupus erythematosus who smoke are less responsive to antimalarial treatment. *J Am Acad Dermatol* 2000;42:983-7.
44. Hahn BH, Ebling F, Singh RR, Singh RP, Karpouzas G, La Cava A. Cellular and molecular mechanisms of autoantibody production in lupus. *Ann NY Acad Sci* 2005;1051:433-41.
45. Martin DA, Elkon KB. Autoantibodies make a U-turn; the toll hypothesis for autoantibody specificity. *J Exp Med* 2005;202:1465-9.
46. Means TK, Latz E, Hayashi R, Murali MR, Golenbock DT, Luster AD. Human lupus autoantibody-DNA complexes activate dendritic cells through cooperation of CD32 and TLR9. *J Clin Invest* 2005;115:407-17.
47. Savarese E, Chae OW, Trowitzsch S, Weber G, Kastner B, Akira S, et al. U1 small ribonucleoprotein immune complexes induce type 1 interferon in plasmacytoid dendritic cells via TLR7. *Blood* 2006;107:3229-34.

48. Kaplan MJ, Lu O, Wu A, Attwood J, Richardson B. Demethylation of promoter regulatory elements contributes to perforin overexpression in CD4⁺ lupus T cells. *J Immunol* 2004;172:3652-61.
49. Parks CG, Cooper GS, Hudson LL, Dooley MA, Treadwell EL, St Clair EW, et al. Association of Epstein-Barr virus with systemic lupus erythematosus; effect modification by race, age and cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 genotype. *Arthritis Rheum* 2005;52:1148-59.
50. Munoz LE, Gaipl US, Franz S, Sheriff A, Voll RE, Kalden JR, et al. SLE - a disease of clearance deficiency? *Rheumatology (Oxford)* 2005;44:1101-7.
51. Kimberly RP. Immune complexes in the rheumatic diseases. *Rheum Dis Clin North Am* 1987;13:583-96.
52. Li X, Ptacek TS, Brown EE, Edberg JC. Fcγ receptors: structure, function and role as genetic risk factors in SLE. *Genes Immun* 2009;10:380-9.
53. Hom G, Graham RR, Modrek B, Taylor KE, Ortmann W, Garnier S, et al. Association of systemic lupus erythematosus with C8orf13-BLK and ITGAM-ITGAX. *N Engl J Med* 2008;358:900-9.
54. Juang YT, Wang Y, Solomou EE, Li Y, Mawrin C, Tenbrock K, et al. Systemic lupus erythematosus serum IgG increases CREM binding to the IL-2 promoter and suppresses IL-2 production through CaMKIV. *J Clin Invest* 2005;115: 996-1005.
55. Brucato A, Cimaz R, Caporali R, Ramoni V, Buyon J. Pregnancy outcomes in patients with autoimmune diseases and anti-Ro/SSA antibodies. *Clin Rev Allergy Immunol* 2011;40:27-41.
56. Kowal C, Degiorgio LA, Lee JY, Edgar MA, Huerta PT, Volpe BT, et al. Human lupus autoantibodies against NMDA receptors mediate cognitive impairment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:19854-9.
57. Ruiz-Irastorza G, Crowther M, Branch W, Khamashta MA. Antiphospholipid syndrome. *Lancet* 2010;376:1498-509.

58. Girardi G, Redecha P, Salmon JE. Heparin prevents antiphospholipid antibody-induced fetal loss by inhibiting complement activation. *Nat Med* 2004;10: 1222-6.
59. Tsokos GC, Fleming SD. Autoimmunity, complement activation, tissue injury and reciprocal effects. *Curr Dir Autoimmun* 2004;7:149-64.
60. Crispín JC, Oukka M, Bayliss G, Cohen RA, Van Beek CA, Stillman IE, et al. Expanded double negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus produce IL-17 and infiltrate the kidneys. *J Immunol* 2008;181:8761-6.
61. Manderson AP, Botto M, Walport MJ. The role of complement in the development of systemic lupus erythematosus. *Annu Rev Immunol* 2004;22:431-56.
62. Cohen PL, Caricchio R. Genetic models for the clearance of apoptotic cells. *Rheum Dis Clin North Am* 2004;30:473-86.
63. Deng GM, Liu L, Kyttaris VC, Tsokos GC. Lupus serum IgG induces skin inflammation through the TNFR1 signaling pathway. *J Immunol* 2010;184:7154-61.
64. Valdivielso P, Gómez-Doblas JJ, Macias M, Haro-Liger M, Fernández-Nebro A, Sánchez-Chaparro MA, et al. Lupus-associated endothelial dysfunction, disease activity and arteriosclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 2008;26: 827-33.
65. Mayadas TN, Tsokos GC, Tsuboi N. Mechanisms of immune complex-mediated neutrophil recruitment and tissue injury. *Circulation* 2009;120:2012-24.
66. Rajagopalan S, Somers EC, Brook RD, Kehrer C, Pfenninger D, Lewis E, et al. Endothelial cell apoptosis in systemic lupus erythematosus: a common pathway for abnormal vascular function and thrombosis propensity. *Blood* 2004; 103:3677-83.
67. Hochberg MG. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus (letter). *Arthritis Rheum* 1997;40:1725.

68. Wallace DJ. Clinical symptoms and signs. In: Wallace DJ. *Lupus: The essential clinician's guide*. New York: Oxford University Press; 2008.p.21-48.
69. Gilliam JN, Sontheimer RD. Skin manifestations of SLE. *Clin Rheum Dis* 1982;8:207-18.
70. Zecevic RD, Vojvodić D, Ristić B, Pavlović MD, Stefanović D, Karadaglić D. Skin lesions - an indicator of disease activity in systemic lupus erythematosus? *Lupus* 2001;10:364-7.
71. Sherer Y, Gorstein A, Fritzler MJ, Shoenfeld Y. Autoantibody explosion in systemic lupus erythematosus: more than 100 different antibodies found in SLE patients. *Semin Arthritis Rheum* 2004;34:501-37.
72. Moore AE, Sabachewsky L, Toolan HW. Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells. *Cancer Res* 1955;15:598-602.
73. Reichlin M. ANA negative systemic lupus erythematosus sera revisited serologically. *Lupus* 2000;9:116-9.
74. ter Borg EJ, Horst G, Hummel EJ, Limburg PC, Kallenberg CG. Measurement of increases in anti-double-stranded DNA antibody levels as a predictor of disease exacerbation in systemic lupus erythematosus. A long-term, prospective study. *Arthritis Rheum* 1990;33:634-43.
75. Cortes-Hernandez, J., J. Ordi-Ros, M. Labrador, S. Bujan, E. Balada, A. Segarra, et al. Antihistone and anti-doublestranded deoxyribonucleic acid antibodies are associated with renal disease in systemic lupus erythematosus. *Am J Med* 2004, 116:165-73.
76. Totoritis MC, Tan EM, McNally EM, Rubin RL. Association of antibody to histone complex H2A-H2B with symptomatic procainamide-induced lupus. *N Engl J Med* 1988;318:1431-6.
77. Craft J. Antibodies to snRNPs in systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am* 1992;18:311-35.
78. Symmons DP, Coppock JS, Bacon PA, Bresnihan B, Isenberg DA, Maddison P, et al. Development and assessment of a computerized index of clinical

disease activity in systemic lupus erythematosus. Members of the British Isles Lupus Assessment Group (BILAG). *Q J Med* 1988;69:927-37.

79. Liang MH, Socher SA, Larson MG, Schur PH. Reliability and validity of six systems for the clinical assessment of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1989;32:1107-18.

80. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum* 1992;35:630-40.

81. Bencivelli W, Vitali C, Isenberg DA, Smolen JS, Snaith ML, Sciuto M, et al. Disease activity in systemic lupus erythematosus: report of the Consensus Study Group of the European Workshop for Rheumatology Research. III. Development of a computerised clinical chart and its application to the comparison of different indices of disease activity. The European Consensus Study Group for Disease Activity in SLE. *Clin Exp Rheumatol* 1992; 10:549-54.

82. Gladman DD, Goldsmith CH, Urowitz MB, Bacon P, Bombardier C, Isenberg D, et al. Sensitivity to change of 3 Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Indices: international validation. *J Rheumatol* 1994;21:1468-71.

