

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Svetlana P. Popadić

**GENETSKI MARKERI INFLAMACIJE
KOD PACIJENATA SA PSORIASIS
VULGARIS**

Doktorska disertacija

Beograd, 2014.

UNIVERSITY OF BELGRADE

SCHOOL OF MEDICINE

Svetlana P. Popadić

**GENETIC MARKERS OF
INFLAMMATION IN PATIENTS WITH
PSORIASIS VULGARIS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014

Mentor:

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

Komentor:

Prof. dr Vera Pravica, vanredni profesor Medicinskog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije

Prof. dr Miloš Nikolić, redovni profesor Medicinskog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

Doc. dr Snežana Minić, docent Medicinskog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Marija Mostarica Stojković, redovni profesor Medicinskog fakulteta
Univerziteta u Beogradu u penziji

Datum odbrane doktorske disertacije:

Ova disertacija je urađena u Laboratoriji za imunologiju Instituta za mikrobiologiju i imunologiju Univerziteta u Beogradu u okviru projekta osnovnih istraživanja broj 175038 pod nazivom „Imunopatogenetski i regulatorni mehanizmi u autoimunskim bolestima i hroničnoj inflamaciji”, finansiranog od strane Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije.

Zahvalnica

Ovom prilikom osećam potrebu da se zahvalim:

Prof. dr Ljiljani Medenici, mentoru, na tome što mi je pokazala da je sve moguće i da je sve savladivo.

Prof. dr Veri Pravici, komentoru, na savetima, podršci i ukazanom poverenju.

Prof. dr Zorici Ramić, na velikom interesovanju, neizmernoj podršci tokom rada i svesrdnoj pomoći tokom izrade disertacije.

Prof. dr. Milošu Nikoliću, predsedniku komisije za odbranu disertacije na entuzijazmu i korisnim sugestijama.

Doc. dr. Snežani Minić, članu komisije za odbranu disertacije, na pozitivnoj energiji i predusretljivosti.

Prof. dr. Mariji Mostarici Stojković, članu komisije za odbranu disertacije, na stručnim savetima, velikom broju radova i savetima koji su uvek stizali u pravom trenutku.

Prof. dr. Dušanu Popadiću, svom suprugu, na stručnoj pomoći i podršci, bez koje ova disertacija ne bi postojala.

Marku i Jovani na strpljenju, lepim rečima i kritikama koje su me navodile da budem efikasnija.

Jeleni Radunović, najboljoj sestri na svetu.

Svom ocu **Petru Bubulju**, na podršci koju mi je pružao u mojim profesionalnim i životnim usmerenjima.

Zahvaljujem se svim dragim rođacima, prijateljima i kolegama: **Leli, Milanu, Danilu, Dr Tanji Perović, Asist. Emini Milošević, Asist. Srđanu Tanasiloviću, Prof. Vladimiru Trajkoviću i Doc. Milošu Markoviću** na podršci i pomoći tokom rada kao i na brojnim korisnim savetima.

Zbog velike pomoći prilikom prikupljanja uzoraka zahvaljujem se i **Dr. Zorici Špuran** iz Instituta za transfuziju krvi u Beogradu.

Ovaj rad posvećujem svojoj majci

GENETSKI MARKERI INFLAMACIJE KOD PACIJENATA SA PSORIASIS VULGARIS

Svetlana P. Popadić

Sažetak

Uvod: Psorijaza je česta hronična inflamatorna bolest kože zastupljena u oko 2-4% osoba u opštoj populaciji. Prevalencija i incidencija ovog oboljenja pokazuju značajne etničke i geografske varijacije. Dosadašnja istraživanja su pokazala da psorijaza pripada takozvanim kompleksnim genetskim oboljenjima, kod kojih postoji rizik od nasleđivanja bolesti kroz višestruku interakciju gena i faktora spoljašnje sredine. Kod trećine obolelih psorijaza je udružena sa psorijaznim artritismom. S obzirom na tendenciju individualizovanog pristupa u dijagnostici i terapiji složene bolesti kakva je psorijaza, korisno je da se definišu biomarkeri poput polimorfizama pojedinačnih nukleotida koji mogu da pomognu u dijagnostici, klasifikaciji bolesti, prognozi i praćenju terapijskog odgovora.

Ciljevi istraživanja: Ispitati distribucije alela proinflamatornih molekula TNF, IFN-gama, IL-12B podjedinice IL-12 i IL-23, IL-23R i IL-17F u populaciji zdravih ljudi u Srbiji kao i u grupi pacijenata sa psoriasis vulgaris, odrediti da li je neki od ispitivanih polimorfizama faktor rizika za nastanak ove bolesti i uporediti ih sa objavljenim podacima za druge populacije (različiti geografski regioni i etničko poreklo).

Pacijenti i metode: Istraživanje je obuhvatilo 130 pacijenata sa psoriasis vulgaris od kojih je 62 imalo psorijazu tip 1 a 68 psorijazu tip 2 i 306 zdravih kontrola. Procena težine bolesti određivana je PASI skorom a dijagnoza psorijaznog artritisa kod ukupno 26 pacijenata je postavljena na osnovu reumatološkog nalaza. Za detekciju polimorfizma rs2430561 u genu za IFN- γ su dizajnirani oligonukleotidi i optimizovani uslovi za amplifikaciju i razlikovanje alela s obzirom da trenutno ne postoje dostupni komercijalni oligonukleotidi za ovu analizu. Detekcija polimorfizama ostalih molekula (TNF rs1800629; p40 rs3212227; IL17F rs11465553; IL23R rs2201841) vršena je Taqman esejom korišćenjem komercijalno dostupnih smeša oligonukleotida. Za ispitivanje slaganja distribucija dobijenih frekvencija genotipova u populaciji sa očekivanim vrednostima po Hardy-Weinberg ravnoteži, primenjivan je χ^2 test.

Rezultati: U ovom istraživanju utvrđene su distribucije alela ispitivanih gena u uzorku populacije zdravih osoba sa teritorije Republike Srbije i iznosile su: *TNF* (rs1800629) G/A→0,876/0,124; *IFNG* (rs2430561) A/T→0,533/0,467; *IL12B* (rs3212227) A/C→0,817/0,183; *IL23R* (rs2201841) T/C→0,692/0,308; *IL17F* (rs11465553) G/A→0,954/0,046. Frekvencije alela ispitivanih gena kod pacijenata obolelih od psoriasis vulgaris koji su hospitalno lečeni na Klinici za dermatovenerologiju Kliničkog centra Srbije od januara 2012. do decembra 2013 godine iznosile su: *TNF* (rs1800629) G/A→0,904/0,096; *IFNG* (rs2430561) A/T→0,535/0,465; *IL12B* (rs3212227) A/C→0,861/0,139; *IL23R* (rs2201841) T/C→0,632/0,368; *IL17F* (rs11465553) G/A→0,977/0,023.

C alel gena za IL-23R (rs2201841) je bio značajno češći kod pacijenata sa psorijaznim artritismom (76,9%) nego kod kontrola (50,2%) i moguće je da doprinosi nastanku ove bolesti (OR=3,311, 95% IP=1,292–8,704, p=0,009)

Zaključak: Odsustvo G alela rs1800629 polimorfizma gena za TNF je bilo udruženo sa lakšom kliničkom slikom kod pacijenata sa psorijazom. Prisustvo C alela rs2201841 polimorfizma gena za IL-23R povećava rizik za obolevanje od psorijaze i psorijaznog artritisa, dok je T alel ovog polimorfizma protektivan.

KLJUČNE REČI: Psoriasis vulgaris, psorijazni artritis, polimorfizmi pojedinačnih nukleotida, rs1800629, rs2430561, rs3212227, rs2201841, rs11465553, TaqMan

NAUČNA OBLAST: Medicina

UŽA NAUČNA OBLAST: Dermatovenerologija

UDK:

GENETIC MARKERS OF INFLAMMATION IN PATIENTS WITH PSORIASIS VULGARIS

Svetlana P. Popadić

Abstract

Introduction: Psoriasis is a common chronic inflammatory disease of the skin found in approximately 2-4% of individuals in general population. The prevalence and incidence of this disease show significant ethnic and geographic variations. Previous studies have shown that psoriasis belongs to the so-called complex genetic diseases, in which the risk of inheriting the disease appears to be determined through the interaction of multiple genes. Exposure to environmental factors leads to disease development in genetically susceptible individuals. In 30% of patients, psoriasis is associated with psoriatic arthritis. Given the tendency of individual approach to the diagnosis and treatment of complex diseases such as psoriasis, it is useful to define biomarkers such as single nucleotide polymorphisms (SNP). SNP may help in the diagnosis, disease classification, prognosis and monitoring of treatment response.

Aims of the investigation: In this thesis the distribution of alleles of proinflammatory molecules TNF, IFN-gamma, IL-12B subunit of IL-12/23, IL-23R and IL-17F in a population of healthy people in Serbia and in the group of patients with psoriasis vulgaris was examined and compared with published data for other populations (different geographic regions and ethnic background). Further goal was to examine whether any of analysed SNP may be considered as biomarker for psoriasis and psoriatic arthritis susceptibility.

Patients and methods: A total of 130 patients with psoriasis vulgaris (62 with type 1, 68 with type 2 psoriasis) and 306 healthy controls were included in this study. Disease severity was scored by Psoriasis Severity and Area Index (PASI) while diagnosis of psoriatic arthritis in 26 patients was confirmed by experienced rheumatologist. For the detection of gene polymorphism rs2430561 for IFN- γ oligonucleotides were designed and conditions for amplification and differentiation of alleles were optimized, since there are currently no commercially available oligonucleotides for this analysis. Detection of polymorphisms of other molecules (rs1800629 TNF; rs3212227 p40; rs2201841 IL23R; rs11465553 IL17F) was performed by commercial Taqman assays. χ^2 test was applied

for assessment agreement of the obtained genotypes frequency in tested populations with the expected values of the Hardy - Weinberg equilibrium.

Results: In our study, distribution of alleles of the tested genes in a sample population of healthy persons from the territory of the Republic of Serbia, were as follows: *TNF* (rs1800629) G/A→0,876/0,124; *IFNG* (rs2430561) A/T→0,533/0,467; *IL12B* (rs3212227) A/C→0.817/0.183; *IL23R* (rs2201841) T/C→0,692/0,308; *IL17F* (rs11465553) G/A→0,954/0,046.

The distribution of alleles of the tested genes in patients with psoriasis vulgaris hospitalized at the Clinic of Dermatology, Clinical Centre of Serbia from January 2012. to December 2013. were as follows:

TNF (rs1800629) G/A→0,904/0,096; *IFNG* (rs2430561) A/T→0,535/0,465; *IL12B* (rs3212227) A/C → 0,861/0,139; *IL23R* (rs2201841) T/C → 0,632/0,368; *IL17F* (rs11465553) G/A → 0,977/0,023.

IL23R (rs2201841) C allele was significantly more frequent in patients with psoriatic arthritis (76.9%) compared to control subjects (50.2%) and probably increases susceptibility to this disease (OR=3.311, 95% IP=1.292–8.704, p=0.009)

Conclusions: Absence of *TNF* rs1800629 G allele was associated with lower PASI. *IL-23R* rs2201841 C allele carriage increase odds for psoriasis and psoriatic arthritis development, whereas T allele was protective.

KEY WORDS: Psoriasis vulgaris, psoriatic arthritis, single nucleotide polymorphisms, rs1800629, rs2430561, rs3212227, rs2201841, rs11465553, TaqMan

SCIENTIFIC FIELD: Medicine

SPECIALISED SCIENTIFIC FIELD: Dermatovenereology

UDC:

1.	UVOD	1
1.1.	DEFINICIJA PSORIJAZE I EPIDEMIOLOŠKE ODLIKE	2
1.2.	PATOGENEZA PSORIJAZE	2
1.3.	KLINIČKA SLIKA PSORIJAZE	4
1.3.1.	KLASIFIKACIJA PSORIJAZE	4
1.3.1.1.	<i>NEPUSTULOZNI OBLICI PSORIJAZE</i>	4
1.3.1.2.	<i>PUSTULOZNI OBLICI PSORIJAZE</i>	5
1.3.2.	PROCENA AKTIVNOSTI BOLESTI KOD PACIJENATA SA PSORIASIS VULGARIS	6
1.4.	HISTOPATOLOŠKI NALAZ KOD PSORIJAZE	6
1.5.	TERAPIJA PSORIJAZE	7
1.5.1.	LOKALNA TERAPIJA	7
1.5.2.	SISTEMSKA TERAPIJA	7
1.6.	KOMORBIDITET KOD OBOLELIH OD PSORIJAZE	7
1.7.	EKSPERIMENTALNI MODELI PSORIJAZE	8
1.8.	GENETSKA OSNOVA PSORIJAZE	9
1.8.1.	POLIMORFIZMI POJEDINAČNIH NUKLEOTIDA	10
1.8.1.1.	<i>POLIMORFIZAM GENA ZA TNF</i>	11
1.8.1.2.	<i>POLIMORFIZAM GENA ZA IFN-GAMA</i>	12
1.8.1.3.	<i>POLIMORFIZAM GENA ZA IL-12B</i>	13
1.8.1.4.	<i>POLIMORFIZAM GENA ZA IL-23R</i>	13
1.8.1.5.	<i>POLIMORFIZAM GENA ZA IL-17F</i>	13
2.	CILJEVI	15
3.	MATERIJAL I METODE	17
3.1.	PACIJENTI OBOLELI OD PSORIJAZE	18
3.1.1.	SELEKCIJA ISPITANIKA	18
3.1.2.	KRITERIJUMI ZA POSTAVLJANJE DIJAGNOZE I PODELA NA TIP 1 I TIP 2 PSORIJAZE	18
3.1.3.	PROCENA AKTIVNOSTI BOLESTI KOD PACIJENATA OBOLELIH OD PSORIASIS VULGARIS	18
3.1.4.	UDRUŽENOST PSORIJAZE SA PSORIJAZNIM ARTRITISOM	18
3.2.	ZDRAVE KONTROLE	18
3.3.	UZIMANJE UZORAKA KRVI OD ISPITANIKA	19
3.4.	PRIPREMA DNK IZ UZORAKA KRVI ISPITANIKA ZA ANALIZU POLIMORFIZAMA	19
3.4.1.	IZOLACIJA DNK	19
3.4.2.	ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE I ČISTOĆE IZOLOVANE DNK	20

3.5.	ODREĐIVANJE POLIMORFIZAMA GENA ZA TNF (RS1800629), IL-12B (RS3212227), IL-23R (RS2201841) I IL-17F (RS11465553)	20
3.6.	ODREĐIVANJE POLIMORFIZMA GENA ZA IFN-GAMA (RS2430561)	21
3.6.1.	ODREĐIVANJE OLIGONUKLEOTIDNIH SEKVENCI ZA UMNOŽAVANJE RS2430561	21
3.6.2.	OPTIMIZOVANJE USLOVA AMPLIFIKACIJE PRAJNERA SPECIFIČNIH ZA RS2430561	22
3.6.3.	OPTIMIZOVANJE USLOVA DETEKCIJE PROBA SPECIFIČNIH ZA RS2430561	26
3.6.4.	DETEKCIJA RS2430561 POLIMORFIZMA U UZORCIMA DNK POJEDINAČNIH ISPITANIKA	33
3.7.	STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	33
4.	REZULTATI	34
4.1.	ISPITIVANJE POLIMORFIZMA GENA ZA TNF (RS1800629) KOD KONTROLA I PACIJENATA SA PSORIJAZOM	35
4.2.	ISPITIVANJE POLIMORFIZMA GENA ZA IFN-GAMA (RS2430561) KOD KONTROLA I PACIJENATA SA PSORIJAZOM	40
4.3.	ISPITIVANJE POLIMORFIZMA GENA ZA IL-12B (RS3212227) KOD KONTROLA I PACIJENATA SA PSORIJAZOM	45
4.4.	ISPITIVANJE POLIMORFIZMA GENA ZA IL-23R (RS2201841) KOD KONTROLA I PACIJENATA SA PSORIJAZOM	49
4.5.	ISPITIVANJE POLIMORFIZMA GENA ZA IL-17F (RS11465553) KOD KONTROLA I PACIJENATA SA PSORIJAZOM	54
5.	DISKUSIJA	58
6.	ZAKLJUČCI	79
7.	LITERATURA	81
	SPISAK SKRAĆENICA	103
	BIOGRAFIJA	105
	PRILOZI	106

1. UVOD

1.1. Definicija psorijaze i epidemiološke odlike

Psorijaza je česta hronična inflamatorna bolest kože zastupljena u oko 2-4% osoba u opštoj populaciji. Prevalencija i incidencija ovog oboljenja pokazuju značajne etničke i geografske varijacije (Gelfand i sar., 2004; Stern i sar., 2004; Kurd i Gelfand, 2009; Chandran i Raychaudhuri, 2010; Parisi i sar., 2013). Mada se psorijaza klinički različito ispoljava, većina istraživanja ukazuje da je najčešći klinički oblik ovog oboljenja psoriasis vulgaris (Griffiths i Barker, 2007). Oboljenje se karakteriše periodima remisija i egzacerbacija čiji su nastanak i trajanje nepredvidivi. Faktori koji utiču na prevalenciju psorijaze su uzrast, pol, geografsko područje i genetska osnova (Parisi i sar., 2013). Najčešće se javlja krajem treće decenije života, mada je moguća pojava bolesti kako u neonatalnom periodu tako i u dubokoj starosti. Na osnovu početka bolesti, psorijazu je moguće podeliti na tip 1, koji se dijagnostikuje pre navršene tridesete godine života i tip 2 koji se javlja kasnije (Gudjonsson i sar., 2002). Tip 1 psorijaze, koji se dijagnostikuje kod približno 65% pacijenata sa psorijazom, povezuje se sa težom kliničkom formom bolesti. Tip 2 psorijaze, javlja se kod približno 35% pacijenta, najčešće starijih od 40 godina, bez pozitivne porodične anamneze i češće je udružen sa promenama na noktima i zglobovima. Kao mogući etiološki faktori u patogenezi psorijaze navode se uzimanje određenih lekova (beta blokatori, antimalarici), fizička trauma kože (Koebner fenomen), stres i infekcije koji u sadejstvu sa genetskom predispozicijom dovode do nastanka i razvoja psorijatičnih lezija (Fry i Baker, 2007).