83. Petri M, Buyon J, Skovron ML. Reliability of SELENA SLEDAI and flares as a clinical trial outcome measure (abstract). *Arthritis Rheum* 1998;41:S218.

84. Gladman DD, Ibanez D, Urowitz MB. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. *J Rheumatol* 2002;29:288-91.

85. Gladman D, Ginzler E, Goldsmith C, Fortin P, Liang M, Urowitz M, et al. The development and initial validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology damage index for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1996;39:363-9.

86. Rahman P, Gladman DD, Urowitz M, Hallett D, Tam LS. Early damage as measured by the SLICC/ACR damage index is a predictor of mortality in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2001;10:93-6.

87. Gladman DD, Urowitz MB, Goldsmith CH, Fortin P, Ginzler E, Gordon C, et al. The reliability of the Systemic Lupus International Collaborating

Clinics/American College of Rheumatology damage index in patients with Systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997;40:809-13.

88. MacLeod JM. Discussion on the nature, varieties, causes, and treatment of lupus erythematosus. *Br Med J* 1913;2:313-9.

89. Keil H. Conception of lupus erythematosus and its morphologic variants. *Arch Dermatol Syph* 1937;36:729-57.

90. Baehr G. Disseminated lupus erythematosus. In: Cecil RL, Loeb RF, eds. *A Textbook of Medicine*, 8th Ed. Philadelphia: WB Saunders; 1951.p.483.

91. Tuffanelli DL, Dubois EL. Cutaneous manifestations of systemic lupus erythematosus. *Arch Dermatol Syph* 1964;90:377-86.

92. Hay EM, Gordon BC, Isenberg DA, Isenberg DA, Maddison P, Snaith ML, et al. The BILAG index: a reliable and valid instrument for measuring clinical disease activity in systemic lupus erythematosus. *Q J Med* 1993;86:447-58.

93. Beck JS, Rowell NR. Discoid lupus erythematosus. *Q J Med* 1966;35:119-36.

94. Burch PR, Rowell NR. The sex- and age-distribution of chronic discoid lupus erythematosus in four countries. *Acta Derm Venereol* 1968;48:33-46.

95. Chong BF, Song J, Olsen NJ. Determining risk factors for developing systemic lupus erythematosus in patients with discoid lupus erythematosus. *Br J Derm* 2012;166:29-35.

96. Millard TP, McGregor JM. Molecular genetics of cutaneous lupus erythematosus. *Clin Exp Dermatol* 2001;26:184-91.

97. Stein LF, Saed GM, Fivenson DP. T-cell cytokine network in cutaneous lupus erythematosus. *J Am Acad Dermatol* 1997;37:191-6.

98. Bos JD, de Rie MA. Lupus erythematosus. In: Bos JD, editor. *Skin immune system (SIS)*. Boca Raton: CRC Press; 1997.p. 471-8.

99. Magro CM, Crowson AN, Harrist TJ. The use of antibody to C5b-9 in the subclassification of lupus erythematosus. *Br J Dermatol* 1996;134:855-60.

100. Baima B, Sticherling M. Apoptosis in different cutaneous manifestations of lupus erythematosus. *Br J Dermatol* 2001;144:958-66.

101. Pablos JL, Santiago B, Galindo M, Carreira PE, Ballestin C, Gomez-Reino JJ. Keratinocyte apoptosis and p53 expression in cutaneous lupus and dermatomyositis. *J Pathol* 1999;188:63-8.
102. Murphy G, Young AR, Wulf HC, Kulms D, Schwarz T. The molecular determinants of sunburn cell formation. *Exp Dermatol* 2001;10:155-60.
103. Godar DE. Light and death: photons and apoptosis. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 1999;4:17-23.
104. Nghiem DX, Kazimi N, Mitchell DL, Vink AA, Ananthaswamy HN, Kripke ML, et al. Mechanisms underlying the suppression of established immune responses by ultraviolet radiation. *J Invest Dermatol* 2002;119:600-8.
105. Casciola-Rosen L, Rosen A. Ultraviolet light-induced keratinocyte apoptosis: a potential mechanism for the induction of skin lesions and autoantibody production in LE. *Lupus* 1997; 6:175-80.
106. Werth VP, Bashir MM, Zhang W. IL-12 completely blocks ultraviolet-induced secretion of tumor necrosis factor alpha from cultured skin fibroblasts and keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2003;120:116-22.
107. Kondo S, Jimbow K. Dose-dependent induction of IL-12 but not IL-10 from human keratinocytes after exposure to ultraviolet light A. *J Cell Physiol* 1998; 177:493-8.
108. Bennion SD, Middleton MH, David-Bajar KM, Brice S, Norris DA. In three types of interface dermatitis, different patterns of expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) indicate different triggers of disease. *J Invest Dermatol* 1995;105(1 Suppl):71S-9S.
109. Dörner T, Hucko M, Mayet WJ, Trefzer U, Burmester GR, Hiepe F. Enhanced membrane expression of the 52 kDa Ro(SS-A) and La(SS-B) antigens by human keratinocytes induced by TNF alpha. *Ann Rheum Dis* 1995;54:904-9.
110. Kondo S, Yoneta A, Yazawa H, Kamada A, Jimbow K. Downregulation of CXCR-2 but not CXCR-1 expression by human keratinocytes by UVB. *J Cell Physiol* 2000;182:366-70.

111. Zheng X, Nakamura K, Tojo M, Akiba H, Oyama N, Nishibu A, et al. Ultraviolet A irradiation inhibits thymus and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17) production by a human keratinocyte HaCaT cell line. *Eur J Dermatol* 2003;13:348-53.
112. Norris DA, Whang K, David-Bajar K, Bennion SD. The influence of ultraviolet light on immunological cytotoxicity in the skin. *Photochem Photobiol* 1997;65:636-46.
113. Kuhn A, Ruzicka T. Classification of cutaneous lupus erythematosus. In: Kuhn A, Lehmann P and Ruzicka T, editors. *Cutaneous Lupus Erythematosus*. Springer: Heidelberg; 2004.p.53-8.
114. Gilliam JN. The cutaneous signs of lupus erythematosus. *Cont Educ Fam Phys* 1977;6:34-70.
115. Gilliam JN, Sontheimer RD. Distinctive cutaneous subsets in the spectrum of lupus erythematosus. *J Am Acad Dermatol* 1981;4:471-5.
116. Kuhn A, Sonntag M, Ruzicka T, Lehmann P, MegahedM. Histopathologic findings in lupus erythematosus tumidus: review of 80 patients. *J Am Acad Dermatol* 2003;48:901-8.
117. Sontheimer RD. The lexicon of cutaneous lupus erythematosus - a review and personal perspective on the nomenclature and classification of the cutaneous manifestations of lupus erythematosus. *Lupus* 1997;6:84-95.
118. Yell JA, Wojnarowska F. Bullous skin disease in lupus erythematosus. *Lupus* 1997;6:112-21.
119. Fabbri P, Cardinali C, Giomi B, Caproni M. Cutaneous lupus erythematosus: diagnosis and management. *Am J Clin Dermatol* 2003;4:449-65.
120. Wysenbeek AJ, Guedj D, Amit M, Weinberger A. Rash in systemic lupus erythematosus: prevalence and relation to cutaneous and non-cutaneous disease manifestations. *Ann Rheum Dis* 1992;51:717-9.
121. Sontheimer RD, Stastny P, Gilliam JN. Human histocompatibility antigen associations in subacute cutaneous lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1981;67:312-6.

122. Sontheimer RD. Clinical significance of subacute cutaneous lupus erythematosus skin lesions. *J Dermatol* 1985;12:205-212.
123. Bechet PE. Hypertrophic lupus erythematosus. *Arch Dermatol* 1940;42:211-3.
124. Callen JP. Discoid lupus erythematosus - variants and clinical associations. *Clin Dermatol* 1985;3:49-57.
125. Mascaro JM, Herrero C, Hausmann G. Uncommon cutaneous manifestations of lupus erythematosus. *Lupus* 1997;6:122-31.
126. Hutchinson J. Harveian lectures on lupus. Lecture III. On the various form of lupus vulgaris and erythematosus. *Br Med J* 1888;1:113-8.
127. Su WP, Perniciaro C, Rogers RS, White JW. Chilblain lupus erythematosus (lupus pernio): clinical review of the Mayo Clinic experience and proposal of diagnostic criteria. *Cutis* 1994;54:395-9.
128. Hoffmann E. Demonstrationen: Lupus erythematoses tumidus. *DermZeitschr* 1909;16:159-60.
129. Winfield H, Jaworsky C. Connective tissue diseases. In: Elder D, Elenitsas R, Johnson B, Murphy GF, Xu X, editors. *Lever's histopathology of the skin*, 10th edition. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins publishers; 2009.p.279-310.
130. Weedon D. The lichenoid reaction pattern. In: Weedon D. *Skin pathology*, 1st edition. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1997.p. 29 - 63.
131. Blaszczyk M, Jablonska S, Chorzelski T, Jarzabek-Chorzelska M, Beutner EH, Kumar V. Clinical relevance of immunologic findings in cutaneous lupus erythematosus. *Clin Dermatol* 1993;10:399-406.
132. Provost TT, Reichlin M. Immunopathologic studies of cutaneous lupus erythematosus. *J Clin Immunol* 1988;8:223 - 33.
133. David-Bajar KM, Bennion SD, DeSpain JD, Golitz LE, Lee LA. Clinical, histologic, and immunofluorescent distinctions between subacute cutaneous lupus erythematosus and discoid lupus erythematosus. *J Invest Dermatol* 1992; 99:251-7.

134. Cernea SS, Sotto MN, Oliveira ZNP, Vilela MAC, Rivitti EA, Miyauchi LM, et al. Cutaneous lupus erythematosus: direct immunofluorescence and epidermal basal membrane study. *Int J Dermatol* 1992;31:260-4.
135. Fabre VC, Lear S, Reichlin M, Hodge SJ, Callen JP. Twenty percent of biopsy specimens from sun - exposed skin of normal young adults demonstrate positive immunofluorescence. *Arch Dermatol* 1991;127:1006 -11.
136. Leibold AM, Bennion S, David-Bajar K, Schleve MJ. Occurrence of positive immunofluorescence in the dermo-epidermal junction of sun-exposed skin of normal adults. *J Cutan Pathol* 1994;21:200-6.
137. Cardinali C, Caproni M, Fabbri P. The utility of lupus band test on sun-protected non-lesional skin for the diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 1999;17:427-32.
138. Cardinali C, Caproni M, Fabbri P. The composition of lupus band test (LBT) on the sun-protected non-lesional (SPNL) skin in patients with cutaneous lupus erythematosus (CLE). *Lupus* 1999;8:755-60.
139. Shinada S, Wallace DJ. Laboratory Features of Cutaneous Lupus Erythematosus. In: Kuhn A, Lehmann P, Ruzicka T, editors. *Cutaneous Lupus Erythematosus*. 1st ed. Berlin, Heidelberg: Springer; 2005.p.311-22.
140. Albrecht J, Taylor L, Berlin JA, Dulay S, Ang S, Fakharzadeh S, et al. The CLASI (Cutaneous Lupus Erythematosus Disease Area and Severity Index): An Outcome Instrument for Cutaneous Lupus Erythematosus. *J Invest Dermatol* 2005;125:889 -94.
141. Krathen MS, Dunham J, Gaines E, Junkins-Hopkins J, Kim E, Kolasinski SL, et al. The Cutaneous Lupus Erythematosus Disease Activity and Severity Index: Expansion for Rheumatology and Dermatology. *Arthritis Rheum* 2008; 59: 338-44.
142. Salphale P, Danda D, Chandrashekar L, Peter D, Jayaseeli N, George R. The study of Cutaneous Lupus Erythematosus Disease Area and Severity Index in Indian patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2011;20:1510-7.

143. Bein D, Kuehn E, Meuth AM, Amler S, Haust M, Nyberg F, et al. Evaluation of disease activity and damage in different subtypes of cutaneous lupus erythematosus using the CLASI. *JEADV* 2011; 25: 652-9.
144. Klein R, Moghadam-Kia S, LoMonico J, Okawa J, Coley C, Taylor L, et al. Development of the CLASI as a Tool to Measure Disease Severity and Responsiveness to Therapy in Cutaneous Lupus Erythematosus. *Arch Dermatol* 2011;147:203-8.
145. Kuhn A, Meuth AM, Bein D, Amler S, Beisert S, Böhm M, et al. Revised Cutaneous Lupus Erythematosus Disease Area and Severity Index (RCLASI): a modified outcome instrument for cutaneous lupus erythematosus. *Br J Dermatol* 2010;163:83-92.
146. Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res* 2011;30:87-101.
147. Kerr JF, Harmon BV: Definition and incidence of apoptosis: an historical perspective. In *Apoptosis: the molecular basis of cell death*. Volume 3. Edited by: Tomei LD, Cope FO. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1991.p.5-29.
148. Mohan H: *Textbook of pathology*. 5 edition. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers; 2010, 21-60. i Merkle CJ: Cellular adaptation, injury, and death. In *Pathophysiology: concepts of altered health states*.. 8 edition. Edited by: Porth CM, Matfin G. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams and Wilkins; 2009.p.94-111.
149. Melino G. Sirens' song. *Nature* 2001;412:23.
150. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell Death. *N Engl J Med* 2009;361:1570-83.
151. Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ* 2005;12:1463-7.
152. Manjo G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995;146:3-15.

153. Ziegler U, Groscurth P. Morphological features of cell death. *News Physiol Sci* 2004;19:124-8.
154. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. *Robins and Cotran: pathologic basis of disease*. 8 edition. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2010.p.25-32.
155. Hengartner MO. Apoptosis: corralling the corpses. *Cell* 2000;104:325-8.
156. Vaux D, Silke J. Mammalian mitochondrial IAP binding proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;203:449-504.
157. McCarthy NJ, Evan GI. Methods for detecting and quantifying apoptosis. *Curr Top Dev Biol* 1998;36:259-78.
158. Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* 2005;115:2665-72.
159. Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, et al. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ* 2007;14:1237-66.
160. Galluzzi L, Aaronson SA, Abrams J, Alnemri ES, Andrews DW, Baehrecke EH, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ* 2009;16:1093-107.
161. Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun* 2005;73:1907-16.
162. O'Brien MA, Kirby R. Apoptosis: a review of pro-apoptotic and antiapoptotic pathways and dysregulation in disease. *J Vet Emerg Crit Care* 2008;18:572-85.
163. Wajant H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* 2002; 296:1635-6.
164. Schutze S, Tchikov V, Schneider-Brachert W. Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9:655-62.
165. Mehlen P, Bredesen DE. Dependence receptors: from basic research to drug development. *Sci Signal* 2011; 4: mr2.

166. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* 2012;19:107-20.
167. Wickman G, Julian L, Olson MF. How apoptotic cells aid in the removal of their own cold dead bodies. *Cell Death Differ* 2012;19:735-42.
168. Overbeeke R, Steffens-Nakken H, Vermes I, Reutelingsperger C, Haanen C. Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays. *Apoptosis* 1998;3:115-21.
169. Savill J, Fadok V, Henson P, Haslett C. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today* 1993;14:131-36.
170. Lotze MT, Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol* 2005;5:331-42.
171. Michlewska S, McColl A, Rossi AG, Megson IL, Dransfield I. Clearance of dying cells and autoimmunity. *Autoimmunity* 2007; 40:267-73.
172. Lauber K, Bohn E, Kröber SM, Xiao YJ, Blumenthal SG, Lindemann RK, et al. Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell* 2003;113:717-30.
173. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 1992;148:2207-16.
174. Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* 1998;101:890-8.
175. Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR, Girkontaite I. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 1997;390:350-1.