1.2. Patogeneza psorijaze

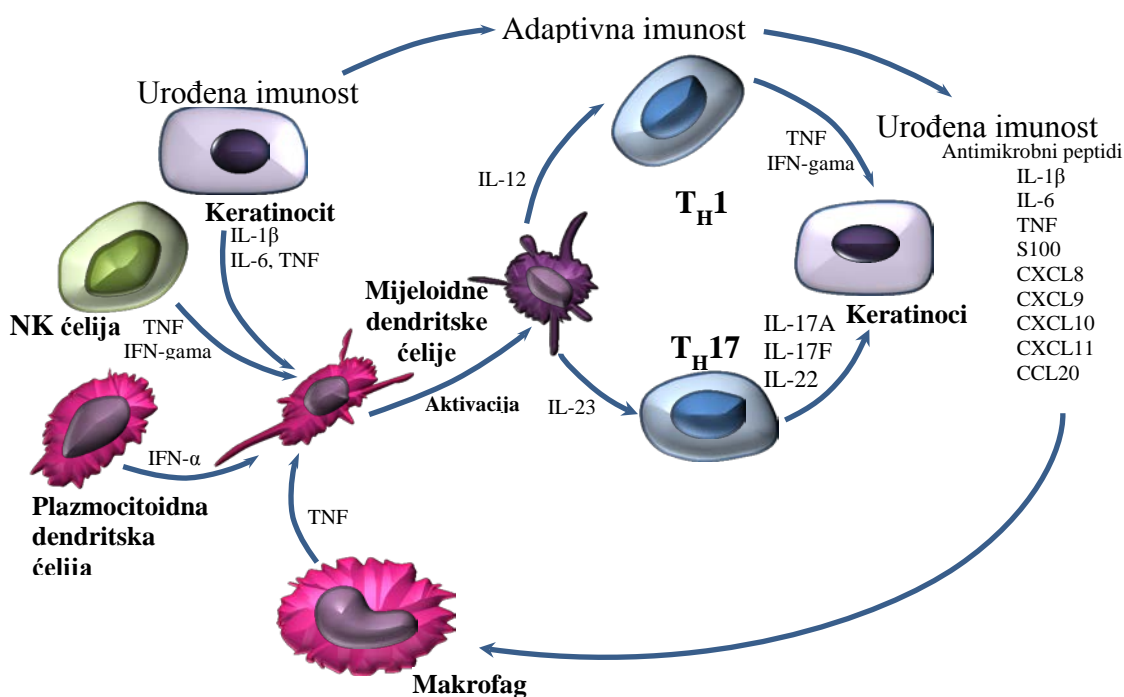
Prve opise bolesti, za koje se smatra da se odnose na psorijazu, dao je Hipokrat, a objavljeni su u *Corpus Hipocraticum*-u 100 godina nakon njegove smrti. Početkom XIX veka Robert Willan je detaljno opisao dva oboljenja koja odgovaraju psorijazi, a nekoliko decenija kasnije Ferdinand Ritter Von Hebra je zaključio da se zapravo radi o jednoj bolesti i dao konačan opis ovog oboljenja.

Dugo se smatralo da je psorijaza bolest koja nastaje isključivo usled poremećaja vezanih za funkcionisanje keratinocita. Krajem sedamdesetih godina dvadesetog veka, objavljen je prvi prikaz slučaja pacijenta sa psorijazom kod koga je došlo do regresije promena na koži pod uticajem ciklosporina A (Mueller i Herrmann, 1979), međutim tek

nekoliko godina kasnije počinje da se pripisuje značajno mesto T-limfocitima u patogenezi ove bolesti.

Savremena istraživanja ukazuju da je psoriasis vulgaris multifaktorijalna bolest posredovana imunskim mehanizmima sa jasnom genetskom predispozicijom, pa služi i kao model za izučavanje kompleksnih mehanizama koji učestvuju u nastanku hronične inflamacije (Nograla i sar., 2010).

Inflamatorna kaskada tokom nastanka i razvoja psorijatičnih lezija nastaje interakcijom ćelija epitela i vezivnog tkiva kože i medijatora urođene i stečene imunosti (Ilustracija 1). Aktivisane plazmocitoidne dendritske ćelije proizvode interferon (IFN)- α , a aktivisani keratinociti i makrofagi luče proinflamatorne citokine: faktor nekroze tumora (*engl.* tumor necrosis factor, TNF), interleukin (IL)-1 i IL-6 koji stimulišu mijeloidne dendritske ćelije da migriraju u regionalne limfne čvorove, sazrevaju i prezentuju još uvek nedovoljno definisane infektivne i sopstvene antigene T-limfocitima (Nestle i sar., 2009). Po aktivaciji naivnih T-limfocita, citokini kao što su IL-12 i IL-23 koje sekretuju dendritske ćelije, indukuju njihovu diferencijaciju u efektorske subpopulacije pomoćničkih T-ćelija i to T_H1 i T_H17 , koje imaju važnu ulogu u imunopatogenezi psorijaze. Ove efektorske ćelije migriraju u kožu privučene lokalnim hemokinima za koje poseduju odgovarajuće receptore i lokalno proizvode sebi svojstven set citokina. T_H1 ćelije proizvode prvenstveno IFN-gama i TNF, a T_H17 sekretuju IL-17A, IL-17F i IL-22 (Perera i sar., 2012).



Ilustracija 1. Prikaz važnih interakcija između ćelija kože i komponenti urođene i stečene imunosti.

Ovi citokini dovode do aktivacije i proliferacije keratinocita, produkcije antimikrobnih peptida (katelicidina – LL37, β -defenzina, S100 proteina) koji poseduju i izraženu hemotaktičku aktivnost i hemokina (CXCL8-CXCL11 i CCL20), kao i lučenja proinflamatornih citokina (TNF, IL-1 β , IL-6). Ovi solubilni medijatori dovode do poremećaja funkcije ćelija derma i epiderma, hiperproliferacije i poremećene diferencijacije keratinocita, hronične inflamacije sa značajnom inflamatornom infiltracijom i kliničkih manifestacija bolesti (Perera i sar., 2012).

1.3. Klinička slika psorijaze

Promene u psorijazi su eritemato-skvamozne, što ukazuje da se proces odvija kako u krvnim sudovima (eritem) tako i u epidermu (pojačana deskvamacija). Kod nekih oblika, kliničkom slikom dominiraju eritematozni plakovi i papule sa skvamom, dok kod drugih formi psorijaze kliničkom slikom dominiraju eritem ili pustule na eritematoznoj osnovi. Bez obzira na to o kakvoj kliničkoj slici je reč, psorijazu treba shvatiti kao oboljenje koje može da se manifestuje širokim spektrom kliničkih promena kod istog pacijenta: eritematoznim papulama, jasno ograničenim plakovima prekrivenim neadherentnom beličastom skvamom, eritemom koji može da zahvati više od 90% površine kože i pojavom pustula. Zapravo, primarna klinička prezentacija bolesti često je drugačija od onih koje se manifestuju kasnije tokom života.

Pored kože, promene mogu da se jave i na nokatnim pločama. Retko, promene na nokatnim pločama mogu da budu jedina klinička manifestacija psorijaze.

1.3.1. Klasifikacija psorijaze

Postoji više klasifikacija psorijaze ali najčešće se primenjuje podela na nepustulozne i pustulozne oblike.

1.3.1.1. Nepustulozni oblici psorijaze

1. Psoriasis vulgaris je najčešći klinički oblik psorijaze i karakteriše se pojavom jasno ograničenih eritematoznih plakova koji su prekriveni neadherentnom beličastom skvamom. Predilekciona mesta su predeo laktova, kolena, lumbosakralni predeo, kapilicijum, retroaurikularni predeo i umbilikalna regija. Veličina promena varira od veoma malih papula do plakova koji prekrivaju veliku površinu tela. Promene na koži kod psoriasis vulgaris i eruptivne forme psorijaze imaju četiri karakteristična svojstva:

(1) jasno su ograničene; (2) na površini se nalazi neadherentna sedefasta skvama; (3) ispod skvame koža je sjajna i eritematozna; (4) prisutan je Auspitzov znak. Promene mogu da budu lokalizovane i diseminovane (psoriasis vulgaris disseminata). Na osnovu morfologije promena koje dominiraju kliničkom slikom, razlikuju se sledeći oblici: psoriasis punctata, psoriasis guttata, psoriasis numularis, psoriasis en plaques, psoriasis geographica, psoriasis gyrata i psoriasis annularis. Postoje i inverzne forme psorijaze (psoriasis inversa) kod kojih su promene lokalizovane u pregibima u vidu jasno ograničenih minimalno infiltrovanih glatkih i sjajnih eritematoznih plakova, bez skvame. Ukoliko su promene lokalizovane na dlanovima i/ili tabanima u vidu jasno ograničenog eritema sa hiperkeratozom govorimo o psoriasis palmaris et plantaris.

2. Psoriasis eruptiva (guttata) karakteriše prisustvo eritematoznih papula najčešće lokalizovanih na gornjem delu trupa i gornjim ekstremitetima. Obično se javlja kod mlađih ljudi, i često joj prethodi streptokokna infekcija guše. Do erupcije tipa gutata, pored bakterijske infekcije mogu da dovedu i agresivna lokalna terapija i povlačenje sistemskih glikokortikoida iz terapije.

3. Erythrodermia psoriatica (EP) predstavlja formu oboljenja kod koje su eritemom zahvaćeni svi delovi tela uključujući i glavu, trup i ekstremitete, odnosno više od 90% površine kože, sa različitim stepenom deskvamacije. EP može da ima različite stepene aktivnosti, sa akutnom pojavom generalizovanog eritema ili postepenom evolucijom od hroničnih plakova do generalizovane eksfolijativne faze. U kasnijim fazama bolesti mogu da postoje predeli kože koji su pošteđeni promena. Pored kožnih manifestacija u EP dolazi i do povišene telesne temperature, limfadenopatije, hepatomegalije, anemije, hipoalbuminemije i edema.

1.3.1.2. Pustulozni oblici psorijaze

Pustule mogu da se jave na postojećim plakovima psoriasis cum pustulatione, na anularnim pločama kod psoriasis pustulosa annularis ili na eritematoznoj osnovi kod psoriasis pustulosa generalisata. Zapravo, na aktivnim promenama kod svih oblika psorijaze, tokom egzacerbacije, može da dođe do pojave sterilnih pustula dijametra 1–2 mm.

1. Psoriasis pustulosa generalisata (von Zumbusch) je karakterisana naglim početkom, eritemom koji zahvata veliku površinu kože, a na eritematoznoj osnovi se javljaju nefolikularne pustule koje mogu da konfluiraju. Akutna generalizovana erupcija

sterilnih pustula dijametra od 2–3 mm praćena je febrilnim stanjem. Pustule su diseminovane po trupu i ekstremitetima, uključujući i nokatni krevetac, dlanove i tabane.

2. Psoriasis pustulosa annularis je retka varijanta pustulozne psorijaze. Lezije imaju tendenciju da se šire i formiraju izdužene prstenove. Glavnu odliku čine pustule na anularnoj eritematoznoj osnovi sa centralnom regresijom promena.

3. Psoriasis pustulosa localisata se javlja u dva oblika, koja najčešće nisu praćena sistemskim promenama. To su: pustulosis palmaris et plantaris, s. psoriasis pustulosa Barber i acrodermatitis continua, s. acrodermatitis continua suppurativa Hallopeau. Predilekciona mesta za pojavu pustula promera 2–4 mm, su dlanovi i tabani (Baker i Ryan, 1968; Liao i sar., 2002; de Oliveira i sar., 2010).

1.3.2. Procena aktivnosti bolesti kod pacijenata sa psoriasis vulgaris

Jedan od načina za procenu aktivnosti oboljenja predstavlja primena priznatih i standardizovanih skala odnosno sistema za procenu težine bolesti. Validni sistemi za procenu aktivnosti bolesti omogućavaju i olakšavaju praćenje kako toka bolesti i terapijskih efekata, tako i poređenje toka bolesti i rezultata lečenja kod različitih pacijenata. Najčešće, predstavljaju bročanu vrednost kojom se izražava nalaz kod pacijenta u trenutku pregleda. Najznačajniji su sistemi koji se koriste za česte bolesti u velikom broju centara s obzirom da su najpodložniji proverama validnosti i periodičnim revizijama.

Kod pacijenta sa psoriasis vulgaris aktivnost bolesti određuje se, odnosno gradira, takozvanim PASI skorom (*engl.* Psoriasis Area and Severity Index, PASI) (Schmitt i Wozel, 2005; Naldi, 2010). PASI skorom obuhvaćeni su površina kože zahvaćene promenama, eritem, infiltracija i skvama. Na osnovu dosadašnjih istraživanja, PASI skor je najčešće upotrebljavan sistem procene aktivnosti bolesti kod pacijenata sa psorijazom. PASI skor kao i njegova metodološka validnost procenjena je od strane brojnih istraživačkih grupa (Schmitt i Wozel, 2005; Naldi, 2010; Puzenat i sar., 2010) i u sadašnjem trenutku procena aktivnosti psoriasis vulgaris PASI skorom preporučuje se kako u kliničkoj praksi, tako i prilikom sprovođenja naučnih istraživanja. (Naldi, 2010; Puzenat i sar., 2010).

1.4. Histopatološki nalaz kod psorijaze

Tokom razvoja psorijatičnih promena u koži obolelih, histološki se uočava zadebljenje epiderma (akantozna) kao posledica brze proliferacije keratinocita, tanak ili

odsutan granularni sloj (hipogranuloza ili agranuloza) i retencija jedra u korneocitima (parakeratoza) usled poremećaja diferencijacije keratinocita. Dolazi do značajne dilatacije krvnih sudova i nastanka inflamatornog infiltrata u dermu koji se sastoji od neutrofila, CD4⁺ T-limfocita i antigen-prezentujućih dendritskih ćelija, dok se u epidermu se nalaze prvenstveno CD8⁺ T-limfociti i neutrofili (Gudjonsson i sar., 2003; Perera i sar., 2012).

U ranim promenama u koži obolelih od EP naglašena je spongioza sa akantozom i hiperkeratozom parakeratotskog tipa, dok je u kasnijim stadijumima bolesti epiderm istanjen. Perivaskularni ćelijski infiltrat je sačinjen od limfocita, mononuklearnih fagocita, eozinofila i manjeg broja mast ćelija.

Kod pustuloznih oblika psorijaze inflamatorni infiltrat u okolini dilatiranih krvnih sudova u najvećoj meri čine mononuklearne ćelije i neutrofili a sterilne pustule promera 2–4 mm mogu da budu lokalizovane intraepidermalno ili subkornealno.

1.5. Terapija psorijaze

Do sada su ustanovljeni brojni terapijski modaliteti koji mogu da deluju na različite patogenetske mehanizme uključene u razvoj i tok ovog oboljenja. Antipsorijatici i terapijske procedure koje se koriste u lečenju psorijaze mogu da regulišu proces keratinizacije, da utiču na smanjenje proliferacije ili da deluju na poremećaje na nivou T-limfocita odnosno inflamaciju (Ariza i sar., 2013). Terapija psorijaze može da se podeli na lokalnu i sistemsku.

1.5.1. Lokalna terapija

Lokalna terapija podrazumeva upotrebu emolijentnih indiferentnih kremova, keratolitika, preparata katrana, antralina, kortikosteroida, retinoida, derivata vitamina D₃, selektivne PUVA terapije, balneofototerapije i selektivne UVB terapije.

1.5.2. Sistemska terapija

Sistemska terapija psorijaze podrazumeva upotrebu retinoida, metotreksata, fotohemoterapije, ciklosporina A, estara fumarinske kiseline, anti-TNF antitela, solubilnog TNF vezujućeg proteina, anti-CD4 antitela, anti-IL-12/IL23 p40 antitela, IL-18 vezujućeg proteina, anti-IFN-gama antitela (Chaudhari i sar., 2001; Jacobi i sar., 2003; Krueger i sar., 2007; Gupta i sar., 2013; Mattei i sar., 2013; Puig i sar., 2013).

1.6. Komorbiditet kod obolelih od psorijaze

Psorijazni artritis dijagnostikuje se kod približno trećine pacijenata sa psorijazom. Psorijazni artritis može da prethodi pojavi promena na koži (15% slučajeva), kod 70% bolesnika psorijaznom artritisu prethode promene na koži, dok se kod 15% bolesnika promene na koži i zglobovima javljaju približno istovremeno (Cantini i sar., 2010).

Pored toga, ustanovljena je povezanost između sistemske inflamacije u psorijazi i rizika za pojavu dijabetes melitusa i arterijske hipertenzije (Qureshi i sar., 2009). Brojni autori dovode u vezu i postojanje metaboličkog sindroma (gojaznost, povišen krvni pritisak, povišena glikemija, povišena koncentracija serumskih triglicerida i snižena koncentracija serumskog HDL holesterola) i psorijaze. Još uvek nisu poznati mehanizmi koji dovode do istovremenog nastanka metaboličkog sindroma i psorijaze da bi mogla da se definiše kao imunometabolička bolest (Pietrzak i sar., 2010; Kanelleas i sar., 2011; Gerkowicz i sar., 2012). Pored toga, poznata je udruženost psorijaze i drugih imunski posredovanih oboljenja kao što su Kronova bolest i ulcerozni kolitis (Yates i sar., 1982; Parkes i sar., 2007)

Neophodna su dodatna istraživanja da bi se ustanovila povezanost između psorijaze i drugih bolesti. Značajan nedostatak dosadašnjih istraživanja je u tome što nema podataka o primenjivanim terapijskim modalitetima kod obolelih od psorijaze koji imaju i neke od navedenih komorbiditeta. Takva istraživanja bi trebala da pruže i podatke o tome kakav je tok udruženih bolesti kada dođe do postizanja kliničkog poboljšanja ili remisije psorijaze. Moguće je da bi pravovremeno lečenje psorijaze personalizovanom terapijom umanjilo rizik od razvoja dijabetes melitusa, hipertenzije i drugih pridruženih bolesti (Qureshi i sar., 2009).

1.7. Eksperimentalni modeli psorijaze

Spontane mutacije gena, genska manipulacija i tehnika ksenotransplantacije humane kože i limfocita omogućili su dobijanje većeg broja animalnih modela psorijaze (Mizutani i sar., 2003). Jedan od eksperimentalnih modela, kod kojeg se kožne lezije spontano razvijaju, je dobijen presađivanjem perilezione kože pacijenata na AGR 129 soj miševa koji nemaju funkcionalne gene za receptore interferona tip I i tip II i gen koji aktivira rekombinaciju genskih segmenata tip 2 (*engl.* recombination activating gen 2, Rag2) (Boyman i sar., 2004). Dalje, primeri mišijih modela psorijaze su i adoptivni transfer humanih CD4⁺CD45RB^{high} T-ćelija u imunodeficientnog SCID miša (Ma i sar., 2010), injekcija rekombinantnog IL-17F (Watanabe i sar., 2009) ili rekombinantnog IL-23 (Chan i sar., 2006; Hedrick i sar., 2009) u kožu uha miša, aplikacija 12-O-

tetradekonilforbol-12-acetata K5-STAT3C (Nakajima i sar., 2011) ili K14-VEGF (Hvid i sar., 2008) transgenim miševima, i lokalna aplikacija imikvimoda (van der Fits i sar., 2009). Pokazano je da su IL-17A, IL-22, IL-17F, IL-23p19, i IL-12/IL-23 p40 prisutni u psorijatičnim lezijama kod ljudi kao i u psorijaziformnim lezijama kod miševa koje su indukovane 12-O-tetradekonilforbol-12-acetatom, imikvimodom ili rekombinantnim IL-23 (Chan i sar., 2006; Hvid i sar., 2008; van der Fits i sar., 2009). Imunodeficientni miševi kojima je presađena koža obolelih od psorijaze razvijali su tipične psorijatične lezije u transplantatima nekoliko nedelja nakon transfera CD4⁺ T-ćelija istih pacijenata (Nickoloff, 1999; Nestle i Nickoloff, 2005; Boehncke i Schon, 2007). Pored toga, pokazano je i da anti–humani IL-23 antitela blokiraju razvoj psorijaziformnih lezija kod kseno–transplantiranog miša (Tonel i sar., 2010). U najnovijem eksperimentalnom modelu, iz transgenog miša čiji su receptori na T-ćelijama specifični za desmoglein 3 (Dsg3H1 miš) izolovane su T-ćelije koje prepoznaju ovaj epidermalni antigen. Nakon toga, izolovane T-ćelije su polarizovane u T_H17 ćelije *in vitro* i prenete u Rag2^{-/-} miša. U ovom modelu, dve nedelje nakon transfera Dsg3H1-T_H17 ćelija u epidermu je došlo do pojave teške inflamacije slične inflamaciji u psorijazi. Ovaj fenomen je izostao nakon transfera T_H1 Dsg3H1 ćelija ili pak T_H17 ćelija poreklom iz normalnih životinja. Postignuta inflamacija snažno je inhibisana anti–p40 (tj. anti–IL-12 ili anti–IL-23) antitelima, kao i anti–IL-17 antitelima (Nishimoto i sar., 2013).

1.8. Genetska osnova psorijaze

Dosadašnja istraživanja su pokazala da psorijaza pripada takozvanim kompleksnim genetskim bolestima, kod kojih je rizik od oboljevanja uslovljen višestrukom interakcijom gena i faktora spoljašnje sredine. Od psorijaze prevashodno oboljevaju belci, znatno je ređa kod azijata i retko se viđa kod pripadnika crne rase (Bowcock, 2005). Psorijaza se javlja kod oko 60% jednojajčanih blizanaca (Brandrup i sar., 1982) a približno jedna trećina pacijenata daje podatak o nekom rođaku koji boluje od ove bolesti. Primećena je udruženost psorijaze i pojedinih HLA alela (B13, Bw57, Cw6, DR7 kao i haplotipa Cw6 DRB1*07:01/2 DQA1*02:01 DQB1*03:03), i smatra se da alel HLA-Cw*06:02 predstavlja faktor najvećeg rizika za obolevanje od psorijaze (Veal i sar., 2002). Pokazano je da osobe koje su homozigoti za HLA-Cw*06:02 alel imaju dva do pet puta veći rizik za nastanak psorijaze od heterozigota (Gudjonsson i sar., 2003). Zahvaljujući izuzetnom napretku savremenih tehnologija i ispitivanjem polimorfizama gena u celokupnom genomu (*engl.* genome-wide association studies,

GWAS) otkriveno je više gena čiji su pojedini aleli udruženi sa osetljivošću za nastanak psorijaze. Među njima su geni čiji su produkti važni za funkciju kože kao epitelne barijere (LCE3E, LCE3C), zatim geni čiji su produkti uključeni u IL-23 signalizaciju (IL-23A, IL-23R, i IL-23B), signalizaciju NF κ B i interferona (NF κ B α , REL, TYK2, IFIH1, IL-28RA, TNIP1 i TNFAIP3) kao i geni uključeni u IL-17 ćelijski odgovor (TRAF3IP2, TYK2, IL-23R) (Oka i sar., 2012). Iako rezultati dosadašnjih istraživanja polimorfizama gena u celokupnom genomu ukazuju na značaj IL-23/T_H17 osovine u patogenezi psorijaze, kontradiktorni su podaci o značaju pojedinih alelskih varijanti gena koji kodiraju proteine uključene u funkcionisanje T_H1 i T_H17 ćelijskog odgovora kao i drugih proinflamatornih medijatora važnih u patogenezi psorijaze. Nesaglasnost rezultata objavljenih od strane raznih istraživačkih grupa se možda može pripisati proučavanju efekata ovih alela na populacijama različitog etničkog porekla i na raznim geografskim lokacijama što bi afirmisalo koncept interakcije genetskog nasleđa i faktora spoljašnje sredine u nastanku psorijaze.

1.8.1. Polimorfizmi pojedinačnih nukleotida

Genski polimorfizam je pojam koji označava promenu koja može biti posledica zamene, insercije ili delecije nukleotida unutar DNK sekvence. Najbolje su opisana dva tipa polimorfizama sekvenci DNK i to su polimorfizmi dužina sekvenci i polimorfizmi sekvence koji su rezultat zamena nukleotida. Zamena nukleotida u DNK molekulu je uobičajena u populaciji, pri čemu se ni jedan alel ne smatra standardnim. Razlike u sekvenci DNK koje normalno postoje između individua jedne vrste sa učestalošću većom od 1% su označene kao polimorfizmi, a ako je učestalost manja od 1%, tada se promena smatra mutacijom (Li i Sadler, 1991).

Projektom „Genom čoveka“ (*engl.* Human Genome Project), koji se temeljio na sekvenciranju DNK molekula, pokazano je da polimorfizmi pojedinačnih nukleotida (*engl.* single nucleotide polymorphism, SNP) postoje unutar celog genoma kako u kodirajućim tako i nekodirajućim delovima DNK (Reid-Lombardo i Petersen, 2010). SNP se u proseku javljaju jednom na 250 baza, izazivajući veliki broj varijacija u genomu čoveka (Reid-Lombardo i Petersen, 2010). U svim do sada ispitivanim genima postoje SNP. Kod većine SNP postoje samo dve mogućnosti odnosno varijacije alela. Učestalost SNP na autozomnim hromozomima je veća nego na polnim hromozomima (Chakravarti, 2001; Sachidanandam i sar., 2001; Venter i sar., 2001). Smatra se da 70% SNP u opštoj populaciji ima frekvenciju manju od 5%. Procenjuje se da u humanom

genomu ima približno 10 miliona SNP (LaFramboise, 2009) a već početkom XXI veka bilo je otkriveno preko 1,5 milion SNP (Sachidanandam i sar., 2001). Većina do sada otkrivenih SNP ne utiče na promenu fenotipa (Emmert-Streib i Dehmer, 2013).

Najviše pažnje pobuđuju SNP koji utiču na ispoljavanje (ekspresiju) gena, odnosno menjanje građe proteina. Pretpostavlja se da broj takvih SNP u genomu čoveka između 50 000 - 250 000 (Collins i sar., 1997; Brookes, 1999; Chakravarti, 2001; Risch, 2001; Stoneking, 2001).

Promena ekspresije gena može da nastane usled promena u 5' i 3' regulatornim sekvencama, promena u intronima koje menjaju stabilnost ili način obrade primarnog transkripta RNK ili promena u sekvencama koje kodiraju male regulatorne RNK (mikro RNK, miRNK). SNP u kodirajućim sekvencama naročito na pozicijama 1 i 2 u DNK kodovima mogu da promene aminokiseline u proteinu, uvedu prerano STOP kodone ili na drugi način poremete funkcionalnost proteina. Ponekad, SNP ne mora da izaziva nijednu od navedenih promena ali postojanje određene alelske varijante može da bude udruženo sa određenom bolešću zbog toga što se ta alelska varijanta nasleđuje vezana za neki drugi deo genoma koji kodira ili reguliše produkte bitne u patogenezi te bolesti. U takvim slučajevima SNP predstavlja marker te bolesti.

S obzirom na tendenciju individualizovanog pristupa u dijagnostici i terapiji složene bolesti kakva je psorijaza, korisno je da se definišu biomarkeri poput SNP koji mogu da pomognu u dijagnostici, klasifikaciji bolesti, prognozi i praćenju terapijskog odgovora. Polimorfizmi citokinskih gena koji su udruženi sa promenom ekspresije iRNK i proteina nameću se kao posebno interesantni i proučavani su u različitim populacijama ljudi. Uprkos tome što je utvrđeno da su polimorfizmi pojedinih ispitivanih gena koji kodiraju molekule bitne za nastanak i održavanje zapaljenjske reakcije značajni za sklonost ka nastanku psorijaze, prognozu i odgovor na terapiju, postoje ograničenja u tumačenju dobijenih rezultata. Osnovni problem predstavlja činjenica da se statistički značajne udruženosti u pojedinim populacijama razlikuju od rezultata dobijenih u drugim. Iako u osnovi ovih razlika može biti metodološka neusaglašenost u istraživanjima, jasno se nameću i razlike u ispitivanim populacijama pacijenata u odnosu na njihovo etničko poreklo i geografska područja koja su obuhvaćena istraživanjima.

1.8.1.1. Polimorfizam gena za TNF

U zapaljenjskim bolestima kože TNF sekretuju makrofagi, inflamatorne dendritske ćelije, mastociti, efektorske T-ćelije, NK ćelije i keratinociti (Lowes i sar.,

2007; Wagner i sar., 2010; Sweeney i sar., 2011; Kupetsky i sar., 2013). TNF inicira migraciju Langerhansovih ćelija (Villablanca i Mora, 2008; Kupetsky i sar., 2013) do drenirajućih limfnih čvorova kože gde, podstiču aktivaciju T-ćelija i diferencijaciju T_H17 (Kupetsky i sar., 2013). Osim u koži, TNF pokreće zapaljenski proces i u zglobovima (Scarpa i sar., 2006). Veći broj radova ukazuje na povezanost pojedinih alelskih varijanti gena za TNF sa psorijazom. Postoje istraživanja u kojima je opisana značajna udruženost između pojedinih polimorfizama u promotorskom regionu gena za TNF i sklonosti ka nastanku psorijaze, međutim postoje i studije u kojima takvi rezultati nisu potvrđeni (Nedoszytko i sar., 2007; Gallo i sar., 2012). Meta-analiza povezanosti najbolje definisanih polimorfizama ovog gena, -238 G/A (rs361525) i -308 G/A (rs1800629), sa osetljivošću na razvoj psorijaze uključila je rezultate 10 studija u različitim populacijama (Li i sar., 2007). Na osnovu zbirnih rezultata za preko 1000 pacijenata i sličnog broja odgovarajućih kontrola pokazano je da TNF -238 i -308 polimorfizmi mogu da budu korišćeni kao biomarkeri u proceni rizika za nastanak psorijaze. Pokazano je da je značajno povišen rizik za nastanak psorijaze udružen sa varijantama GA i AA genotipa na poziciji -238 G/A u poređenju sa GG genotipom, dok GA i AA genotipovi na poziciji -308 G/A značajno smanjuju sklonost ka nastanku psorijaze u odnosu na GG genotip na istoj poziciji (Li i sar., 2007).

1.8.1.2. Polimorfizam gena za IFN-gama

IFN-gama je pleotropni citokin sa brojnim imunoregulatornim funkcijama. Produkuju ga $CD4^+$ i $CD8^+$ T-ćelije, makrofagi, NK ćelije i keratinociti (McKenzie i sar., 2003; Ellis i Beaman, 2004; Baran i sar., 2008; Johnson-Huang i sar., 2012). Prisustvo IFN-gama je pokazano u kožnim lezijama a povišene koncentracije ovog citokina su detektovane u krvi pacijenata sa psorijazom (Johnson-Huang i sar., 2012). Ubrizgavanje IFN-gama u neizmenjenu kožu pacijenata sa psorijazom povezano je sa pojavom punktififormnih promena na mestu ubrizgavanja karakterističnih za psorijazu (Fierlbeck i sar., 1990).

Polimorfizam na poziciji +874 (T/A) u genu za IFN-gama (rs2430561) utiče na njegovu ekspresiju. Pokazano je da je TT genotip udružen sa visokom produkcijom IFN-gama, genotip TA sa srednjom, dok je genotip AA udružen sa niskom produkcijom IFN-gama (Pravica i sar., 1999; Pravica i sar., 2000). Analizom ovog polimorfizma u grupi pacijenata sa psorijazom u Engleskoj i zdravih osoba nije ustanovljena statistički značajna razlika u distribuciji alela i genotipova između dve ispitivane grupe (Craven i

sar., 2001). Međutim, istraživanje sprovedeno u Poljskoj, pokazalo je da pacijenti sa psorijazom imaju statistički značajno češće TT genotip nego zdrave kontrolne osobe (Baran i sar., 2008).

1.8.1.3. Polimorfizam gena za IL-12B

Zajednička subjedinica IL-12 i IL-23 je protein nazvan IL-12B ili p40 koji predstavlja jedan od molekula bitnih za funkcionisanje T_{H1} i T_{H17} ćelijskog odgovora. Ustanovljeno je da su polimorfizmi gena koji kodiraju proteine od značaja za IL23/ T_{H17} put povezani sa rizikom za oboljevanje od psorijaze (Iwakura i Ishigame, 2006; Nair i sar., 2010). Pojedini aleli gena za p40 (*IL12B*) i receptora za IL-23 (*IL23R*) bili su statistički značajno udruženi sa osetljivošću za nastanak psorijaze u ispitivanjima više hiljada pacijenata sa psorijazom iz SAD, Kanade, Nemačke i Francuske i zdravih osoba (Nair i sar., 2009).

1.8.1.4. Polimorfizam gena za IL-23R

Interleukin-23 je heterodimerni citokin sačinjen od subjedinice p19 (kodira je *IL23A*) i subjedinice p40 (deli je sa IL-12, a kodira je *IL12B*) koje se vezuju za receptore koji su produkti *IL12RB1* i *IL23R* (Nair i sar., 2009; Nakajima, 2012).

Vezivanje IL-23 za IL-23R utiče na celularni imunski odgovor intenzivirajući preživljavanje i ekspanziju T_{H17} ćelija (Bettelli i sar., 2007). Poremećaj na nivou IL-23 i IL-23R (odnosno transdukcije signala IL-23), dovodi do povećane sklonosti za razvoj hroničnog imunskog odgovora usmerenog ka epitelnim tkivima i veoma često do razvoja psorijaze (Nair i sar., 2009).

Do sada je u više studija pokazano da su određeni polimorfizmi gena za IL-23R, uključujući i polimorfizam rs2201841, udruženi sa osetljivošću za nastanak psorijaze i nekih drugih imunski posredovanih oboljenja kao što su Kronova bolest i ulcerozni kolitis (Parkes i sar., 2007).

1.8.1.5. Polimorfizam gena za IL-17F

IL-17F pripada IL-17 familiji citokina koju čini šest izoformi IL-17 (IL-17A do IL-17F). IL-17A i IL-17F su najdominantniji citokini IL-17 familije u psorijazi i dejstvo ostvaruju ili samostalno ili formirajući IL-17A/F heterodimer (Kupetsky i sar., 2013). IL-17F ima značajno mesto u patogenezi psorijaze jer stimuliše produkciju IL-6 i IL-8 čime doprinosi pojačanju zapaljenjskih promena u koži (Watanabe i sar., 2009). Još uvek nema jasno definisanih polimorfizama ovog gena koji bi mogli da budu biomarkeri osetljivosti

na psorijazu. Ispitivanje učestalosti alelskih varijanti T/C polimorfizma, koji predstavlja promenu histidina na poziciji 161 u arginin, u populaciji obolelih od psorijaze u Japanu pokazalo je da ovaj polimorfizam nije udružen sa povećanom osetljivošću za nastanak psorijaze u ovoj zemlji (Shibata i sar., 2009).

Imajući u vidu etničke razlike u do sada objavljenim istraživanjima, važno je da se definišu genetske specifičnosti naše populacije u odnosu na distribuciju alela koji kodiraju inflamatorne molekule kao i da se utvrdi da li polimorfizmi u okviru ispitivanih gena mogu da se koriste kao potencijalni biomarkeri osetljivosti za nastanak psorijaze.

2. CILJEVI

Savremena istraživanja ukazuju da je psoriasis vulgaris multifaktorijelna bolest posredovana imunskim mehanizmima, sa jasnom genetskom predispozicijom i služi kao model za izučavanje kompleksnih mehanizama koji učestvuju u nastanku hronične inflamacije.

Na zaključke istraživanja u kojima je ispitivana povezanost između pojedinih alelskih varijanti gena koji kodiraju molekule bitne za nastanak i održavanje zapaljenjske reakcije i sklonosti ka nastanku psorijaze mogu da utiču i razlike u populacijama ispitivanih pacijenata u odnosu na njihovo etničko poreklo i geografsko područje koje naseljavaju. Na ovo je ukazano u više studija, ali ovaj tip istraživanja do sada nije sproveden u Srbiji.