176. Gaipf US, Kuenkele S, Voll RE, Beyer TD, Kolowos W, Heyder P, et al. Complement binding is an early feature of necrotic and a rather late event during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 2001;8:327-34.
177. Gaipf US, Beyer TD, Heyder P, Kuenkele S, Bottcher A, Voll RE, et al. Cooperation between C1q and DNase I in the clearance of necrotic cell-derived chromatin. *Arthritis Rheum* 2004;50:640-49.
178. Mannherz HG, Kabsch W, Suck D, Friebel K, Frimmer M. Crystallization of cytoplasmic actin in complex with deoxyribonuclease I. *Biochem J* 1985;225:517-22.
179. Martin DA, Elkon KB. Apoptosis. In: Wallace DJ, Hahn BH (eds.). *Dubois' Lupus Erythematosus*. 7th ed. Chicago: Lippincott Williams & Wilkins 2007.p. 118-32.
180. Xu W, Roos A, Schlagwein N, Woltman AM, Daha MR, van Kooten C. IL-10-producing macrophages preferentially clear early apoptotic cells. *Blood* 2006; 107: 4930-7.
181. Shao WH, Cohen PL. Disturbances of apoptotic cell clearance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 2011;13:202.
182. Baumann I, Kolowos W, Voll RE, Manger B, Gaipf U, Neuhuber WL, et al. Impaired uptake of apoptotic cells into tingible body macrophages in germinal centers of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2002;46:191-201.
183. Kluz J, Kopec W, Jakobsche-Policht U, Adamiec R. Circulating endothelial cells, endothelial apoptosis and soluble markers of endothelial dysfunction in patients with systemic lupus erythematosus-related vasculitis. *Int Angiol* 2009, 28:192-201.
184. Midgley A, McLaren Z, Moots RJ, Edwards SW, Beresford MW. The role of neutrophil apoptosis in juvenile-onset systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2009;60:2390-401.

185. Emlen W, Niebur J, Kadera R. Accelerated in vitro apoptosis of lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 1994;152:3685-92.
186. Caricchio R, McPhie L, Cohen PL. Ultraviolet B radiation-induced cell death: critical role of ultraviolet dose in inflammation and lupus autoantigen redistribution. *J Immunol* 2003;171:5778-86.
187. Papadaki HA, Boumpas DT, Gibson FM, Jayne DR, Axford JS, Gordon-Smith EC, et al. Increased apoptosis of bone marrow CD34+ cells and impaired function of bone marrow stromal cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Br J Haematol* 2001;115:167-74.
188. Tas SW, Quartier P, Botto M, Fossati-Jimack L. Macrophages from patients with SLE and rheumatoid arthritis have defective adhesion in vitro, while only SLE macrophages have impaired uptake of apoptotic cells. *Ann Rheum Dis* 2006;65:216-21.
189. Bengtsson AA, Gullstrand B, Truedsson L, Sturfelt G. SLE serum induces classical caspase-dependent apoptosis independent of death receptors. *Clin Immunol* 2008;126:57-66.
190. Urbonaviciute V, Furnrohr BG, Meister S, Munoz L, Heyder P, De Marchis F, et al. Induction of inflammatory and immune responses by HMGB1-nucleosome complexes: implications for the pathogenesis of SLE. *J Exp Med* 2008;205:3007-18.
191. Barkauskaite V, Ek M, Popovic K, Harris HE, Wahren-Herlenius M, Nyberg F. Translocation of the novel cytokine HMGB1 to the cytoplasm and extracellular space coincides with the peak of clinical activity in experimentally UV-induced lesions of cutaneous lupus erythematosus. *Lupus* 2007;16:794-802.
192. Popovic K, Ek M, Espinosa A, Padyukov L, Harris HE, Wahren-Herlenius M, et al. Increased expression of the novel proinflammatory cytokine high mobility group box chromosomal protein 1 in skin lesions of patients with lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2005;52:3639-45.

193. Dignat-Georg F, Camoin-Jau L, Sabatier F, Arnoux D, Anfosso F, Bardin N, et al. Endothelial microparticles: a potential contribution to the thrombotic complications of the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 2004;91:667-73.
194. Neeli I, Dwivedi N, Khan S, Radic M. Regulation of extracellular chromatin release from neutrophils. *J Innate Immun* 2009;1:194-201.
195. Hakkim A, Furnrohr BG, Amann K, Laube B, Abed UA, Brinkmann V, et al. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:9813-8.
196. Norris DA. Pathomechanisms of photosensitive lupus erythematosus. *J Invest Dermatol* 1993;100 (Suppl):58-68.
197. Furukawa F, Lyons MB, Lee LA, Coulter SN, Norris DA. Estradiol enhanced binding to cultured human keratinocytes of antibodies specific for SS-A/Ro and SS-B/La: another possible mechanism for estradiol influence of lupus erythematosus. *J Immunol* 1988;141:1480-8.
198. Furukawa F, Kashihara SM, Lyon MB, Norris DA. Binding of antibodies to the extractable nuclear antigens SS-A/Ro and SS-B/La is induced on the surface of human keratinocytes by ultraviolet light (UVL): implications for the pathogenesis of photosensitive cutaneous lupus. *J Invest Dermatol* 1990;94:77-85.
199. Chung JH, Kwon OS, Eun HC, Youn JI, Song YW, Kim JG, et al. Apoptosis in the Pathogenesis of Cutaneous Lupus Erythematosus. *Am J Dermatopathol* 1998;20:233-41.
200. Kuhn A, Herrmann M, Kleber S, Beckmann-Welle M, Fehsel K, Martin-Villalba A, et al. Accumulation of apoptotic cells in the epidermis of patients with cutaneous lupus erythematosus after ultraviolet irradiation. *Arthritis Rheum* 2006;54:939-50.
201. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992;119:493-501.

202. Kockx MM, Muhring J, Knaapen MW, de Meyer GR. RNA synthesis and splicing interferes with DNA in situ end labeling techniques used to detect apoptosis. *Am J Pathol* 1998;152:885-8.
203. Duan WR, Garner DS, Williams SD, Funckes-Shippy CL, Spath IS, Blomme EA. Comparison of immunohistochemistry for activated caspase-3 and cleaved cytokeratin 18 with the TUNEL method for quantification of apoptosis in histological sections of PC-3 subcutaneous xenografts. *J Pathol* 2003; 199: 221-8.
204. Sachs, F. Uber die Nuclease. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 1905; 46:337-53.
205. Takeshita H, Mogi K, Yasuda T, Nakajima T, Nakashima Y, Mori S, et al. Mammalian deoxyribonucleases I are classified into three types: pancreas, parotid, and pancreas-parotid (mixed), based on differences in their tissue concentrations. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;269:481-4.
206. Yasuda T, Awazu S, Sato W, Iida R, Tanaka Y, Kishi K. Human genetically polymorphic deoxyribonuclease: purification, characterization, and multiplicity of urine deoxyribonuclease I. *J Biochem* 1990;108:393-8.
207. Lazarides E, Lindberg U. Actin is the naturally occurring inhibitor of deoxyribonuclease I. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974;71:4742-6.
208. Zahm JM, Debordeaux C, Maurer C, Hubert D, Dusser D, Bonnet N, et al. Improved activity of an actin-resistant DNase I variant on the cystic fibrosis airway secretions. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:1153-7.
209. Hitchcock SE, Carisson L, Lindberg U. Depolymerization of F-actin by deoxyribonuclease I. *Cell* 1976;7:531-42.
210. Mannherz HG, Peitsch MC, Zanotti S, Paddenbergh R, Polzar B. A new function for an old enzyme: the role of DNase I in apoptosis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1995;198:161-74.
211. Suck D. DNA recognition by DNase I. *J Mol Recognit* 1994;7:765-70.
212. Napirei M, Ricken A, Eulitz D, Knoop H, Mannherz HG. Expression pattern of the Deoxyribonuclease 1 gene: lessons from the Dnase1 knockout mouse *Biochem J* 2004;380:929-37.

213. Jones SJ, Worrall AF, Connolly BA. Site-directed mutagenesis of the catalytic residues of bovine pancreatic deoxyribonuclease I. *J Mol Biol* 1996;264:1154-63.
214. Oefner C, Suck D. Crystallographic refinement and structure of DNase I at 2 Å resolution. *J Mol Biol* 1986;192:605-32.
215. Yasuda T, Kishi K, Yanagawa Y, Yoshida A. Structure of the human deoxyribonuclease I (DNase I) gene: identification of the nucleotide substitution that generates its classical genetic polymorphism. *Ann Hum Genet* 1995;59:1-15.
216. Rodriguez AM, Rodin D, Nomura H, Morton CC, Weremowicz S, Schneider MC. Identification, localization, and expression of two novel human genes similar to deoxyribonuclease I. *Genomics* 1997;42:507-13.
217. Fujihara J, Yasuda T, Ueki M, Iida R, Takeshita H. Comparative biochemical properties of vertebrate deoxyribonuclease I. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2012;163:263-73.
218. Martínez Valle F, Balada E, Ordi-Ros J, Vilardell-Tarres M. DNase 1 and systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 2008;7: 359-63.
219. Fujihara J, Tabuchi M, Inoue T, Yasuda T, Fujita Y, Takeshita H. Rapid measurement of deoxyribonuclease I activity with the use of microchip electrophoresis based on DNA degradation. *Anal Biochem* 2011;413:78-9.
220. Nadano D, Yasuda T, Kishi K. Measurement of deoxyribonuclease I activity in human tissues and body fluids by a single radial enzyme-diffusion method. *Clin Chem* 1993;39: 448-52.
221. Polzar B, Zanotti S, Stephan H, Rauch F, Peitsch MC, Irmeler M, et al. Distribution of deoxyribonuclease I in rat tissues and its correlation to cellular turnover and apoptosis (programmed cell death). *Eur J Cell Biol* 1994;64:200-10.
222. Oliveri M, Daga A, Cantoni C, Lunardi C, Millo R, Puccetti A. DNase I mediates internucleosomal DNA degradation in human cells undergoing drug-induced apoptosis. *Eur J Immunol* 2001;31:743-51.