Zbog toga su ciljevi istraživanja obuhvaćenih ovom doktorskom disertacijom bili:

1. Utvrditi distribuciju alela gena za proinflamatorne molekule (TNF, IFN-gama, IL-12B, IL-23R i IL-17F) u populaciji zdravih osoba na teritoriji Republike Srbije (dobrovoljni davaoci krvi).
2. Odrediti distribuciju alela gena za proinflamatorne molekule (TNF, IFN-gama, IL-12B, IL-23R i IL-17F) u grupi pacijenata obolelih od psoriasis vulgaris.
3. Utvrditi da li je neki od polimorfizama gena za važne proinflamatorne molekule koji nastaju usled izmene pojedinačnih nukleotidnih baza faktor rizika za nastanak psoriasis vulgaris.
4. Utvrditi da li se distribucije ispitivanih polimorfizama kod pacijenata sa psoriasis vulgaris i dobrovoljnih davalaca krvi u našoj sredini razlikuju u odnosu na studije u kojima su ovi polimorfizmi ispitivani u drugim populacijama (različiti geografski regioni i etničko poreklo).

3. MATERIЈAL I METODE

3.1. Pacijenti oboleli od psorijaze

3.1.1. Selekcija ispitanika

Izvedena je studija preseka u koju su bili uključeni pacijenti oboleli od psoriasis vulgaris lečeni na Klinici za dermatovenerologiju Kliničkog centra Srbije u periodu od januara 2012. do decembra 2013. godine. Studija je planirana u skladu sa etičkim standardima datim u Helsinškoj deklaraciji (revidirana verzija iz 1983. godine) i u skladu sa pravilima Etičkog komiteta Kliničkog centra Srbije i Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Kriterijumi za uzimanje uzorka krvi podrazumevali su da pacijenti budu stariji od 18 godina i da su potpisali pristanak za učešće u ispitivanju. Sakupljeni su uzorci od 130 pacijenata obolelih od psoriasis vulgaris.

3.1.2. Kriterijumi za postavljanje dijagnoze i podela na tip 1 i tip 2 psorijaze

Kod svih pacijenata dijagnoza je postavljana na osnovu tipične kliničke slike odnosno postojanja karakterističnih jasno ograničenih eritematoznih plakova sa neadherentnom beličastom skvamom. Na osnovu anamnestičkih podataka i podataka iz medicinske dokumentacije pacijenti oboleli od psorijaze podeljeni su u dve grupe. Prva grupa (tip 1 psorijaze) obuhvatila je pacijente sa ranim početkom bolesti, pre navršene tridesete godine života. Drugu grupu (tip 2 psorijaze) činili su pacijenti sa kasnim početkom bolesti, posle navršene tridesete godine života (Gudjonsson i sar., 2002).

3.1.3. Procena aktivnosti bolesti kod pacijenata obolelih od psoriasis vulgaris

Aktivnost bolesti određivana je PASI skorom. PASI skorom procenjivana je površina kože zahvaćena promenama (eritem, infiltracija i obimnost skvame). Na osnovu vrednosti PASI skora pacijenti su podeljeni u tri grupe, grupu sa lakšim (niske vrednosti PASI < 10), umerenim (srednje vrednosti PASI, od 10 do 20) i teškim oblikom oboljenja (visoke vrednosti PASI, > 20) (Schmitt i Wozel, 2005; Naldi, 2010).

3.1.4. Udruženost psorijaze sa psorijaznim artritismom

Kod svih pacijenata sa bolom i otocima zglobova kao i deformitetima zglobova obavljan je i reumatološki pregled. Na osnovu reumatološkog nalaza postavljana je dijagnoza psorijaznog artritisa.

3.2. Zdrave kontrole

Kontrolnu grupu činili su dobrovoljni davaoci krvi, čija je krv uzimana u Institutu za transfuziju krvi Srbije i koji nisu oboleli od psoriasis vulgaris ili drugih zapaljenskih

bolesti. Prvobitno je planirano da se uzme krv 160 dobrovoljnih davalaca ali je zbog obezbeđivanja Hardy-Weinbergove ravnoteže svih ispitivanih genotipova uzeta krv od 500 dobrovoljnih davalaca. Za ispitivanje polimorfizama gena za TNF, IFN-gama i IL-12B je analizirana DNK 259 dobrovoljnih davalaca krvi dok je za analizu polimorfizama gena za IL2-3R i IL-17F umnožavana i analizirana DNK 306 dobrovoljnih davalaca krvi.

Sve osobe od koji je uzimana krv i lični podaci, potpisale su pristanak i obaveštene su o ciljevima i očekivanim ishodima studije.

Uslov za isključivanje iz istraživanja bila je želja ispitanika da ne učestvuje u istraživanju a u slučaju pacijenata sa psorijazom i postojanje druge forme psorijaze osim psoriasis vulgaris.

3.3. Uzimanje uzoraka krvi od ispitanika

Uzorci krvi za analizu genskih polimorfizama pacijenata obolelih od psoriasis vulgaris uzeti su venepunkcijom u Klinici za dermatovenerologiju Kliničkog centra Srbije, dok su uzorci krvi od zdravih ispitanika uzimani u Institutu za transfuziju krvi Srbije. Od svakog ispitanika uzet je uzorak pune krvi (3 ml) u vacutainer epruvetu (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, SAD) sa EDTA kao antikoagulansom. Uzorci krvi su čuvani na 4°C i transportovani unutar 4 sata do laboratorije za imunologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu gde su dalje obrađivani i gde je izolovana i čuvana genomska DNK.

3.4. Priprema DNK iz uzoraka krvi ispitanika za analizu polimorfizama

Iz krvi ispitanika izolovana je DNK i sa njom je postupano na način koji je opisan u tekstu koji sledi.

3.4.1. Izolacija DNK

Za izolaciju DNK iz krvi ispitanika korišćen je GeneJet Genomic DNA Purification Kit (Fermentas, Vilnius, Litvanija) prema uputstvu proizvođača. Pre početka izolacije, puferima za ispiranje (*engl.* Wash buffer, WB) WB I i WB II dodata je propisana količina 100% etanola (Zorka, Šabac, Srbija). Ukratko, krv u vacutainer epruvetama je promešana okretanjem epruvete gore-dole osam puta nakon čega je iz svake uzimano po 200 µl krvi i prenošeno u obeležene ependorf epruvete zapremine 1,5 ml (Sarsted, Nümbrecht, SR Nemačka). Zatim je svakom uzorku dodavano po 400 µl

rastvora za liziranje i 20 µl proteinaze K. Nakon toga, svi uzorci su kratko i energično izmešani na orbitalnoj mešalici (vorteksu) i inkubirani 10 minuta u vodenom kupatilu na 56°C uz povremeno mešanje (2-3 puta) okretanjem epruveta gore-dole. U svaki uzorak je potom dodavano po 200 µl 96% etanola (Zorka, Šabac, Srbija), a zatim je smeša energično mešana. Nakon toga, sav sadržaj je prebacivan u prethodno obeležene kolonice koje su bile ubačene u ependorf epruvete od 2ml sa odsečenim poklopcem (Sarsted, Nümbrecht, SR Nemačka). Sadržaj kolonica je potom centrifugiran 1 minut na 6000g nakon čega su kolonice sa vezanom DNK prebacivane u kivete za otpad koje su sastavni deo GeneJet Genomic DNA Purification kompleta. DNK vezane za matriks kolona su ispirane dodavanjem po 500 µl WB I i centrifugiranjem kolona u trajanju od 1 minut na 8000g. Sadržaj kiveti za otpad je zatim odlivan, a u kolone je dodavano po 500 µl WB II. Nakon toga, kolone su centrifugirane 3 minuta na 14 000g, a ukoliko bi u njima ostalo još tečnosti, centrifugiranje je ponavljano još 1 minut na istoj brzini nakon pražnjenja kiveti za otpad. Kolone sa vezanom DNK su prebacivane u nove obeležene Eppendorf Safe Lock epruvete od 1,5 ml (Eppendorf, Hamburg, SR Nemačka) i pristupalo se izdvajanju DNK vezane za matriks kolone na sledeći način: u svaku kolonu je dodavano 200 µl pufera za rastvaranje DNK, zatim su kolone inkubirane 2 minuta na sobnoj temperaturi i centrifugirane 1 minut na 8000g. Izolovanim DNK je zatim spektrofotometrijski određivana koncentracija i čistoća.

3.4.2. Određivanje koncentracije i čistoće izolovane DNK

Uzorak od 8 µl izolovane DNK nanošen je u mikrokivetu Gene Quant Pro Calculatora (LKB Pharmacia, Uppsala, Švedska), a zatim su očitavane vrednosti apsorbancije na 230, 260, 280 i 320 nm. Vrednosti količnika apsorbancija na 260 nm i 280 nm (260/280) između 1,65 i 1,85 kao i vrednosti 260/230 > 1,2 bile su prihvatljive. U suprotnom, ponavljana je izolacija DNK iz uzorka krvi. Izolovane DNK su po pravilu bile koncentracije od oko 20 ng/µl. Iz izolovane DNK uzimani su uzorci od 500 ng i dopunjavani vodom do zapremine od 125 µl čime su dobijana razblaženja od 4 ng/µl koja su korišćena za određivanje polimorfizama. Ostatak DNK je čuvan na -20°C.

3.5. Određivanje polimorfizama gena za TNF (rs1800629), IL-12B (rs3212227), IL-23R (rs2201841) i IL-17F (rs11465553)

Za detekciju i analizu polimorfizama gena za TNF, IL-12B, IL-23R i IL-17F korišćene su komercijalne optimizovane smeše specifičnih oligonukleotida i TaqMan proba obeleženih FAM i VIC fluorohromima i to: *TNF* rs1800629 #C__7514879_10;

IL12B rs3212227 #C__2084293_10; *IL23R* rs2201841 #C__1272302_10; *IL17F* rs11465553 #C__25765149_10, (PE, Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD). Amplifikacija fragmenata DNK Real-time PCR metodom vršena je pomoću navedenih smeša komercijalnih oligonukleotida i Maxima™ Probe qPCR 2X Master Mix, (Fermentas, Vilnius, Litvanija) uzimajući u obzir preporuke proizvođača reagenasa. Ukratko, amplifikacija je vršena u optičkim pločama za PCR, formata 8 x 12 bunarčića (PE, Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD), u koje su sipane reakcione smeše od 5 µl 2 x Real Master Mix Probe (Fermentas, Vilnius, Litvanija), 0,25 µl komercijalne smeše oligonukleotida za detekciju navedenih polimorfizama i 4,75 µl ispitivanog DNK uzorka (4 ng/µl). Ploče su zatim zatvarane lepljenjem optičkog filma (PE, Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD), kratko centrifugirane na 1500g i smeštane u termoblok Realplex² PCR mašine (Eppendorf, Hamburg, SR Nemačka). Ploče su pre amplifikacije inkubirane u termobloku 4 minuta na 95°C da bi se aktivirala DNK polimeraza. Temperaturni profil amplifikacije je bio 95°C 15 sec → 60°C 1 minut sa 39 ponavljanja. Merenje fluorescencije u svakom ciklusu vršeno je na 60°C. Po završetku amplifikacije određivani su aleli pomoću Realplex 2.0 softvera uz ručno podešavanje linije praga detekcije.

3.6. Određivanje polimorfizma gena za IFN-gama (rs2430561)

Detekcija i analiza polimorfizma gena za IFN-gama (rs2430561) nije mogla da bude urađena na isti način zbog toga što nisu postojali komercijalni oligonukleotidi za detekciju rs2430561 polimorfizma, pa su dizajnirani oligonukleotidi za detekciju ovog polimorfizma i optimizovani uslovi za amplifikaciju i razlikovanje alela.

3.6.1. Određivanje oligonukleotidnih sekvenci za umnožavanje rs2430561

Oligonukleotidni prajmeri i probe dizajnirani su pomoću Primer Express 2.0 softvera (PE, Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD), tako da otkrivaju +874 (T/A) polimorfizam gena za IFN-gama. U cilju postizanja maksimuma moći diskriminacije između A i T alela odabrane su kratke sekvence TaqMan proba. U cilju efikasne hibridizacije proba sa umnoženim DNK fragmentima za probe je vezana patentirana grupa MGB (*engl.* Minor Groove Binder), (PE, Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD) koja povećava temperaturu hibridizacije za više od 10°C i u isto vreme inhibira fluorescenciju FAM i VIC fluorohroma.

Odabrane su sledeće oligonukleotidne sekvence:

IFNGF 5' TCCAAACATGTGCGAGTGT 3'

IFNGR 5' AATATTCAGACATTCACAATTGATTT 3'

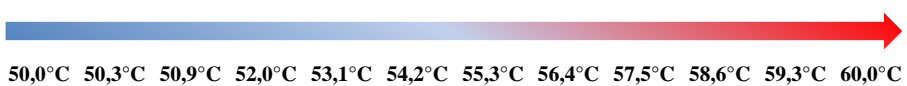
IFNGA 5' FAM-ATCAAATCACACACA-MGB 3'

IFNGT 5' VIC-AATCAAATCTCACACA-MGB 3'

Oligonukleotidi su zatim nabavljeni od PE, Applied Biosystems (Foster City, CA, SAD).

3.6.2. Optimizovanje uslova amplifikacije prajmera specifičnih za rs2430561

Optimizacija oligonukleotidnih prajmera vršena je na Realplex² PCR mašini (Eppendorf, Hamburg, SR Nemačka) na DNK uzorku koji je bio smeša 20 DNK dobrovoljnih davalaca krvi u koncentraciji od 40 ng/μl. Napravljena je reakciona smeša koja je u 6 μl sadržavala 5 μl MaximaTM Probe qPCR 2X MasterMixa (Fermentas Vilnius, Litvanija), 0,5 μl 20 X EvaGreen interkalirajuće boje (Biotium Inc. Hayward, CA, SAD) i 0,5 μl navedene smeše DNK za svaku reakciju. Zatim su pipetirani IFNGF i IFNGR oligonukleotidi kako bi se u ploči napravile kombinacije razblaženja oligonukleotida kao na shemi 1.

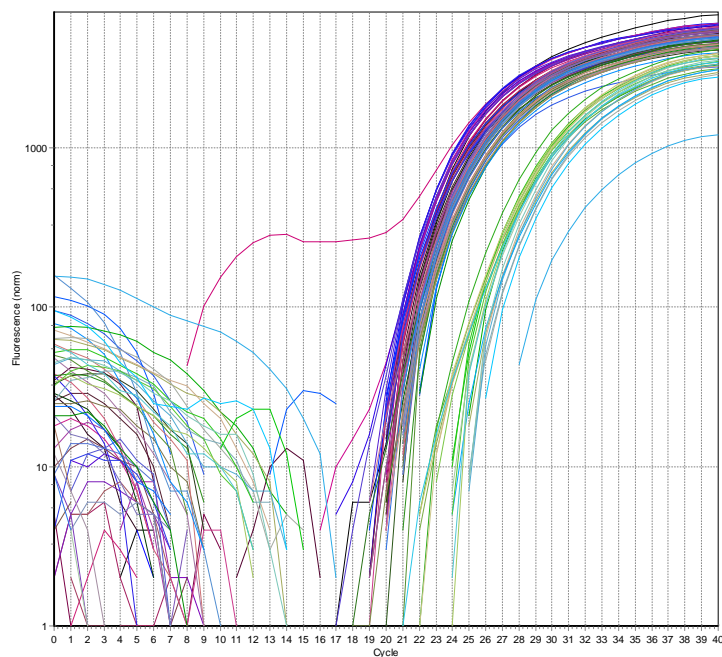


	50,0°C	50,3°C	50,9°C	52,0°C	53,1°C	54,2°C	55,3°C	56,4°C	57,5°C	58,6°C	59,3°C	60,0°C
F900 nM / R900 nM	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK
F900 nM / R300 nM	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK
F900 nM / R100 nM	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK
F300 nM / R900 nM	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK
F300 nM / R300 nM	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK
F300 nM / R100 nM	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK
F100 nM / R900 nM	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK
F100 nM / R300 nM	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK

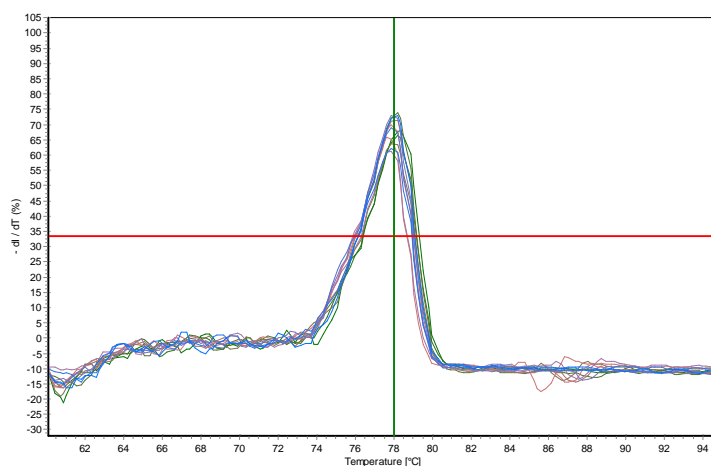
Shema 1. Koncentracije oligonukleotida i temperature u termobloku tokom slepljivanja i ekstenzije u prvom koraku optimizacije oligonukleotida.

Pre amplifikacije ploča je inkubirana u termobloku 4 minuta na 95°C da bi se aktivirala DNK polimeraza. Temperaturni profil amplifikacije je bio 95°C 15 sekundi → 50-60°C 1 minut sa 39 ponavljanja a temperatura na kojoj je vršeno slepljivanje i izduživanje prajmera prikazana je na shemi 1. Merenje fluorescencije u svakom ciklusu vršeno je na 50-60°C (Shema 1). Nakon amplifikacije analiziran je temperaturni profil disocijacije lanaca DNK (*engl.* melting curve analysis, MCA) koja se odigravala prema

zadatim parametrima proizvođača programabilnog termobloka. Rezultati amplifikacije nisu bili optimalni pa je eksperiment ponovljen sa istim koncentracijama oligonukleotida i ostalih reaktanata u smeši ali sa promenjenim temperaturnim profilom. Temperature slepljivanja oligonukleotida i ekstenzije su razdvojene pa se temperaturni ciklus odvijao na sledećim temperaturama: 95°C 15 sekundi → 50-60°C 1 minut → 68°C 20 sekundi sa 39 ponavljanja. Nakon amplifikacije vršena je analiza krive topljenja. Merenje fluorescencije u svakom ciklusu vršeno je na 68°C. Pri ovakvom temperaturnom ciklusu dobijeni su zadovoljavajući uslovi amplifikacije na temperaturama slepljivanja oligonukleotida >54°C i sa finalnim koncentracijama oligonukleotida većim od 100 nM (Slika 1), a umnoženi fragmenti su imali očekivane profile disocijacije DNK lanaca (Slika 2).