223. Oliveri M, Daga A, Lunardi C, Navone R, Millo R, Puccetti A. DNase I behaves as a transcription factor which modulates Fas expression in human cells. *Eur J Immunol* 2004;34:273-9.
224. Napirei M, Wulf S, Mannherz HG. Chromatin Breakdown During Necrosis by Serum Dnase1 and the Plasminogen System. *Arthritis Rheum* 2004;50:1873-83.
225. Tsukumo S, Yasutomo K. DNase I in pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol* 2004;113:14-8.
226. Vyse TJ, Kotzin BL. Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Annu Rev Immunol* 1998;16:261- 92.
227. Chitrabamrung S, Rubin RL, Tan EM. Serum deoxyribonuclease I and clinical activity in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* 1981;1:55- 60.
228. Napirei M, Karsunky H, Zevnik B, Stephan H, Mannherz HG, Moroy T. Features of systemic lupus erythematosus in Dnase1-deficient mice. *Nat Genet* 2000;25:177-81.
229. Macanovic M, Lachmann PJ. Measurement of deoxyribonuclease I (DNase) in the serum and urine of systemic lupus erythematosus (SLE)-prone NZB/NZW mice by a new radial enzyme diffusion assay. *Clin Exp Immunol* 1997;108:220-6.
230. Fenton K, Fismen S, Hedberg A, Seredkina N, Fenton C, Mortensen ES, et al. Anti-dsDNA Antibodies Promote Initiation, and Acquired Loss of Renal Dnase1 Promotes Progression of Lupus Nephritis in Autoimmune (NZBxNZW)F1 Mice. *PLoS ONE* 2009;4:e8474.
231. Martinez-Valle F, Balada E, Ordi-Ros J, Bujan-Rivas S, Sellas-Fernandez A, Vilardell-Tarres M. DNase 1 activity in patients with systemic lupus erythematosus: relationship with epidemiological, clinical, immunological and therapeutical features. *Lupus* 2009;18:418-23.
232. Sallai K, Nagy E, Derfalvy B, Müzes G, Gergely P. Antinucleosome antibodies and decreased deoxyribonuclease activity in sera of patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005;12:56-9.

233. Martinez-Valle F, Balada E, Ordi-Ros J, Bujan-Rivas S, Sellas-Fernandez A, Vilardell-Tarres M. DNase1 activity in systemic lupus erythematosus patients with and without nephropathy. *Rheumatol Int* 2010;30:1601-4.
- 234. Skiljevic D, Jeremic I, Nikolic M, Andrejevic S, Sefik-Bukilica M, Stojimirovic B, Bonaci-Nikolic B. Serum DNase I activity in systemic lupus erythematosus: correlation with immunoserological markers, the disease activity and organ involvement. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:1083-91.**
235. Bodaño A, González A, Ferreiros-Vidal I, Balada E, Ordi J, Carreira P, et al. Association of a non-synonymous single-nucleotide polymorphism of DNASE1 with SLE susceptibility. *Rheumatology* 2006;45:819-23.
236. Leffler J, Gullstrand B, Jonsen A, Nilsson JA, Martin M, Blom AM, et al. Degradation of neutrophil extracellular traps co-varies with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 2013;15:R84.
237. Yasutomo K, Horiuchi T, Kagami S, Tsukamoto H, Hashimura C, Urushihara M, et al. Mutation of DNASE1 in people with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* 2001;28:313-14.
238. Simmonds MJ, Heward JM, Kelly MA, Allahabadia A, Foxall H, Gordon C, et al. A nonsense mutation in exon 2 of the DNase I gene is not present in UK subjects with systemic lupus erythematosus and Graves' disease: comment on the article by Rood et al. *Arthritis Rheum* 2002;46:3109-10.
239. Chakraborty P, Hadj Kacem H, Makni-Karray K, Jarraya F, Hachicha J, Ayadi H. The A/T mutation in exon 2 of the DNase I gene is not present in Tunisian patients with systemic lupus erythematosus or in healthy subjects. *Arthritis Rheum* 2003;48:3297-8.
240. Shin HD, Park BL, Kim LH, Lee HS, Kim TY, Bae SC. Common DNase I polymorphism associated with autoantibody production among systemic lupus erythematosus patients. *Hum Mol Genet* 2004;13:2343-50.
241. Tew MB, Johnson RW, Reveille JD, Tan FK. A molecular analysis of the low serum deoxyribonuclease activity in lupus patients. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 2446-7.

242. Drosera M, Facchetti F, Landolfo L, Mondini M, Nyberg F, Parodi A, et al. Role of soluble and cell surface molecules in the pathogenesis of autoimmune skin diseases. *Clin Exp Rheumatol* 2006;24(Suppl 40):S7-S13.
243. Yeh TM, Chang HC, Liang CC, Wu JJ, Liu MF. Desoxyribonuclease-inhibitory antibodies in systemic lupus erythematosus. *J Biomed Sci* 2003;10:544-51.
244. Puccetti A, Madaio MP, Bellese G, Migliorini P. Anti-DNA Antibodies Bind to DNase I. *J Exp Med* 1995;181:1797-804.
245. Hedberg A, Fismen S, Fenton KA, Mortensen ES, Rekvig OP. Deposition of chromatin-IgG complexes in skin of nephritic MRL-lpr/lpr mice is associated with increased local matrix metalloprotease activities. *Exp Dermatol* 2010; 19: e265–e274.
246. Lachmann PJ. Lupus and desoxyribonuclease. *Lupus* 2003;12:202–6.
247. Lachmann PJ. Allergic reactions, connective tissue, and disease. *Sci Basis Med Annu Rev* 1967:36–58.
248. Davis JC, et al. Recombinant human Dnase I (rhDNase) in patients with lupus nephritis. *Lupus* 1999;8:68–76.
249. Macanovic M, Sinicropi D, Shak S, Baughman S, Thiru S, Lachmann PJ. The treatment of systemic lupus erythematosus (SLE) in NZB/W F1 hybrid mice; studies with recombinant murine DNase and with dexamethasone. *Clin Exp Immunol* 1996;106:243–52.
250. Verthelyi D, Dybdal N, Elias KA, Klinman DM. DNase treatment does not improve the survival of lupus prone (NZB6NZW)F1 mice. *Lupus* 1998;7:223-30.
251. Shak S, Capon DJ, Hellmiss R, Marsters SA, Baker CL. Recombinant human DNase I reduces the viscosity of cystic fibrosis sputum. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:9188–92.
252. Malíčková K, Duricová D, Bortlík M, Hrušková Z, Svobodová B, Machková N, et al. Impaired Deoxyribonuclease I Activity in Patients with Inflammatory Bowel Diseases. *Autoimmune Dis* 2011; 2011:945861.

253. Kuribara J, Tada H, Kawai Y, Kawaguchi R, Hoshizaki H, Arakawa K, et al. Levels of serum deoxyribonuclease I activity on admission in patients with acute myocardial infarction can be useful in predicting left ventricular enlargement due to remodeling. *J Cardiol* 2009;53:196-203.
254. Li GH, Shi Y, Chen Y, Sun M, Sader S, Maekawa Y, et al. Gelsolin Regulates Cardiac Remodeling After Myocardial Infarction Through DNase I-Mediated Apoptosis. *Circ Res* 2009;104:896-904.
255. Rosner K, Kasprzak MF, Horenstein AC, Thurston HL, Abrams J, Kerwin LY, et al. Engineering a waste management enzyme to overcome cancer resistance to apoptosis: adding DNase1 to the anti-cancer toolbox. *Cancer Gene Therapy* 2011;18:346-57.
256. Rosner K. DNase1: a new personalized therapy for cancer? *Expert Rev Anticancer Ther* 2011; 11:981-4.
257. Romero-Diaz J, Vargas-Vorackova F, Kimura-Hayama E, Cortazar-Benitez LF, Gijon-Mitre R, Criales S, et al. Systemic lupus erythematosus risk factors for coronary artery calcifications. *Rheumatology* 2012;51:110-9.
258. Sen F, Rassidakis GZ, Jones D, Medeiros LJ. Apoptosis and proliferation in subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma. *Mod Pathol*. 2002;15:625-31.
259. Agmon-Levin N, Mosca M, Petri M, Shoenfeld Y. Systemic lupus erythematosus - one disease or many? *Autoimmun Rev* 2012;11:593-5.
260. Ahearn JM, Liu CC, Kao AH, Manzi S. Biomarkers for systemic lupus erythematosus. *Transl Res* 2012;159:326-42.
261. Dieker JW, van der Vlag J, Berden JH. Triggers for anti-chromatin autoantibody production in SLE. *Lupus* 2002;11:856-64.
262. Frost PG, Lachmann PJ. The relationship of desoxyribonuclease inhibitor levels in human sera to the occurrence of antinuclear antibodies. *Clin Exp Immunol* 1968;3:447-55.
263. Pisetsky DS, Jiang N. The generation of extracellular DNA in SLE: the role of death and sex. *Scand J Immunol* 2006; 64: 200-4.

264. Lockshin MD. Invited review: sex ratio and rheumatic disease. *J Appl Physiol* 2001;91:2366-73.
265. Bartoloni E, Ludovini V, Alunno A, Pistola L, Bistoni O, Crino L, et al. Increased levels of circulating DNA in patients with systemic autoimmune diseases: A possible marker of disease activity in Sjogren's syndrome. *Lupus* 2011;20:928-35.
266. Baranovskii AG, Buneva VN, Nevinsky GA. Human deoxyribonucleases. *Biochemistry (Mosc)* 2004;69:587-601.
267. Shuster AM, Gololobov GV, Kvashuk OA, Bogomolova AE, Smirnov IV, Gabibov AG. DNA hydrolyzing autoantibodies. *Science* 1992;256:665-7.
268. Lahm A, Suck D. DNase I-induced DNA conformation. 2 A structure of a DNase I - octamer complex. *J Mol Biol* 1991;222:645-67.
269. Wallace DJ. Serum and Plasma Protein Abnormalities and Other Clinical Laboratory Determinations in Systemic Lupus Erythematosus. In: Wallace DJ, Hahn BH, editors. *Dubois' Lupus Erythematosus*, 7th ed. Chicago: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.p.911-9.
270. Reefman E, Kuiper H, Jonkman MF, Limburg PC, Kallenberg CG, Bijl M. Skin sensitivity to UVB irradiation in systemic lupus erythematosus is not related to the level of apoptosis induction in keratinocytes. *Rheumatology (Oxford)* 2006;45:538-44.
271. Reefman E, de Jong MC, Kuiper H, Jonkman MF, Limburg PC, Kallenberg CG, et al. Is disturbed clearance of apoptotic keratinocytes responsible for UVB-induced inflammatory skin lesions in systemic lupus erythematosus? *Arthritis Res Ther* 2006;8:R156.
272. Golan TD, Elkon KB, Gharavi AE, Krueger JG. Enhanced membrane binding of autoantibodies to cultured keratinocytes of systemic lupus erythematosus patients after ultraviolet B/ultraviolet A irradiation. *J Clin Invest* 1992;90:1067-76.
273. LeFeber WP, Norris DA, Ryan SR, Huff JC, Lee LA, Kubo M, Boyce ST, Kotzin BL, Weston WL: Ultraviolet light induces binding of antibodies to

selected nuclear antigens on cultured human keratinocytes. *J Clin Invest* 1984;74:1545-51.

274. Casciola-Rosen LA, Anhalt G, Rosen A. Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J Exp Med* 1994;179:1317-30.

275. Chung JH, Kwon OS, Eun HC, Youn JI, Song YW, Kim JG, et al. Apoptosis in the pathogenesis of cutaneous lupus erythematosus. *Am J Dermatopathol* 1998;20:233-41.

276. Ren Y, Tang J, Mok MY, Chan AW, Wu A, Lau CS. Increased apoptotic neutrophils and macrophages and impaired macrophage phagocytic clearance of apoptotic neutrophils in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2003;48:2888-97.

277. Gaipf US, Brunner J, Beyer TD, Voll RE, Kalden JR, Herrmann M. Disposal of dying cells: A balancing act between infection and autoimmunity. *Arthritis Rheum* 2003;48:6-11.

278. Sheriff A, Gaipf US, Voll RE, Kalden JR, Herrmann M. Apoptosis and systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am* 2004;30:505-27.

279. Gaipf US, Kuhn , Sheriff A, Munoz LE, Franz S, Voll RE, et al. Clearance of Apoptotic Cells in Human SLE. In: *Current Directions in Autoimmunity Vol. 9*, Theofilopoulos AN (Editor). Basel: Karger AG;2006.p. 173-188.

280. Salem SA, Farouk HM, Mostafa AA, Hassan IM, Osman WM, Al-Shamy HA, et al. Keratinocyte and lymphocyte apoptosis: relation to disease outcome in systemic lupus erythematosus patients with and without cutaneous manifestations. *Eur J Dermatol* 2010;20:35-41.

281. Jin O, Sun LY, Zhou KX, Zhang XS, Feng XB, Mok MY, et al. Lymphocyte apoptosis and macrophage function: correlation with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* 2005;24:107-10.

282. Zamolo G, Coklo M, Santini Dusevic D, Kastelan M, Batinac T, Materljan E, et al. Expression of p53 and apoptosis in discoid lupus erythematosus. *Croat Med J* 2005;46:678-84.

283. Burnham TK, Neblett TR, Fine G. The application of fluorescent antibody technique to the investigation of lupus erythematosus and various other dermatoses. *J Invest Dermatol* 1963;41:451-6.
284. Gilliam JN. The significance of cutaneous immunoglobulin deposition in lupus erythematosus and NZB/NZW F1 hybrid mice. *J Invest Dermatol* 1975; 65:154-61.
285. Fisman S, Hedberg A, Fenton KA, Jacobsen S, Krarup E, Kamper AL, et al. Circulating chromatin-anti-chromatin antibody complexes bind with high affinity to dermo-epidermal structures in murine and human lupus nephritis. *Lupus*. 2009;18:597-607.
286. Kavanagh D, Spitzer D, Kothari PH, Shaikh A, Liszewski MK, Richards A, Atkinson JP. New roles for the major human 3'-5' exonuclease TREX1 in human disease. *Cell Cycle* 2008;7:1718-25.

PRILOG 1 - SLEDAI - 2K (84)

Vrednost deskriptora se unosi ukoliko je simptom/znak bio prisutan prilikom pregleda ili u prethodnih 10 dana.

SLEDAI 2K	Descriptor	Definition
Weight	SCORE	
8	_____ Seizure	Recent onset, exclude metabolic, infectious or drug causes.
8	_____ Psychosis	Altered ability to function in normal activity due to severe disturbance in the perception of reality. Include hallucinations, incoherence, marked loose associations, impoverished thought content, marked illogical thinking, bizarre, disorganized, or catatonic behavior. Exclude uremia and drug causes
8	_____ Organic brain syndrome	Altered mental function with impaired orientation, memory, or other intellectual function, with rapid onset and fluctuating clinical features, inability to sustain attention to environment, plus at least 2 of the following: perceptual disturbance, incoherent speech, insomnia or daytime drowsiness, or increased or decreased psychomotor activity. Exclude metabolic, infectious, or drug causes.
8	_____ Visual disturbance	Retinal changes of SLE. Include cytooid bodies, retinal hemorrhages, serous exudate or hemorrhages in the choroid, or optic neuritis. Exclude hypertension, infection, or drug causes.
8	_____ Cranial nerve disorder	New onset of sensory or motor neuropathy involving cranial nerves.
8	_____ Lupus headache	Severe, persistent headache; may be migrainous, but must be nonresponsive to narcotic analgesia.
8	_____ CVA	New onset of cerebrovascular accident(s). Exclude arteriosclerosis.
8	_____ Vasculitis	Ulceration, gangrene, tender finger nodules, periungual infarction, splinter hemorrhages, or biopsy or angiogram proof of vasculitis.
4	_____ Arthritis	≥ 2 joints with pain and signs of inflammation (i.e., tenderness, swelling or effusion).
4	_____ Myositis	Proximal muscle aching/weakness, associated with elevated creatine phosphokinase/aldolase or electromyogram changes or a biopsy showing myositis.