Slika 1. Krive amplifikacije fragmenata gena za IFN-gama koji sadrži rs2430561 umnoženih prema uslovima iz sheme 1.

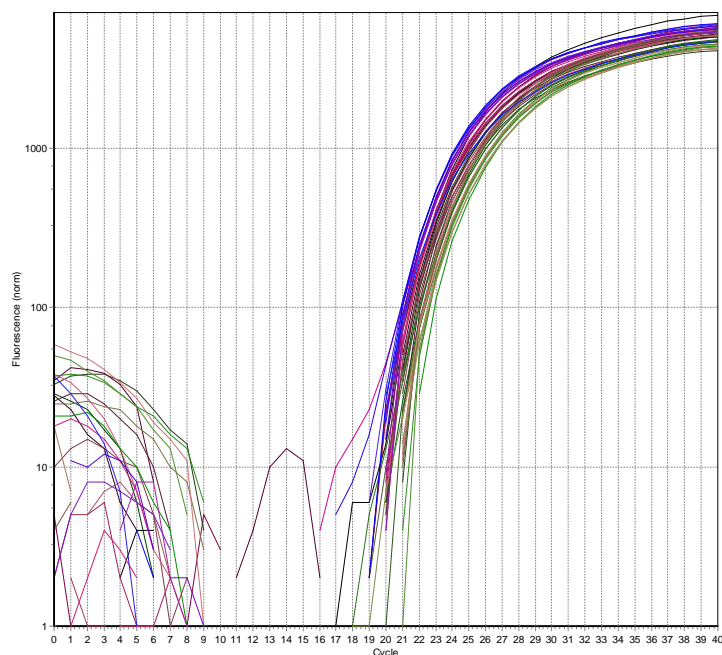


Slika 2. Krive disocijacije fragmenata gena za IFN-gama koji sadrži rs2430561 umnoženih prema uslovima iz sheme 1.

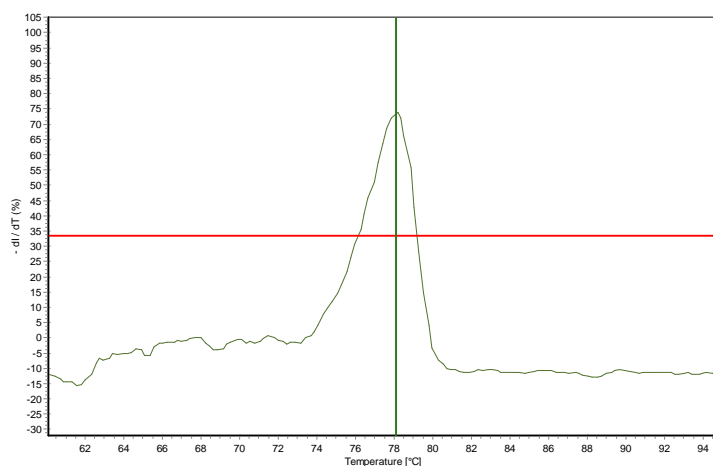
Da bi se još preciznije utvrdila koncentracija prajmera koja je optimalna za amplifikaciju DNK fragmenta koji sadrži rs2430561, još jednom je vršena amplifikacija sa koncentracijama oligonukleotida i temperaturama slepljivanja kao na shemi 2. Temperaturni ciklus se odvijao na sledećim temperaturama: 95°C 15 sekundi → 54-66°C 1 minut (Shema 2) → 68°C 20 sekundi sa 39 ponavljanja i MCA po završetku amplifikacije. Merenje fluorescencije u svakom ciklusu vršeno je na 68°C. Koncentracije svih reaktanata osim oligonukleotida su ostale kao i u prethodnom koraku optimizacije.

												
	54,0°C	54,8°C	55,9°C	57,0°C	58,2°C	59,4°C	60,6°C	61,8°C	63,0°C	64,2°C	65,3°C	66,0°C
F900 nM / R900 nM	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK						
F900 nM / R600 nM	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK						
F900 nM / R300 nM	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK						
F600 nM / R900 nM	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK						
F600 nM / R600 nM	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK						
F600 nM / R300 nM	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK						
F300 nM / R900 nM	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK						
F300 nM / R600 nM	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK						

Shema 2. Koncentracije oligonukleotida i temperature u termobloku tokom slepljivanja u drugom koraku optimizacije oligonukleotida.



Slika 3. Krive amplifikacije fragmenata gena za IFN-gama koji sadrži rs2430561 umnoženih prema uslovima iz sheme 2.




Slika 4. Kriva disocijacije fragmenta gena za IFN-gama koji sadrži rs2430561 umnoženih prema uslovima iz sheme 2.

Nakon drugog koraka optimizacije koncentracije F i R oligonukleotida su fiksirane na 600 nM (Slika 3), jer ove koncentracije prajmera su davale dobar prinos amplifikacije na svim temperaturama i nije bilo prajmerskih dimera što je potvrđeno analizom krive topljenja nastalih PCR produkata (Slika 4).

3.6.3. Optimizovanje uslova detekcije proba specifičnih za rs2430561

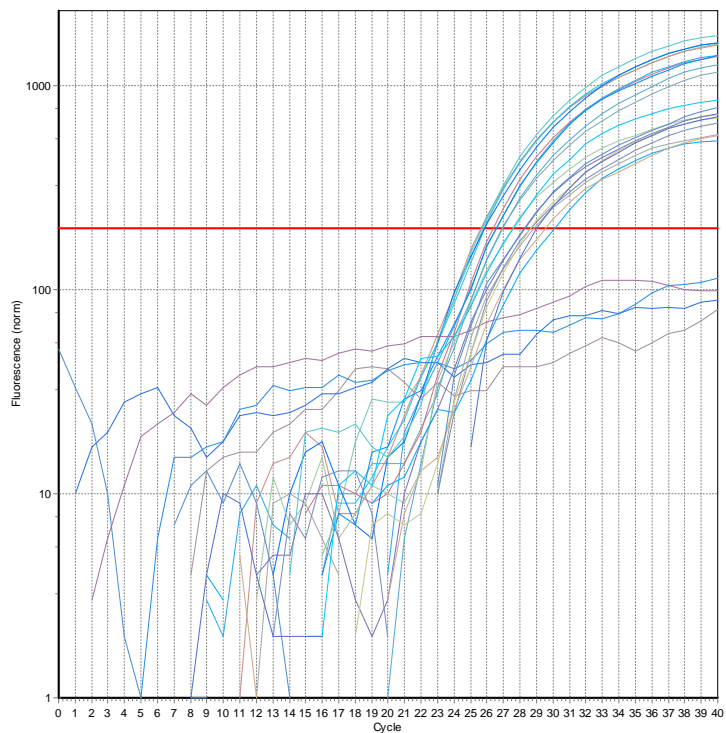
Optimizacija koncentracija TaqMan proba vršena je sa istim koncentracijama DNK kao u prethodno opisanim koracima optimizacije prajmera samo što je iz reakcione smeše izostavljena EvaGreen a koncentracija prajmera je fiksirana na F600 nM / R600 nM. Zatim su pipetirane IFNGA i IFNGT TaqMan probe u zapremini od 4 μ l kako bi se u ploči napravile razblaženja proba kao na shemi 3. Ploča je inkubirana 4 minuta na 95°C a zatim se temperaturni ciklus odvijao na sledećim temperaturama: 95°C 15 sekundi → 47,8-59,6°C (shema3) → 1 minut i 68°C 20 sekundi sa 39 ponavljanja. Merenje fluorescencije u svakom ciklusu vršeno je na 68°C.



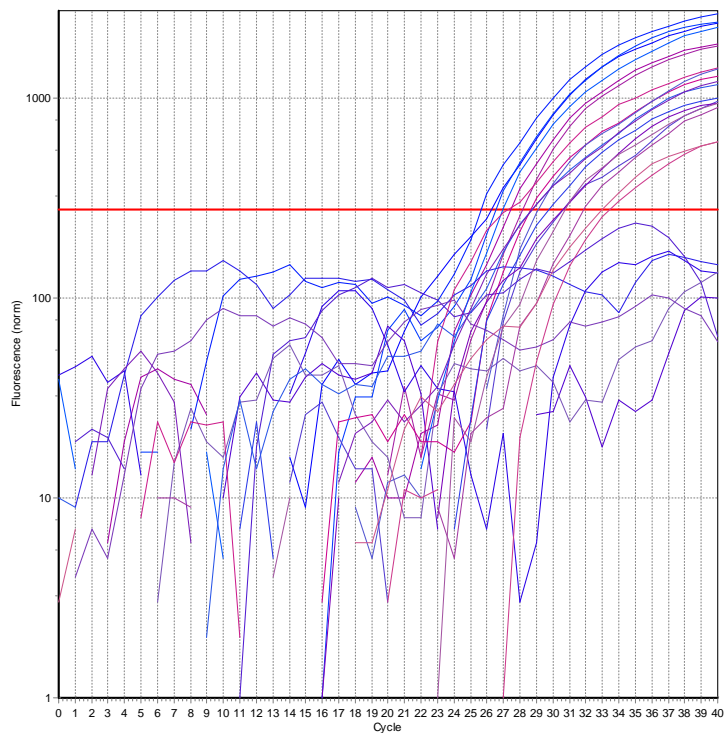
	47,8°C	48,5°C	49,4°C	50,6°C	51,8°C	53,0°C	54,2°C	55,4°C	56,8°C	58,0°C	58,9°C	59,6°C
A 800 nM							DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK
A 600 nM							DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK
A 400 nM							DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK
A 200 nM							DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK
T 800 nM							DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK
T 600 nM							DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK
T 400 nM							DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK
T 200 nM							DNK	DNK	DNK	DNK	DNK	DNK

Shema 3. Koncentracije TaqMan proba A i T i temperature u termobloku tokom slepljivanja u prvom koraku optimizacije.

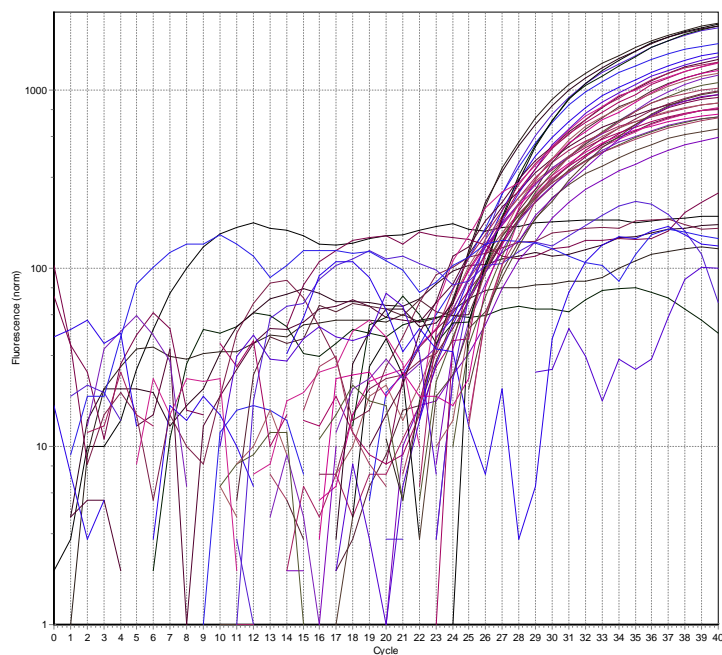
Nakon analize krivih amplifikacije zaključeno je da se optimalni rezultati postižu sa 200 nM koncentracijom A TaqMan probe (Slike 5 i 7) i 400 nM koncentracijom T TaqMan probe (Slike 6 i 7) na temperaturi slepljivanja oligonukleotida od 54,2°C i 55,4°C. Zbog toga su ove koncentracije proba i temperatura od 55°C uzete kao standard za sledeće korake optimizacije.



Slika 5. Krive amplifikacije fragmenata gena za IFN-gama koji sadrži rs2430561 umnoženih prema uslovima iz sheme 3 sa A TaqMan probom.



Slika 6. Krive amplifikacije fragmenata gena za IFN-gama koji sadrži rs2430561 umnoženih prema uslovima iz sheme 3 sa T TaqMan probom.



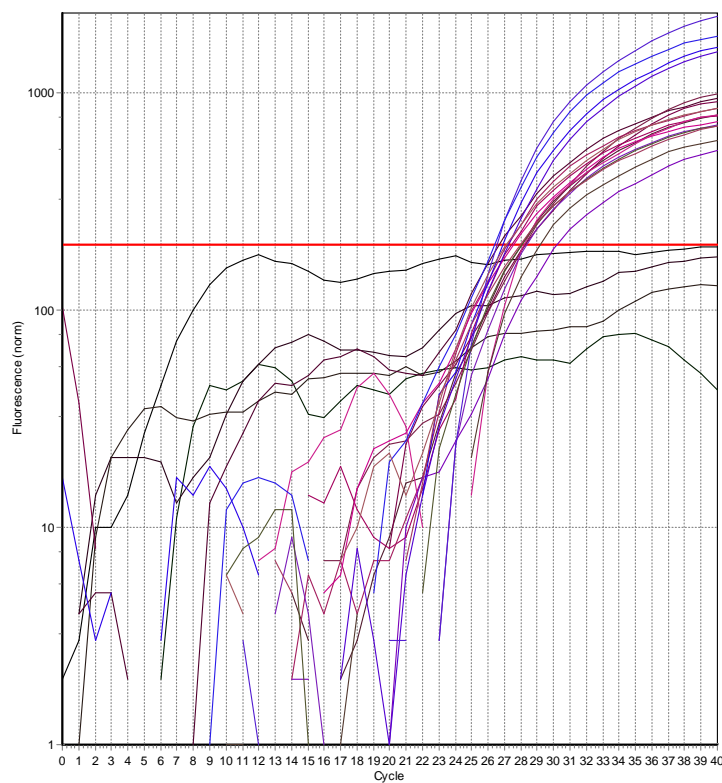
Slika 7. Krive amplifikacije fragmenata gena za IFN-gama koji sadrži rs2430561 umnoženih prema uslovima iz sheme 3 sa A i T TaqMan probama.

Dalje, bilo je potrebno utvrditi da li utvrđene koncentracije oligonukletidnih prajmera i proba mogu da se koriste za detekciju rs2430561 polimorfizma u pojedinačnim DNK uzorcima. Zbog velike učestalosti ređeg +874 T alela gena za IFN-gama u populacijama bele rase smatrano je da je deset uzoraka DNK od različitih donora dovoljno za detekciju prisustva oba ispitivana alela (Shema 4). Pripremljene su dve oligonukleotidne smeše. Prva je sadržala 24 μM F / 24 μM R i 8 μM A TaqMan probu a druga 24 μM F / 24 μM R i 16 μM T TaqMan probu i korišćene su kao 40 x koncentrovane smeše oligonukleotida. MasterMixovi su napravljeni mešanjem 0,25 μl oligonukleotidnih smeša sa 5 μl Maxima™ Probe qPCR 2X MasterMixa (Fermentas, Vilnius, Litvanija) za svaki bunarčić ploče u kome se vršila amplifikacija uzoraka DNK i kontrola (Shema 4). Svi uzorci su analizirani u duplikatu, kao negativna kontrola reakcije korišćena je voda a kao pozitivna kontrola reakcije korišćena je DNK smeša pripremljena u prethodnim koracima optimizacije. Nakon pipetiranja MasterMixova u ploče pipetirani su i uzorci DNK u zapremini od 4,75 μl (4 ng/ μl), voda i kontrolna DNK iz prethodnih eksperimenata. Ploča je zatim zatvorena optičkim filmom, kratko centrifugirana i zatim smeštena u termoblok gde je inkubirana 4 minuta na 95°C. Nakon toga se temperaturni ciklus odvijao na temperaturama od 95°C 15 sekundi → 55°C 1 minut → 68°C 20 sekundi sa 39 ponavljanja. Merenje fluorescencije u svakom ciklusu vršeno je na 68°C.

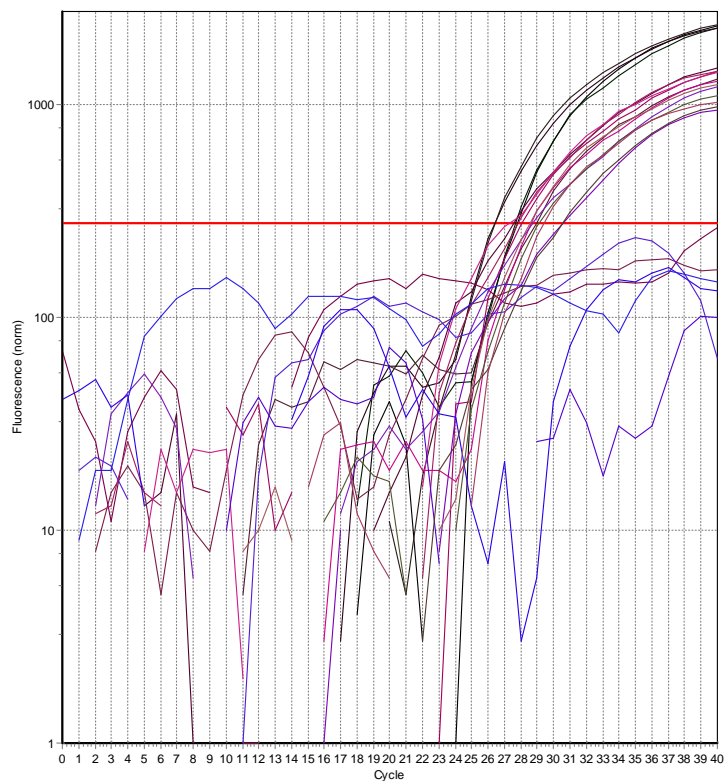
55°C

A 200 nM	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	H ₂ O	DNK
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	H ₂ O	DNK
T 400 nM	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	H ₂ O	DNK
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	H ₂ O	DNK

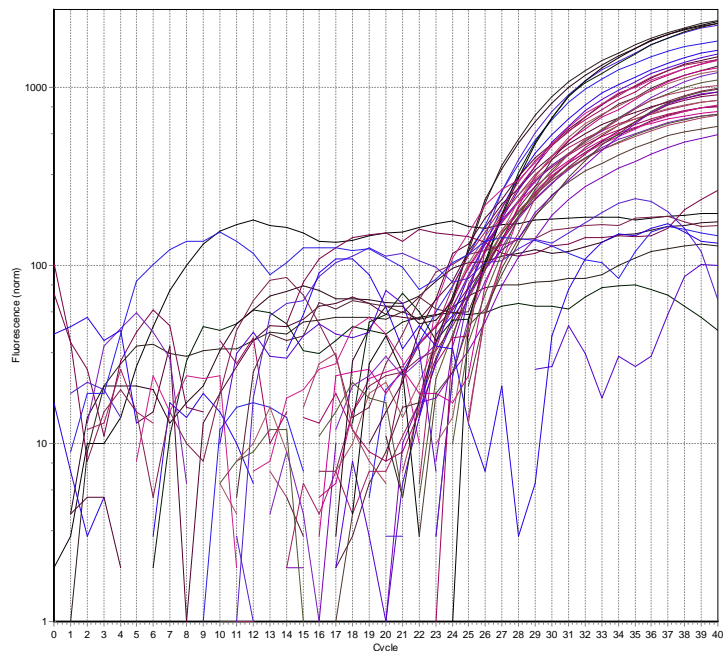
Shema 4. Raspored uzoraka i koncentracije TaqMan proba A i T sa temperaturom u termobloku tokom slepljivanja u drugom koraku optimizacije, na uzorcima DNK od deset dobrovoljnih davalaca krvi.