PRILOG 1 - SLEDAI - 2K, nastavak

4	_____	Urinary casts	Heme-granular or red blood cell casts.
4	_____	Hematuria	>5 red blood cells/high power field. Exclude stone, infection or other cause.
4	_____	Proteinuria	>0.5 gram/24 hours
4	_____	Pyuria	>5 white blood cells/high power field. Exclude infection.
2	_____	Rash	Inflammatory type rash.
2	_____	Alopecia	Abnormal, patchy or diffuse loss of hair.
2	_____	Mucosal ulcers	Oral or nasal ulcerations.
2	_____	Pleurisy	Pleuritic chest pain with pleural rub or effusion, or pleural thickening.
2	_____	Pericarditis	Pericardial pain with at least 1 of the following: rub, effusion, or electrocardiogram or echocardiogram confirmation.
2	_____	Low complement	Decrease in CH50, C3, or C4 below the lower limit of normal for testing laboratory
2	_____	Increased DNA binding	Increased DNA binding by Farr assay above normal range for testing laboratory.
1	_____	Fever	>38o C. Exclude infectious cause.
1	_____	Thrombocytopenia	<100,000 platelets / x10 ⁹ /L, exclude drug causes.
1	_____	Leukopenia	< 3,000 white blood cells / x10 ⁹ /L, exclude drug causes.

TOTAL SCORE: _____

PRILOG 2 - SLICC/ACR indeks (85)

Table 1. Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index for Systemic Lupus Erythematosus*

Item	Score
Ocular (either eye, by clinical assessment)	
Any cataract ever	1
Retinal change <i>or</i> optic atrophy	1
Neuropsychiatric	
Cognitive impairment (e.g., memory deficit, difficulty with calculation, poor concentration, difficulty in spoken or written language, impaired performance level) <i>or</i> major psychosis	1
Seizures requiring therapy for 6 months	1
Cerebrovascular accident ever (score 2 if >1)	1 (2)
Cranial or peripheral neuropathy (excluding optic)	1
Transverse myelitis	1
Renal	
Estimated or measured glomerular filtration rate <50%	1
Proteinuria ≥ 3.5 gm/24 hours	1
<i>or</i>	
End-stage renal disease (regardless of dialysis or transplantation)	3
Pulmonary	
Pulmonary hypertension (right ventricular prominence, or loud P2)	1
Pulmonary fibrosis (physical and radiograph)	1
Shrinking lung (radiograph)	1
Pleural fibrosis (radiograph)	1
Pulmonary infarction (radiograph)	1
Cardiovascular	
Angina <i>or</i> coronary artery bypass	1
Myocardial infarction ever (score 2 if >1)	1 (2)
Cardiomyopathy (ventricular dysfunction)	1
Valvular disease (diastolic, murmur, or systolic murmur >3/6)	1
Pericarditis for 6 months, <i>or</i> pericardiectomy	1
Peripheral vascular	
Claudication for 6 months	1
Minor tissue loss (pulp space)	1
Significant tissue loss ever (e.g., loss of digit or limb) (score 2 if >1 site)	1 (2)
Venous thrombosis with swelling, ulceration, <i>or</i> venous stasis	1
Gastrointestinal	
Infarction or resection of bowel below duodenum, spleen, liver, or gall bladder ever, for cause any (score 2 if >1 site)	1 (2)
Mesenteric insufficiency	1
Chronic peritonitis	1
Stricture <i>or</i> upper gastrointestinal tract surgery ever	1
Musculoskeletal	
Muscle atrophy or weakness	1
Deforming or erosive arthritis (including reducible deformities, excluding avascular necrosis)	1
Osteoporosis with fracture or vertebral collapse (excluding avascular necrosis)	1
Avascular necrosis (score 2 if >1)	1 (2)
Osteomyelitis	1
Skin	
Scarring chronic alopecia	1
Extensive scarring or panniculum other than scalp and pulp space	1
Skin ulceration (excluding thrombosis) for >6 months	1
Premature gonadal failure	1
Diabetes (regardless of treatment)	1
Malignancy (exclude dysplasia) (score 2 if >1 site)	1 (2)

* Damage (nonreversible change, not related to active inflammation) occurring since onset of lupus, ascertained by clinical assessment and present for at least **6 months** unless otherwise stated. Repeat episodes must occur at least 6 months apart to score 2. The same lesion cannot be scored twice.

PRILOG 3 - CLASI skor (140)

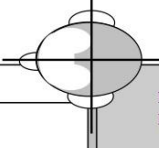
Select the score in each anatomical location that describes them ost severely affected cutaneous lupus-associated lesion

E x t e n s i o n	activity			damage		
	Anatomical Location	Erythema	Scale/ Hypertrophy	Dyspigmentation	Scarring/ Atrophy/ Panniculitis	Anatomical Location
		0-absent 1-pink; faint erythema 2- red; 3-dark red; purple/violaceous/ crusted/ hemorrhagic	0-absent; 1-scale 2-verrucous/ hypertrophic	0-absent, 1-dyspigmentaton	0 – absent 1 – scarring 2 – severely atrophic scarring or panniculitis	
	Scalp				See below	Scalp
	Ears					Ears
	Nose (incl. malar area)					Nose (incl. malar area)
	Rest of the face					Rest of the face
	V-area neck (frontal)					V-area neck (frontal)
	Post. Neck &/or shoulders					Post. Neck &/or shoulders
	Chest					Chest
	Abdomen					Abdomen
	Back, buttocks					Back, buttocks
	Arms					Arms
	Hands					Hands
	Legs					Legs
	Feet					Feet

Mucous membrane

Mucous membrane lesions (examine if patient confirms involvement)	Report duration of dyspigmentation after active lesions have resolved (verbal report by patient – tick appropriate box)
0-absent; 1-lesion or ulceration	<input type="checkbox"/> dyspigmentation usually lasts less than 12 months (The dyspigmentation score above remains the same) <input type="checkbox"/> dyspigmentation usually lasts at least 12 months (The dyspigmentation above score is multiplied by two)

Alopecia

Recent Hair loss (within the last 30 days / as reported by patient)		NB: if scarring and non-scarring aspects seem to coexist in one lesion, please score both
1-Yes 0-No		
Divide the scalp into four quadrants as shown. The dividing line between right and left is the midline. The dividing line between frontal and occipital is the line connecting the highest points of the ear lobe. A quadrant is considered affected if there is a lesion within the quadrant.		
Alopecia (clinically not obviously scarred)	Scarring of the scalp (judged clinically)	
0-absent 1-diffuse; non-inflammatory 2-focal or patchy in one quadrant; 3-focal or patchy in more than one quadrant	0- absent 3- in one quadrant 4- two quadrants 5- three quadrants 6- affects the whole skull	

Total Activity Score
(For the activity score please add up the cores of the left side i.e. for Erythema, Scale/Hypertrophy, Mucous membrane involvement and Alopecia)

Total Damage Score
(For the damage score, please add up the cores of the right side, i.e. for Dyspigmentation, Scarring/Atrophy/Panniculitis and Scarring of the Scalp)

PRILOG 4 - RCLASI skor (145)

Revised Cutaneous Lupus Erythematosus Disease Area and Severity Index (RCLASI)*

[*CLASI modified after Albrecht et al. Invest Dermatol 125:889-94, 2005]

Center No. **Date** DAY MONTH YEAR **Name of Physician** FIRST NAME (INITIAL) SURNAME

PATIENT

▶ **Patient No.** ▶ **Date of birth** YEAR ▶ **Sex** male female ▶ **Initials** [second letter of first name and surname] INITIALS

SKIN LESIONS

▶ Select the score in each site of involvement that describes the most severely affected LE-specific lesion.

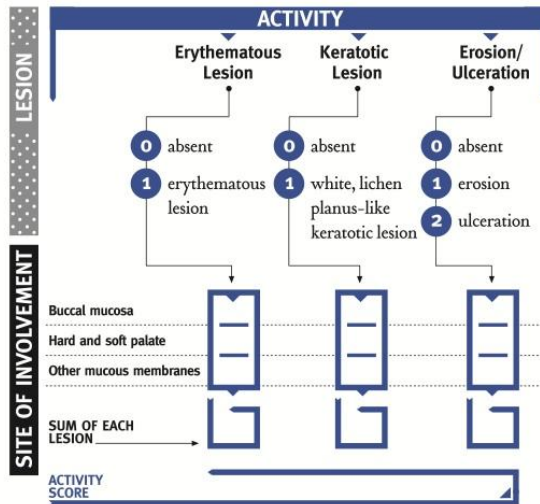
SITE OF INVOLVEMENT	ACTIVITY				DAMAGE	
	Erythema	Scaling / Hyperkeratosis	Edema / Infiltration	Subcutaneous Nodule / Plaque	Dyspigmentation	Scarring / Atrophy
Scalp	0 absent	0 absent	0 absent	0 absent	0 absent	0 absent
Ears	1 pink, faint	1a circumscribed annular/papulosquamous-psoriasiform scaling	1 slight, just palpable	1 subcutaneous induration	1a hypo-pigmentation	1 initial scarring
Nose &/or malar area	2 red	1b circumscribed adherent scaling/follicular plugging	2 palpable & visible	2 ulceration of subcutaneous nodule/plaque	1b hyper-pigmentation	2a severe firm/atrophic/verrucular scarring
Lips	3 dark red, purple/violaceous/crusted/hemorrhagic	2 verrucous hyperkeratosis			2 hypo- & hyper-pigmentation	2b lipatrophy
Rest of face						
V-area of the neck (frontal)						
Post. neck &/or shoulders						
Chest						
Abdomen						
Back, buttocks						
Arms						
Hands						
Legs						
Feet						
	SUM OF EACH LESION	SUM OF EACH LESION	SUM OF EACH LESION	SUM OF EACH LESION	SUM OF EACH LESION	SUM OF EACH LESION
	ACTIVITY SCORE				DAMAGE SCORE	

SKIN LESIONS

PRILOG 4 - RCLASI skor, nastavak

MUCOUS MEMBRANE LESIONS

- Select the score in each mucous membrane location that describes the most severely affected LE-specific lesion.



ALOPECIA

- | ACTIVITY |
|--|
| <ul style="list-style-type: none"> Diffuse Alopecia (clinically not scarred) 0 absent 1 slight diffuse effluvium 2 marked diffuse effluvium with partly visible scalp 3 severe diffuse effluvium affecting the whole scalp |
| <ul style="list-style-type: none"> 'Lupus Hair' = 'Wooly Hair' (clinically not scarred) 0 absent 3 thin, weakened hairs that easily fragment above the surface of the scalp (especially at the anterior hairline &/or at the periphery of the scalp) |
| ACTIVITY SCORE |

TOTAL ACTIVITY SCORE

For the total Activity Score please add up the scores of the left side i.e. for Skin lesions, Mucous membrane lesions, and Alopecia (non-scarring).

ALOPECIA

[**Alopecia Score modified after Olsen et al. J Am Acad Dermatol 51:440-447, 2004]



- Scarring Alopecia** Please estimate the percentage (0-100%) of scarring alopecia in each of the four areas (a, b, c, d) using the above diagram**:

- a) Left side: _____ %
 b) Right side: _____ %
 c) Top: _____ %
 d) Back: _____ %

- Calculate the scarring alopecia score (using the estimated percentages from above)**:

- a) Left side: 'estimated percentage' x .18 = _____ %
 b) Right side: 'estimated percentage' x .18 = _____ %
 c) Top: 'estimated percentage' x .40 = _____ %
 d) Back: 'estimated percentage' x .24 = _____ %
 Please add a + b + c + d: _____ %

- Choose the adequate category for the total sum of a, b, c, & d:

- 0 absent
 1 < 5%
 2 5-9%
 3 10-24%
 4 25-49%
 5 50-74%
 6 75-100%

DAMAGE SCORE

TOTAL DAMAGE SCORE

For the total Damage Score please add up the scores of the right side i.e. for Skin lesions and Alopecia (scarring).

BIOGRAFIJA AUTORA

Dr Dušan Škiljević je rođen u Beogradu 1972. godine. Diplomirao je na Medicinskom fakultetu u Beogradu 1997. godine sa prosečnom ocenom 9,61. Na Medicinskom fakultetu u Beogradu 2004. godine odbranio je magistarsku tezu pod nazivom "Korelacija nalaza lupus band testa sa kliničkim i laboratorijskim parametrima kod osoba sa bolestima vezivnog tkiva" pod mentorstvom profesora dr Miloša Nikolića.

Specijalistički staž iz dermatovenerologije na Medicinskom fakultetu u Beogradu obavio je od 1999. do 2002. godine, kada je položio specijalistički ispit. Zaposlen je u Klinici za dermatovenerologiju Kliničkog centra Srbije od 2000. godine. Od 2004. godine radi kao asistent pri Katedri dermatovenerologije Medicinskog fakulteta u Beogradu, a od 2007. do 2011. je bio Sekretar Katedre dermatovenerologije.

Usavršavanja: *research fellowship* iz dermatopatologije na University of Texas, Southwestern Medical Center u Dalasu, USA, 2004-2005. godine; međunarodni kurs dermoskopije, Beograd, 2006. godine.

Bio je mentor u većem broju studentskih radova. Učestvovao je kao predavač po pozivu na 19. Kongresu EADV u Geteborgu 2010. godine i 9. Svetskom Kongres kozmetičke dermatologije u Atini 2013. godine, kao i na brojnim seminarima kontinuirane medicinske edukacije. Autor je i koautor većeg broja radova koji su publikovani u domaćim i stranim časopisima i zbornicima radova. Dr Škiljević je saradnik je na projektu Ministarstva za nauku i životnu sredinu Republike Srbije od 2011. godine.

Bio je sekretar simpozijuma Beogradski dermatološki dani 2006, 2007. i 2011. godine, kao i XVIII Kongresa Udruženja dermatovenerologa Srbije 2009. godine. Sekretar je XI Prolećnog Simpozijuma EADV 2014. godine.

Član je Udruženja dermatovenerologa Srbije, Dermatovenerološke sekcije Srpskog lekarskog društva, gde je bio i sekretar Sekcije (2003-2004) i član Predsedništva (2003-2008), zatim Evropske Akademije za Dermatovenerologiju, Međunarodnog društva za dermoskopiju i Evropskog udruženja za kutani lupus erythematosus.

Govori engleski jezik. Oženjen je i otac jedne kćerke.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani **Dušan Škiljević**

broj upisa _____

Izjavljujem


da je doktorska disertacija pod naslovom

**AKTIVNOST DEZOKSIRIBONUKLEAZE I U SERUMU: KORELACIJA SA KUTANIM, SISTEMSKIM I
IMUNOSEROLOŠKIM PARAMETRIMA KOD PACIJENATA SA LUPUS ERYTHEMATOSUSOM**

- 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, 10.1.2014. godine



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora **Dušan Škiljević**

Broj upisa _____

Studijski program _____

Naslov rada **AKTIVNOST DEZOKSIRIBONUKLEAZE I U SERUMU: KORELACIJA SA KUTANIM, SISTEMSKIM I IMUNOSEROLOŠKIM PARAMETRIMA KOD PACIJENATA SA LUPUS ERYTHEMATOSUSOM**

Mentor **Prof. dr Miloš Nikolić**

Potpisani **Dušan Škiljević**

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, 10.1.2014. godine



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

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

AKTIVNOST DEZOKSIRIBONUKLEAZE I U SERUMU: KORELACIJA SA KUTANIM, SISTEMSKIM I IMUNOSEROLOŠKIM PARAMETRIMA KOD PACIJENATA SA LUPUS ERYTHEMATOSUSOM

koja je moje autorsko delo.

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

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

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

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

Potpis doktoranda

U Beogradu, 10.1.2014. godine