Slika 8. Krive amplifikacije fragmenata gena za IFN-gama koji sadrži rs2430561 umnoženih prema uslovima iz sheme 4 sa A TaqMan probom.



Slika 9. Krive amplifikacije fragmenata gena za IFN-gama koji sadrži rs2430561 umnoženih prema uslovima iz sheme 4 sa T TaqMan probom.



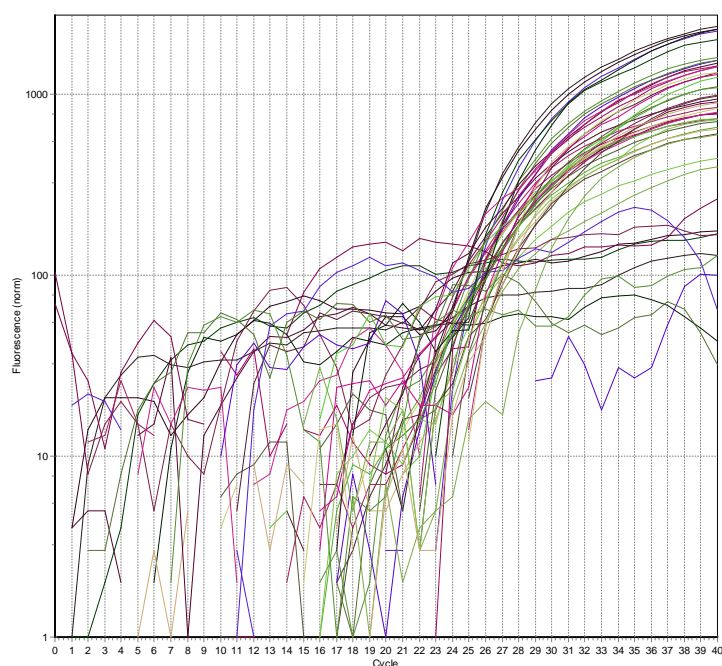
Slika 10. Krive amplifikacije fragmenata gena za IFN-gama koji sadrži rs2430561 umnoženih prema uslovima iz sheme 4 sa A i T TaqMan probama.

Pošto je određivanje rs2430561 polimorfizma gena za IFN-gama bilo uspešno sa testiranim koncentracijama oligonukleotida kao i temperaturama i dužinama koraka temperaturnog ciklusa (Slike 8, 9 i 10), provereno je da li ovako određeni PCR parametri omogućavaju istovremenu detekciju oba alela u istoj reakcionoj posudi odnosno bunarčiću ploče. Zbog toga je napravljena 40 x koncentrovana oligonukleotidna smeša koja je sadržala 24 μM F / 24 μM R / 8 μM A TaqMan probu / 16 μM T TaqMan probu. Ostali reaktanti su pomešani kao u prethodnom koraku optimizacije u rasporedu koji je prikazan na shemi 5. Svi dalji postupci, temperature i vremena inkubacije bili su identični onima u prethodnom koraku optimizacije proba.

A 200 nM / T 400 nM	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	H ₂ O	DNK
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	H ₂ O	DNK

Shema 5. Raspored uzoraka i koncentracije TaqMan proba A i T u istoj reakcionoj posudi u trećem koraku optimizacije na uzorcima DNK od deset dobrovoljnih davalaca krvi.

Nakon analize krivih amplifikacije zaključeno je da je pri istovremenoj reakciji obe probe, signal A probe bio nešto slabiji (Slika 11) nego kada je amplifikacija bila sa pojedinačnim probama (Slika 8) pa je povećana koncentracija A probe u reakcionoj smeši.

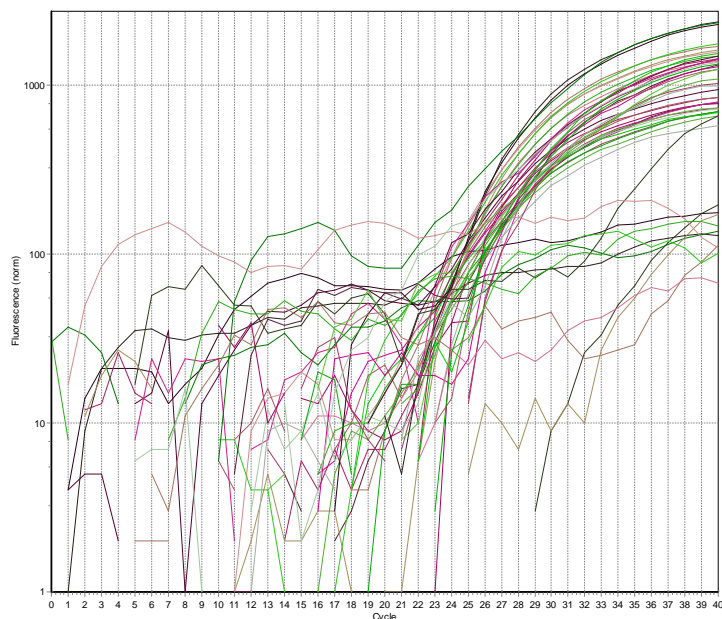


Slika 11. Krive amplifikacije fragmenata gena za IFN-gama koji sadrži rs2430561 umnoženih prema uslovima iz sheme 5 sa A i T TaqMan probama.

Napravljena je nova 40 x koncentrovana oligonukleotidna smeša koja je sadržala 24 μM F / 24 μM R / 10 μM A TaqMan probu / 16 μM T TaqMan probu. Ostali reaktanti su pomešani kao u drugom koraku optimizacije proba u rasporedu koji je prikazan na shemi 6. Svi dalji postupci, temperature i vremena inkubacije bili su identični onima u prethodnom koraku optimizacije proba.

A 250 nM / T 400 nM	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	H ₂ O	DNK
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	H ₂ O	DNK

Shema 6. Raspored uzoraka i koncentracije TaqMan proba A i T u istoj reakcionoj posudi u četvrtom koraku optimizacije.



Slika 12. Krive amplifikacije fragmenata gena za IFN-gama koji sadrži rs2430561 umnoženih prema uslovima iz sheme 6 sa A i T TaqMan probama.

Nakon ovog koraka optimizacije PCR uslova postignuta je zadovoljavajuća moć smeše oligonukleotida za diskriminaciju rs2430561 polimorfizma na nivou individualnih DNK uzoraka (Slika 12).

3.6.4. Detekcija rs2430561 polimorfizma u uzorcima DNK pojedinačnih ispitanika

Za detekciju i analizu rs2430561 polimorfizma gena za IFN-gama korišćene su prethodno optimizovane smeše specifičnih oligonukleotida i TaqMan proba obeleženih FAM i VIC fluorohromima (600 nM F / 600 nM R / 250 nM A TaqMan proba / 400 nM T TaqMan proba, finalne koncentracije). Amplifikacija fragmenata DNK Real-time PCR metodom vršena je pomoću navedenih smeša oligonukleotida i Maxima™ Probe qPCR 2X MasterMix, (Fermentas, Vilnius, Litvanija). Kao i u ostalim analizama polimorfizama, amplifikacija je vršena u optičkim pločama za PCR formata 8 x 12 bunarčića (PE, Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD), u koje su sipane reakcione smeše od 5 µl 2 x Real MasterMix Probe (Fermentas, Vilnius, Litvanija), 0,25 µl optimizovane smeše oligonukleotida za detekciju rs2430561 polimorfizma i 4,75 µl ispitivanog DNK uzorka (4 ng/µl). Ploče su zatim zatvarane lepljenjem optičkog filma (PE, Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD), kratko centrifugirane na 1500g i smeštane u termoblok Realplex² PCR mašine (Eppendorf, Hamburg, SR Nemačka). Ploče su pre amplifikacije inkubirane u termobloku 4 minuta na 95°C da bi se aktivirala DNK polimeraza. Temperaturni profil amplifikacije je bio 95°C 15 sec → 55°C 1 minut → 68°C 20 sekundi sa 39 ponavljanja. Merenje fluorescencije u svakom ciklusu vršeno je na 68°C. Po završetku amplifikacije određivani su aleli pomoću Realplex 2.0 softvera uz ručno podešavanje linije praga detekcije.

3.7. Statistička obrada podataka

Distribucije alela i genotipova određivane su kod pacijenata sa psorijazom i zdravih osoba (kontrolna grupa). Hardy-Weinberg ravnoteža (*engl.* Hardy-Weinberg equilibrium, HWE) je ispitivana posebno za pacijente i kontrole, kao i za obe grupe ispitanika zajedno. Statistička analiza podataka sastojala se iz primene χ^2 testa ili Fišerovog testa tačne verovatnoće za procenu značajnosti razlike u frekvencijama dobijenih alela i genotipova između ispitivanih bolesnika i kontrolne grupe. U svim testovima vrednosti verovatnoće, p-vrednosti manje od 0,05 smatrane su značajnima, a manje od 0,01 visoko značajnim.

Efekti ispitivanih genskih polimorfizama, i mogućih rizika za nastanak psorijaze su procenjivani za podgrupe pacijenata sa ranim početkom bolesti, kasnim početkom bolesti i psorijaznim artritismom, pri čemu je kao mera efekta korišćen odnos šansi (*engl.* odds ratio, OR) sa intervalom poverenja od 95% (95% IP) za svaki ispitivani polimorfizam.

4. REZULTATI

4.1. Ispitivanje polimorfizma gena za TNF (rs1800629) kod kontrola i pacijenata sa psorijazom

Ispitivanje rs1800629 polimorfizma u promotoru gena za TNF vršeno je TaqMan PCR metodom pomoću komercijalnih oligonukleotida. Rezultati distribucije alela i genotipova prikazani su u tabeli 1 i na prilogu 1. U cilju poređenja sa rezultatima dobijenim u okviru ovog istraživanja, na prilogu 1 prikazana je distribucija alela i genotipova [HapMap-CEU](#) referentne populacije (belci iz Jute, SAD, poreklom iz Evrope). Pored toga, u tabeli 1 i na prilogu 1 prikazana je i distribucija nosioca G i A alela kod ispitanika, pri čemu su nosioci G osobe sa GG i GA genotipovima, a nosioci A su osobe sa GA i AA genotipovima. Pacijenti sa psorijazom u tabeli 1 i na prilogu 1 su prikazani kao jedna grupa (ukupna psorijaza) i podeljeni u dve podgrupe (tip 1 i tip 2) u odnosu na uzrast u trenutku postavljanja dijagnoze. Iz grupe pacijenata sa psorijazom je posebno izdvojena i analizirana podgrupa pacijenata koji su imali i psorijazni artritis.

Tabela 1. Aleli i genotipovi rs1800629 polimorfizma gena za TNF kod kontrola i pacijenata.

	Kontrole		Psoriasis vulgaris				Psorijazni artritis	
	n	f	n	f	n	f	n	f
TNF rs1800629								
Aleli	G	454 0,876	235 0,904	111 0,895	124 0,912	48 0,923		
	A	64 0,124	25 0,096	13 0,105	12 0,082	4 0,077		
Genotipovi	GG	196 0,757	106 0,815	50 0,807	56 0,824	22 0,846		
	GA	62 0,239	23 0,177	11 0,177	12 0,176	4 0,154		
	AA	1 0,004	1 0,008	1 0,016	0 0,000	0 0,000		
Nosioci	G	258 0,996	129 0,992	61 0,984	68 1,000	26 1,000		
	A	63 0,243	24 0,184	12 0,193	12 0,176	4 0,154		

Nosioci G su osobe sa GG i GA genotipovima, nosioci A su osobe sa GA i AA genotipovima.



Prilog 1. Grafički prikaz distribucija alela, genotipova i nosioca alela rs1800629 polimorfizma gena za TNF.

U cilju testiranja da li distribucija genotipova odgovara distribuciji alela koji su određeni za ispitanike u ovom istraživanju izračunato je da li se dobijeni rezultati učestalosti genotipova nalaze u Hardy-Weinberg ravnoteži (Tabela 2).

Tabela 2. Testiranje distribucije genotipova rs1800629 polimorfizma gena za TNF u odnosu na Hardy-Weinberg ravnotežu.

TNF rs1800629	Kontrole	Psorijaza	Ukupno
Genotipovi			
GG	196	106	302
GA	62	23	85
AA	1	1	2
Ukupno	259	130	389
HWE*	$X^2= 2,87$	$X^2= 0,04$	$X^2= 2,39$

*Hardy-Weinberg ekvilibrijum, nivo značajnosti, $p>0,05$.

Dobijeni rezultati pokazuju da je distribucija genotipova rs1800629 polimorfizma gena za TNF bila u Hardy-Weinberg ravnoteži, $p>0,05$.

Raspodela alela u populaciji zdravih osoba iz Srbije upoređena je sa podacima za druge populacione grupe da bi se utvrdilo da li postoje razlike između frekvencija G i A alela rs1800629 polimorfizma gena za TNF između kontrola iz Srbije i zdravih osoba sa drugih geografskih područja. Ovi rezultati su prikazani u tabeli 3.

Tabela 3. rs1800629 polimorfizam gena za TNF kod zdravih osoba u različitim populacijama.

Referenca	Populacija	Broj	Metod	G alel (%)	A alel (%)	p
(Popadic i sar., u štampi)	Srbija	259	TaqMan	87,6	12,4	NP
(Hamamoto i sar., 2000)	Japan	87	PCR	97,1	2,9	0,0001
(Craven i sar., 2001)	UK	66	PCR/SSP	83,0	17,0	0,1923
(Hohler i sar., 2002)	Nemačka	99	PCR/SSP	83,2	16,8	0,1319
(Reich i sar., 2002)	Nemačka	345	PCR/RFLP	83,9	16,1	0,0680
(Poli i sar., 2002)	Italija	363	PCR/SSP	87,7	12,4	1
(Drulovic i sar., 2003)	Srbija	123	PCR/RFLP	87,8	12,2	1
(Mossner i sar., 2005)	Estonija	135	PCR/RFLP	84,8	15,2	0,2674
(Baran i sar., 2006)	Poljska	74	PCR/SSP	87,8	12,2	1
(Boraska i sar., 2008)	Hrvatska	144	PCR/RFLP	83,3	16,7	0,0897
(Settin i sar., 2009)	Egipat	98	PCR/SSP	47,4	52,6	0,0001
(Shukla i sar., 2012)	Indija	208	ARMS-PCR	92,8	7,2	0,0094
(Han i sar., 2012)	Koreja	291	PCR/RFLP	99,7	0,3	0,0001
(Sandhya i sar., 2013)	Indija	39	PCR/RFLP	92,3	7,7	0,2334
(Corchado i sar., 2013)	Španija	55	TaqMan	88,0	12,0	0,8875

NP, nije primenjivo.

Kao što je prikazano u tabeli 3, frekvencije G i A alela rs1800629 polimorfizma gena za TNF u zdravoj populaciji Srbije nisu se statistički značajno razlikovale u odnosu na populacije: Velike Britanije, Nemačke, Italije, Estonije, Poljske, Hrvatske, južne Indije i Španije. Statistički visoko značajna razlika ustanovljena je između zdrave populacije Srbije i populacija Japana, Egipta, severne Indije i Koreje.

U tabeli 4 su prikazani rezultati poređenja distribucije alela i genotipova rs1800629 polimorfizma kod pacijenata sa psorijazom i kontrola. Statistička analiza je pokazala da ne postoji statistički značajna razlika u distribuciji alela i genotipova između pacijenata sa psorijazom i kontrola, kao ni između podgrupe pacijenata sa psorijaznim artritismom i kontrola. Ipak, na osnovu odnosa šansi (OR) u okviru intervala poverenja od 95% (95% IP) rezultati ukazuju da bi G alel potencijalno predstavljao faktor rizika za nastanak psorijaze jer vrednosti odnosa šansi iznose 1,325 (95% IP 0,813–2,160) za grupu pacijenata sa psorijazom, odnosno 1,691 (95% IP 0,590–4,848) za pacijente sa psorijaznim artritismom. Prisustvo GG genotipa uvećava OR vrednosti na 1,420 (95% IP 0,840–2,403) kod pacijenata sa psorijazom i na 1,768 (95% IP 0,587–5,324) kod pacijenata sa psorijaznim artritismom, što je prikazano u tabeli 4. Nasuprot tome, A alel bi mogao da ima izvesnu protektivnu ulogu pa bi nosioci A alela imali manji rizik za nastanak psorijaze (OR=0,704, 95% IP 0,416–1,192) kao i psorijaznog artritisa (OR=0,566, 95% IP 0,188–1,704), tabela 4.

Tabela 4. Statistička analiza distribucije G i A alela, genotipova i nosioca alela rs1800629 polimorfizma gena za TNF između pacijenata sa psorijazom, psorijaznim artritismom i kontrola.

<i>TNF</i> (rs1800629)	Psorijaza / kontrole			Psorijazni artritis / kontrole	
		p	OR (95% IP)	p	OR (95% IP)
Aleli	G	0,258	1,325 (0,813–2,160)	0,322	1,691 (0,590–4,848)
	A		0,755 (0,463–1,230)		0,591 (0,206–1,695)
Genotipovi	GG	0,191	1,420 (0,840–2,403)	0,306	1,768 (0,587–5,324)
	GA	0,159	0,683 (0,401–1,164)	0,306	0,565 (0,188–1,704)
	AA	1,000 [†]	2,000 (0,124–32,24)	1,000 [†]	NP
Nosioci	G	1,000 [†]	0,500 (0,031–8,059)	1,000 [†]	NP
	A	0,191	0,704 (0,416–1,192)	0,306	0,566 (0,188–1,704)

OR odnos šansi, IP interval poverenja, [†]Fišerov test tačne verovatnoće, NP nije primenjivo.

Dalje, ispitano je da li se distribucije G i A alela, genotipova i nosioca ovih alela razlikuju između pacijenata sa ranim i kasnim početkom bolesti u odnosu na kontrole i međusobno (Tabela 5).

Tabela 5. Statistička analiza distribucija alela, genotipova i nosioca alela rs1800629 polimorfizma gena za TNF između pacijenata sa psorijazom tip 1 i 2 i kontrola kao i međusobno.

<i>TNF</i> rs1800629		PV tip 1 / kontrole		PV tip 2 / kontrole		PV tip 2 / PV tip 1	
		p	OR (95% IP)	p	OR (95% IP)	p	OR (95% IP)
Aleli	G		1,204 (0,64–2,26)		1,457 (0,76–2,78)		1,210 (0,53–2,76)
	A	0,57	0,831 (0,44–1,56)	0,25	0,687 (0,36–1,31)	0,65	0,826 (0,36–1,89)
Genotipovi	GG	0,41	1,339 (0,67–2,67)	0,24	1,500 (0,76–2,98)	0,81	1,120 (0,46–2,72)
	GA	0,29	0,685 (0,34–1,39)	0,27	0,681 (0,34–1,35)	1,00	0,994 (0,40–2,45)
	AA	0,35 [†]	4,230 (0,26–68,5)	1,00 [†]	NP	0,48 [†]	NP
Nosioći	G	0,35 [†]	0,236 (0,02–3,83)	1,00 [†]	NP	0,48 [†]	NP
	A	0,41	0,747 (0,37–1,49)	0,24	0,667 (0,33–1,33)	0,81	0,893 (0,37–2,17)

OR odnos šansi, IP interval poverenja, [†]Fišerov test tačne verovatnoće, NP nije primenjivo.

Kao što je prikazano u tabeli 5, nema statistički značajne razlike između poređenih grupa. G alel bi mogao da predstavlja faktor višeg rizika za nastanak psorijaze tip 2 (OR=1,457, 95% IP 0,76–2,78) i psorijaze tip 1 (OR=1,204, 95% IP 0,64–2,26). Prisustvo GG genotipa uvećava šanse za nastanak psorijaze tip 2 (OR=1,500, 95% IP 0,76–2,98). Saglasno prethodnim rezultatima, nosioći A alela imaju manju šansu da dobiju psorijazu tip 2 (OR=0,667, 95% IP 0,33–1,33). Nijedna od razlika međutim nije dostigla nivo statističke značajnosti.

U cilju ispitivanja povezanosti pojedinih alela rs1800629 polimorfizma gena za TNF i težine kliničke manifestacije psorijaze analizirane su frekvencije nosioca G i A alela kod pacijenata grupisanih na osnovu vrednosti PASI skora (Tabela 6).

Tabela 6. Nosioci rs1800629 polimorfizma gena za TNF grupisanih na osnovu vrednosti PASI skora

<i>TNF</i> rs1800629	Nizak PASI	Srednji PASI	Visok PASI	p
Nosioci				
G (GG i GA)	11 (91,7%)	63 (100,0%) ^a	55 (100,0%) ^b	0,007
A (AA i AG)	3 (25,0%)	11 (17,5%)	10 (18,2%)	0,826

^ap=0,022, ^bp=0,032, u poređenju sa grupom pacijenata na niskim PASI skorom.

Rezultati prikazani u tabeli 6 pokazuju da postoji statistički visoko značajna razlika (p=0,007) u frekvenciji G alela, odnosno GG i GA genotipa kod pacijenata sa visokim i srednjim PASI skorom u poređenju sa grupom pacijenata sa niskim PASI skorom. Nema statistički značajne razlike u frekvenciji A alela, AA i GA genotipa i vrednosti PASI skora.

4.2. Ispitivanje polimorfizma gena za IFN-gama (rs2430561) kod kontrola i pacijenata sa psorijazom

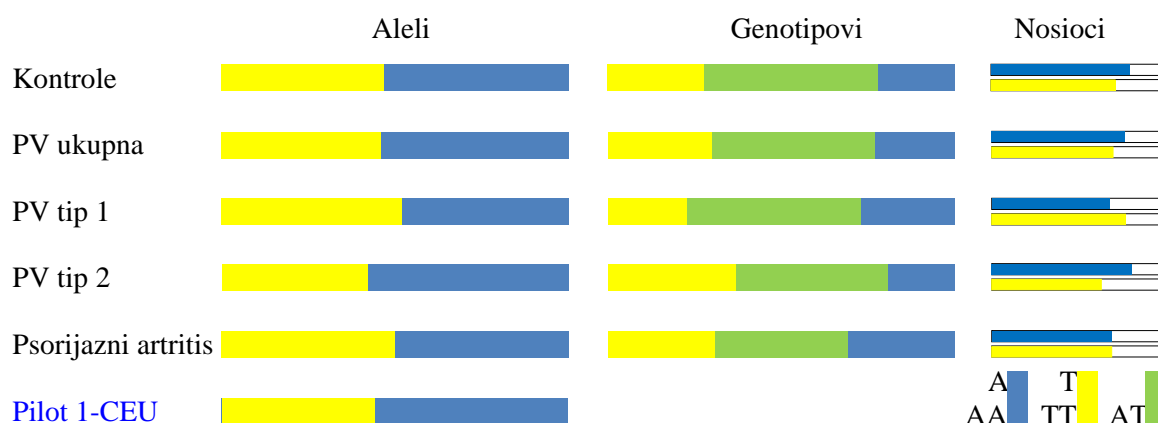
Ispitivanje rs2430561 polimorfizma u prvom intronu gena za IFN-gama vršeno je pomoću oligonukleotidnih prajmera i proba dizajniranih Primer Express 2.0 programom, tako da otkrivaju +874 (T/A) polimorfizam gena za IFN-gama. Amplifikacija fragmenata DNK Real-time PCR metodom vršena je pod uslovima optimizovanim u većem broju eksperimenata koji su omogućili razlikovanje između ova dva alela, a što je prethodilo analizi alelske distribucije kod zdravih kontrola i pacijenata sa psorijazom.

Rezultati distribucije alela i genotipova rs2430561 polimorfizma gena za IFN-gama prikazani su u tabeli 7 i na prilogu 2. U cilju poređenja rezultata ovog istraživanja, na prilogu 2 je prikazana distribucija alela i genotipova [Pilot 1-CEU](#) subpopulacije izvedene iz [HapMap-CEU](#) referentne populacije. Pored toga, u tabeli 7 i na prilogu 2 prikazana je i distribucija nosioca A i T alela kod ispitanika, pri čemu su nosioci A osobe sa AA i AT a nosioci T osobe sa TT i TA genotipovima. Pacijenti sa psorijazom u tabeli 7 i na prilogu 2 su prikazani kao jedna grupa (koja obuhvata sve pacijente sa psorijazom) i podeljeni u dve podgrupe (psorijaza tip 1 i tip 2) u odnosu na starost u trenutku postavljanja dijagnoze. Iz grupe pacijenata sa psorijazom je posebno izdvojena i analizirana podgrupa pacijenata koji su imali i psorijazni artritis.

Tabela 7. Aleli i genotipovi rs2430561 polimorfizma gena za IFN-gama kod kontrola i pacijenata.

		Kontrole		Psoriasis vulgaris				Psorijazni artritis			
				Ukupna		Tip 1		Tip 2			
		n	f	n	f	n	f	n	f		
<i>IFNG</i> rs2430561											
Aleli	A	276	0,533	139	0,535	59	0,476	80	0,588	26	0,500
	T	242	0,467	121	0,465	65	0,524	56	0,412	26	0,500
Genotipovi	AA	74	0,286	39	0,300	14	0,226	25	0,368	8	0,308
	AT	128	0,494	61	0,469	31	0,500	30	0,441	10	0,384
	TT	57	0,220	30	0,231	17	0,274	13	0,191	8	0,308
Nosioci	A	202	0,800	100	0,769	45	0,677	55	0,809	18	0,692
	T	185	0,714	91	0,700	48	0,774	43	0,632	18	0,692

Nosioci A su osobe sa AA i AT genotipovima, nosioci T su osobe sa TT i TA genotipovima.



Prilog 2. Grafički prikaz distribucija alela, genotipova i nosioca alela rs2430561 polimorfizma gena za IFN-gama.

Slaganje između frekvencija alela i genotipova rs2430561 polimorfizma gena za IFN-gama je ispitano proverom Hardy-Weinberg ravnoteže (Tabela 8).

Tabela 8. Testiranje distribucije genotipova rs2430561 polimorfizma gena za IFN-gama u odnosu na Hardy-Weinberg ravnotežu.

<i>IFNG</i> rs2430561	Kontrola	Psorijaza	Ukupno
Genotipovi			
AA	74	39	113
AT	128	61	189
TT	57	30	87
Ukupno	259	130	389
HWE*	$X^2=0,01$	$X^2=0,42$	$X^2=0,22$

*Hardy-Weinberg ekvilibrijum, nivo značajnosti; $p>0,05$.

Rezultati ovog ispitivanja pokazuju da je distribucija genotipova rs2430561 polimorfizma gena za IFN-gama u Hardy-Weinberg ravnoteži, $p>0,05$ (Tabela 8).

Dobijeni rezultati raspodele alela u populaciji zdravih osoba iz Srbije upoređeni su sa objavljenim podacima za druge populacione grupe da bi se utvrdilo da li postoje razlike između frekvencija A i T alela rs2430561 polimorfizma gena za IFN-gama između kontrola iz Srbije i zdravih osoba iz drugih država. Ovi rezultati su prikazani u tabeli 9.

Tabela 9. rs2430561 polimorfizam gena za IFN-gama kod zdravih osoba u različitim populacijama.

Referenca	Populacija	Broj	Metod	A alel (%)	T alel (%)	p
(Popadić i sar., u štampi)	Srbija	259	TaqMan	53,3	46,7	NP
(Craven i sar., 2001)	Vel. Britanija	77	PCR	50,6	49,4	0,5657
(Poli i sar., 2002)	Italija	363	PCR/SSP	55,3	44,7	0,4976
(Govan i sar., 2003)	Južna Afrika	587	ARMS-PCR	75,0	25,0	0,0001
(Mihailova i sar., 2005)	Bugarska	86	PCR/SSP	51,2	48,8	0,6315
(Tso i sar., 2005)	Hong Kong	451	TaqMan	66,7	33,3	0,0001
(Etokebe i sar., 2006)	Hrvatska	519	TaqMan	53,0	47,0	0,9203
(Sallakci i sar., 2007)	Turska	115	pyroSeq.	52,2	47,8	0,7773
(Larcombe i sar., 2008)	Kanada	91	PCR/SSP	53,0	47,0	0,8875
(Taudorf i sar., 2008)	Danska	199	TaqMan	45,7	54,3	0,0234
(Baran i sar., 2008)	Poljska	74	PCR/SSP	46,6	53,4	0,1522
(Moura i sar., 2009)	Brazil	206	PCR/SSP	50,7	49,3	0,4386
(Gao i sar., 2010)	Kina	74	PCR/SSP	54,7	45,3	0,7518
(Lee i sar., 2010)	Tajvan	788	TaqMan	83,6	16,4	0,0001
(Mosaad i sar., 2010)	Egipat	118	ARMS-PCR	30,1	69,9	0,0001
(Popadic i sar., 2012)	Srbija	166	TaqMan	53,6	46,4	0,9203
(Kimkong i sar., 2012)	Tajland	268	PCR/SSP	75,9	24,1	0,0001

NP, nije primenjivo.

Kao što je prikazano u tabeli 9, frekvencije A i T alela u zdravoj populaciji Srbije nisu se statistički značajno razlikovale u odnosu na populacije Velike Britanije, Italije, Bugarske, Hrvatske, Turske, Kanade, Poljske, Brazila i Kine. Statistički značajna razlika u frekvencijama alela postoji između zdrave populacije Srbije i Danske. Statistički visoko značajna razlika postoji između zdrave populacije Srbije i populacija Južne Afrike, Hong Konga, Tajvana, Egipta i Tajlanda.

U tabeli 10 su prikazani rezultati poređenja distribucije alela i genotipova rs2430561 polimorfizma gena za IFN-gama kod pacijenata sa psorijazom, psorijaznim artritismom i kontrola. Analizom ovih rezultata moglo bi se zaključiti da A alel ne predstavlja faktor rizika za oboljevanje od psorijaze, (OR=1,007, 95% IP 0,747–1,358) kao ni da T alel ne predstavlja rizik za nastanak psorijaznog artritisa (OR=1,141, 95% IP 0,645–2,017). Prisustvo AA, a ni TT genotipa nije povećavalo rizik od oboljevanja ni kod pacijenata sa psorijazom ni kod pacijenata sa psorijaznim artritismom. Ipak, u grupi

pacijenata sa psorijaznim artritismom odnos šansi za oboljevanje je nešto viši (OR=1,575, 95% IP 0,651–3,809) kod pacijenata sa TT genotipom, ali razlika nije dostigla nivo statističke značajnosti.

Tabela 10. Statistička analiza distribucije A i T alela, genotipova i nosioca alela rs2430561 polimorfizma gena za IFN-gama između pacijenata sa psorijazom, psorijaznim artritismom i kontrola.

<i>IFNG</i> rs2430561		Psorijaza / kontrole		Psorijazni artritis / kontrole	
		p	OR (95% IP)	p	OR (95% IP)
Aleli	A	1,000	1,007 (0,747–1,358)	0,655	0,877 (0,496–1,551)
	T		0,993 (0,737–1,338)		1,141 (0,645–2,017)
Genotipovi	AA	0,764	1,071 (0,675–1,701)	0,806	1,111 (0,463–2,666)
	AT	0,639	0,905 (0,593–1,380)	0,286	0,640 (0,280–1,462)
	TT	0,806	1,063 (0,643–1,758)	0,310	1,575 (0,651–3,809)
Nosioci	A	0,806	0,941 (0,569–1,555)	0,310	0,635 (0,263–1,536)
	T	0,764	0,933 (0,588–1,481)	0,806	0,900 (0,375–2,160)

OR odnos šansi, IP interval poverenja.

Dalje, ispitano je da li se distribucije alela, genotipova i nosioca A i T alela rs2430561 polimorfizma gena za IFN-gama razlikuju između pacijenata sa ranim i kasnim početkom bolesti u odnosu na kontrole i međusobno. Kao što je prikazano u tabeli 11, nema statistički značajne razlike između poređenih grupa. Na osnovu vrednosti OR, T alel bi predstavljao faktor nešto većeg rizika za oboljevanje od tipa 1 psorijaze (OR=1,257, 95% IP 0,849–1,860), dok bi A alel predstavljao faktor većeg rizika za nastanak psorijaze tip 2 (OR=1,253, 95% IP 0,854–1,837) i psorijaznog artritisa (OR=1,574, 95% IP 0,964–2,571), ali ni jedna od ovih razlika ne dostiže nivo statističke značajnosti.

Kao što je prikazano u tabeli 11, prisustvo TT genotipa uvećava šanse za nastanak psorijaze tip 1 (OR=1,339, 95% IP 0,713–2,515), dok prisustvo AA genotipa uvećava rizik za nastanak psorijaze tip 2 (OR=1,454, 95% IP 0,829–2,549), a naročito psorijaznog artritisa (OR=1,993, 95% IP 0,924–4,323), ali bez statističke značajnosti. Saglasno prethodnim rezultatima, nosioci A alela nemaju statistički značajno veću šansu da dobiju psorijazu tip 2 (OR=1,194, 95% IP 0,610–2,338) i psorijazni artritis (OR=1,598, 95% IP

0,702–3,641), dok nosioci T alela nemaju statistički značajno veću šansu da dobiju tip 1 psorijaze (OR=1,371, 95% IP 0,713–2,636).

Tabela 11. Statistička analiza distribucije A i T alela, genotipova i nosioca alela rs2430561 polimorfizma gena za IFN-gama između pacijenata sa psorijazom tip 1 i 2 i kontrola kao i međusobno.

<i>IFNG</i> rs2430561		PV tip 1 / kontrole		PV tip 2 / kontrole		PV tip2/PV tip1	
		p	OR (95% IP)	p	OR (95% IP)	p	OR (95% IP)
Aleli	A	0,25	0,796 (0,54–1,18)	0,25	1,253 (0,85–1,84)	0,07	1,574 (0,96–2,57)
	T		1,257 (0,85–1,86)		0,798 (0,55–1,18)		0,635 (0,39–1,04)
Genotipovi	AA	0,34	0,729 (0,38–1,40)	0,19	1,454 (0,83–2,55)	0,08	1,993 (0,92–4,32)
	AT	0,92	1,023 (0,58–1,78)	0,44	0,808 (0,47–1,38)	0,50	0,790 (0,40–1,58)
	TT	0,36	1,339 (0,71–2,52)	0,60	0,838 (0,43–1,64)	0,26	0,626 (0,28–1,42)
Nosioci	A	0,36	0,747 (0,40–1,40)	0,60	1,194 (0,61–2,34)	0,26	1,598 (0,70–3,64)
	T	0,34	1,371 (0,71–2,64)	0,19	0,688 (0,39–1,21)	0,08	0,502 (0,23–1,09)

OR odnos šansi, IP interval poverenja.

U cilju utvrđivanja povezanosti A i T alela rs2430561 polimorfizma gena za IFN-gama i težine kliničke manifestacije psorijaze analizirane su frekvencije nosioca A i T alela kod pacijenata grupisanih na osnovu vrednosti PASI skora (Tabela 12).

Tabela 12. Nosioci A i T alela rs2430561 polimorfizma gena za IFN-gama grupisani na osnovu vrednosti PASI skora.

<i>IFNG</i> rs2430561	Nizak PASI	Srednji PASI	Visok PASI	p
Nosioci				
A (AA i AT)	11 (91,7%)	46 (73,0%)	43 (78,2%)	0,360
T (TT i TA)	9 (75,0%)	43 (68,3%)	39 (70,9%)	0,881

Kao što je prikazano u tabeli 12, nema statistički značajne razlike u distribuciji nosioca A i T alela između grupa pacijenata sa niskim, srednjim i visokim vrednostima PASI skora.

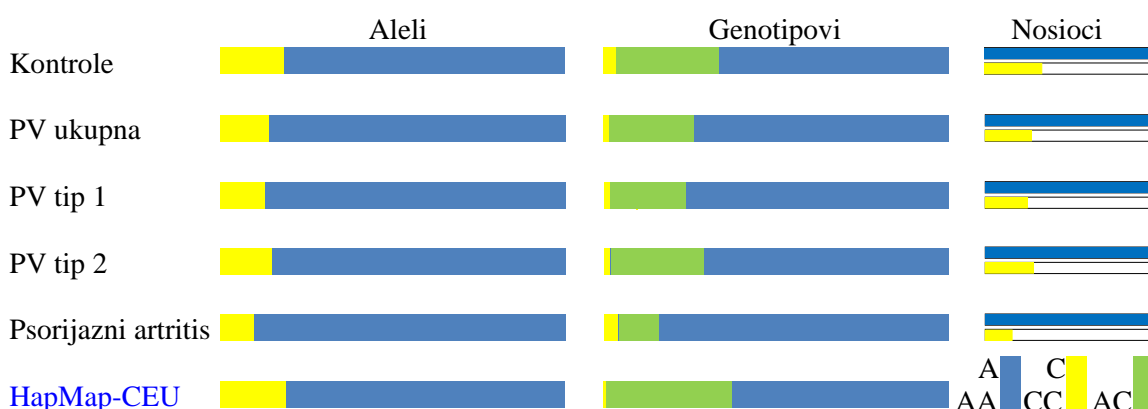
4.3. Ispitivanje polimorfizma gena za IL-12B (rs3212227) kod kontrola i pacijenata sa psorijazom

Komercijalni oligonukleotidi i TaqMan PCR metoda korišćeni su i za ispitivanje rs3212227 polimorfizma u 3' netransliranom regionu gena za IL-12B (p40). Rezultati distribucije alela i genotipova prikazani su u tabeli 13 i na prilogu 3. Na prilogu 3, prikazana je distribucija alela i genotipova [HapMap-CEU](#) referentne populacije, u cilju poređenja sa rezultatima ovog istraživanja. Pored toga u tabeli 13 i na prilogu 3, prikazana je i distribucija nosioca A i C alela kod ispitanika. Pacijenti (Tabela 13 i Prilog 3) su prikazani kao jedna grupa (koja obuhvata sve pacijente sa psorijazom) i podeljeni u dve podgrupe (psorijaza tip 1 i tip 2) u odnosu na starost u trenutku postavljanja dijagnoze. Iz grupe pacijenata sa psorijazom je posebno izdvojena i analizirana podgrupa pacijenata koji su imali i psorijazni artritis.

Tabela 13. Aleli i genotipovi rs3212227 polimorfizma gena za IL-12B kod kontrola i pacijenata.

		Kontrole		Psoriasis vulgaris				Psorijazni artritis			
		n	f	Ukupna		Tip 1		Tip 2			
				n	f	n	f	n	f	n	f
<i>IL12B rs3212227</i>											
Aleli	A	423	0,817	224	0,861	108	0,871	116	0,853	47	0,904
	C	95	0,183	36	0,139	16	0,129	20	0,147	5	0,096
Genotipovi	AA	173	0,668	96	0,739	47	0,758	49	0,720	22	0,846
	AC	77	0,297	32	0,246	14	0,226	18	0,265	3	0,115
	CC	9	0,035	2	0,015	1	0,016	1	0,015	1	0,039
Nosiooci	A	250	0,965	128	0,985	61	0,984	67	0,985	25	0,962
	C	86	0,332	34	0,262	15	0,242	19	0,279	4	0,154

Nosiooci A su osobe sa AA i AC genotipovima, nosiooci C su osobe sa AC i AA genotipovima.



Prilog 3. Grafički prikaz distribucija alela, genotipova i nosioca alela rs3212227 polimorfizma gena za IL-12B.

U cilju testiranja da li distribucija genotipova odgovara distribuciji alela koji su određivani za ispitanike u ovom istraživanju, izračunato je da li se dobijeni rezultati učestalosti genotipova nalaze u Hardy-Weinberg ravnoteži (Tabela 14).

Tabela 14. Testiranje distribucije genotipova rs3212227 polimorfizma gena za IL-12B u odnosu na Hardy-Weinberg ravnotežu.

Genotipovi		Kontrole	Psorijaza	Ukupno
IL12B rs3212227	AA	173	96	269
	AC	77	32	109
	CC	9	2	11
Ukupno		259	130	389
HWE*		$X^2=0,01$	$X^2=0,13$	$X^2=0$

*Hardy-Weinberg ekvilibrijum, nivo značajnosti; $p>0,05$.

Dobijeni rezultati pokazuju da je distribucija genotipova rs3212227 polimorfizma gena za IL-12B ($p=0,04$) bila u Hardy-Weinberg ravnoteži, $p>0,05$ (Tabela 14).

Rezultati raspodele alela u populaciji zdravih osoba iz Srbije upoređeni su sa objavljenim podacima za druge populacione grupe da bi se utvrdilo da li postoje razlike između frekvencija A i C alela rs3212227 polimorfizma gena za IL-12B između kontrola iz Srbije i zdravih osoba iz drugih država. Ovi rezultati su prikazani u tabeli 15.

Tabela 15. rs3212227 polimorfizam gena za IL-12B kod zdravih osoba u različitim populacijama.

Referenca	Populacija	Broj	Metod	A alel (%)	C alel (%)	p
(Popadic i sar., u štampi)	Srbija	259	TaqMan	81,7	18,3	NP
(Filer i sar., 2008)	Vel. Britanija	4681	DNK sekv.	80,6	19,4	0,5541
(Chen i sar., 2009)	Kina	404	PCR-RFLP	60,0	40,0	0,0001
(Nair i sar., 2010)	Tajland	114	TaqMan	50,9	49,1	0,0001
(Haralambieva i sar., 2011)	SAD	744	Mikroniz	74,9	25,1	0,0018
(Morris i sar., 2011)	Gambija	286	TaqMan	64,0	36,0	0,0001
(Morris i sar., 2011)	Gvineja Bisau	286	TaqMan	69,0	30,0	0,0001
(Grzegorzewska i sar., 2012)	Poljska	240	PCR/RFLP	78,9	21,0	0,2835
(Navratilova i sar., 2012)	Češka	185	PCR/SSP	79,0	21,0	0,3102
(Ohman i sar., 2012)	Finska	106	MALDI-TOF	91,5	8,5	0,0008
(Glas i sar., 2012)	Nemačka	965	TaqMan	79,1	20,9	0,2017

NP, nije primenjivo.

Kao što je prikazano u tabeli 15, statistički visoko značajna razlika postoji u frekvencijama alela rs3212227 polimorfizma gena za IL-12B kod zdravih stanovnika Srbije u odnosu na populacije Kine, Tajlanda, SAD, Gambije, Gvineje Bisau i Finske. Nije ustanovljena statistički značajna razlika u frekvencijama alela između populacije Srbije i populacija Velike Britanije, Poljske, Češke i Nemačke.

U tabeli 16 su prikazani rezultati poređenja distribucije A i C alela genotipova i nosioca alela rs3212227 polimorfizma gena za IL-12B kod pacijenata sa psorijazom i kontrola. Na osnovu tih rezultata moglo bi se zaključiti da je A alel udružen sa nešto većim rizikom za oboljevanje od psorijaze (OR=1,397, 95% IP 0,922–2,119) i psorijaznog artritisa (OR=2,111, 95% IP 0,817–5,450), ali razlike ne dostižu nivo statističke značajnosti. Prisustvo AC genotipa je statistički značajno ređe (p=0,049) kod pacijenata sa psorijaznim artritisom (OR=0,308, 95% IP 0,090–1,057) što ukazuje na mogući protektivni efekat AC genotipa od oboljevanja od psorijaznog artritisa. Prisustvo AA genotipa moglo bi da uveća šanse za oboljevanje od psorijaze (OR=1,404, 95% IP 0,878–2,243) i psorijaznog artritisa (OR=2,734 95% IP 0,914–8,183), ali razlika nije dostigla nivo statističke značajnosti. Nosioci A alela mogli bi da imaju veću šansu da obole od psorijaze (OR=2,304, 95% IP 0,490–10,82) ali razlika nije dostigla nivo statističke značajnosti.

Tabela 16. Statistička analiza distribucija A i C alela, genotipova i nosioca alela rs3212227 polimorfizma gena za IL-12B između pacijenata sa psorijazom, psorijaznim artritisom i kontrola.

		Psorijaza / kontrole		Psorijazni artritis / kontrole	
<i>IL12B</i> rs3212227		p	OR (95% IP)	p	OR (95% IP)
Aleli	A	0,114	1,397 (0,922–2,119)	0,115	2,111 (0,817–5,450)
	C		0,716 (0,472–1,085)		0,474 (0,184–1,223)
Genotipovi	AA	0,155	1,404 (0,878–2,243)	0,062	2,734 (0,914–8,183)
	AC	0,290	0,772 (0,478–1,247)	0,049	0,308 (0,090–1,057)
	CC	0,349 [†]	0,434 (0,092–2,039)	1,000 [†]	1,111 (0,135–9,133)
Nosioci	A	0,349 [†]	2,304 (0,490–10,82)	1,000 [†]	0,900 (0,110–7,398)
	C	0,155	0,712 (0,446–1,139)	0,062	0,366 (0,122–1,095)

OR odnos šansi, IP interval poverenja, [†]Fišerov test tačne verovatnoće.

Dalje, ispitivano je da li se distribucije ispitivanih alela, genotipova i nosioca A i C alela u okviru rs3212227 polimorfizma gena za IL-12B razlikuju između pacijenata sa ranim i kasnim početkom bolesti u odnosu na kontrole i međusobno. Kao što je prikazano u tabeli 17, nema statistički značajne razlike između poređenih grupa. A alel je češći kod pacijenata sa psorijazom tip 1 (OR=1,516, 95% IP 0,857–2,681) i tip 2 (OR=1,303, 95% IP 0,771–2,200) nego kod kontrola. Prisustvo AA genotipa uvećava šanse za nastanak psorijaze tip 1 (OR=1,558, 95% IP 0,824–2,943) i psorijaze tip 2 (OR=1,282, 95% IP 0,711–2,312). U skladu sa prethodno iznesenim, nosioci A alela mogli bi da imaju veću šansu da dobiju psorijazu tip 2 (OR=2,196, 95% IP 0,273–17,66). Međutim, nijedna od navedenih razlika nije dostigla nivo statističke značajnosti.

Tabela 17. Statistička analiza distribucija A i C alela, genotipova i nosioca alela rs3212227 polimorfizma gena za IL-12B između pacijenata sa psorijazom tip 1 i 2 i kontrola kao i međusobno.

<i>IL12B</i> (rs3212227)		PV tip 1 / kontrole		PV tip 2 / kontrole		PV tip 2/PV tip 1	
		p	OR (95% IP)	p	OR (95% IP)	p	OR (95% IP)
Aleli	A	0,150	1,516 (0,86–2,68)	0,322	1,303 (0,77–2,20)	0,671	0,859 (0,42–1,74)
	C		0,660 (0,37–1,17)		0,770 (0,45–1,30)		1,164 (0,57–2,36)
Genotipovi	AA	0,170	1,558 (0,82–2,94)	0,410	1,282 (0,71–2,31)	0,624	0,823 (0,38–1,81)
	AC	0,261	0,689 (0,36–1,32)	0,597	0,851 (0,47–1,55)	0,610	1,234 (0,55–2,76)
	CC	0,694 [†]	0,455 (0,06–3,66)	0,480 [†]	0,415 (0,05–3,33)	1,000 [†]	0,910 (0,06–14,9)
Nosioci	A	0,694 [†]	2,196 (0,27–17,7)	0,480 [†]	2,412 (0,30–19,4)	1,000 [†]	1,098 (0,07–17,9)
	C	0,170	0,642 (0,34–1,21)	0,410	0,780 (0,43–1,41)	0,624	1,215 (0,55–2,67)

OR odnos šansi, IP interval poverenja, [†]Fišerov test tačne verovatnoće.

U cilju utvrđivanja povezanosti pojedinih alela rs3212227 polimorfizma gena za IL-12B i težine kliničke manifestacije psorijaze analizirane su frekvencije nosioca A i C alela kod pacijenata grupisanih na osnovu vrednosti PASI skora (Tabela 18).

Tabela 18. Nosioci A i C alela rs3212227 polimorfizma gena za IL-12B grupisani na osnovu vrednosti PASI skora

<i>IL12B</i> rs3212227	Nizak PASI	Srednji PASI	Visok PASI	p
Nosioci				
A (AA i AC)	11 (91,7%)	63 (100,0%)	54 (98,2%)	0,099
C (CC i CA)	5 (41,7%)	16 (25,0%)	13 (23,6%)	0,431

Kao što je prikazano u tabeli 18, nema statistički značajne razlike u broju nosioca A i C alela između grupa sa niskim, srednjim i visokim vrednostima PASI skora.

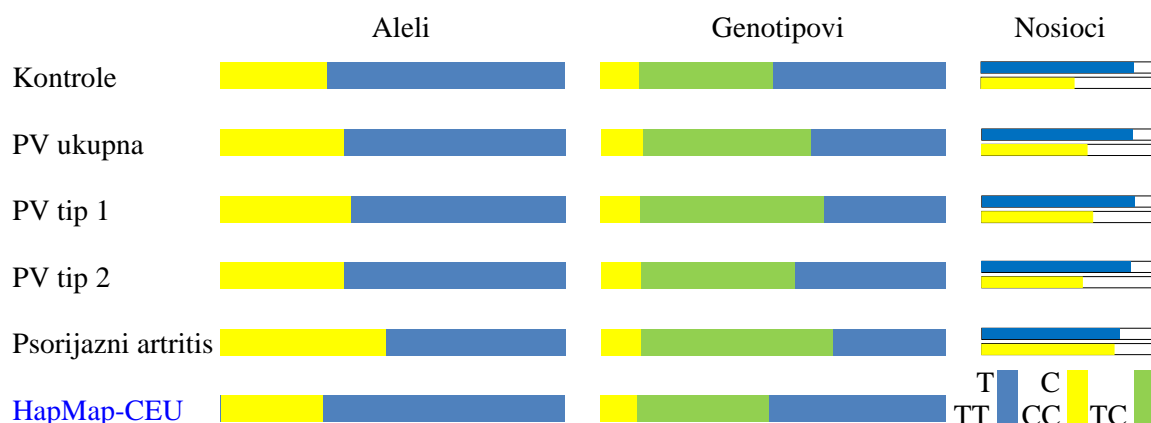
4.4. Ispitivanje polimorfizma gena za IL-23R (rs2201841) kod kontrola i pacijenata sa psorijazom

Ispitivanje rs2201841 polimorfizma u 7. intronu gena za IL-23R vršeno je TaqMan PCR metodom pomoću komercijalnih oligonukleotida. Rezultati distribucije alela i genotipova prikazani su u tabeli 19 i na prilogu 4. U cilju poređenja sa rezultatima ovog istraživanja na prilogu 4 je prikazana distribucija alela i genotipova [HapMap-CEU](#) referentne populacije. Pored toga, u tabeli 19 i na prilogu 4 prikazana je i distribucija nosioca T i C alela kod ispitanika, pri čemu su nosioci C osobe sa CC i CT genotipovima, a nosioci T su osobe sa TT i TC genotipovima. Pacijenti sa psorijazom, (Tabela 19 i Prilog 4) su prikazani kao jedna grupa (ukupna psorijaza) i podjeljeni u dve podgrupe (tip 1 i tip 2) u odnosu na starost u trenutku postavljanja dijagnoze. Iz grupe pacijenata sa psorijazom je posebno izdvojena i analizirana podgrupa pacijenata koji su imali i psorijazni artritis (Tabela 19). Uzorak DNK poreklom od jednog pacijenta je isključen iz analize jer nije bilo moguće da se sa sigurnošću odredi genotip.

Tabela 19. Aleli i genotipovi rs2201841 polimorfizma gena za IL-23R kod kontrola i pacijenata.

		Kontrole		Psoriasis vulgaris				Psorijazni artritis			
				Ukupna		Tip 1		Tip 2			
		n	f	n	f	n	f	n	f		
<i>IL23R</i> rs2201841											
Aleli	T	403	0,692	163	0,632	77	0,621	86	0,642	27	0,519
	C	179	0,308	95	0,368	47	0,379	48	0,358	25	0,481
Genotipovi	TT	145	0,498	50	0,388	22	0,355	28	0,418	6	0,231
	TC	113	0,388	63	0,488	33	0,532	30	0,448	15	0,577
	CC	33	0,113	16	0,124	7	0,113	9	0,134	5	0,192
Nosioci	T	258	0,887	113	0,876	55	0,887	58	0,866	21	0,808
	C	146	0,502	79	0,612	40	0,645	39	0,582	20	0,769

Nosioci T su osobe sa TT i TC genotipovima, nosioci C su osobe sa CC i CT genotipovima.



Prilog 4. Grafički prikaz distribucija alela, genotipova i nosioca alela za rs2201841 polimorfizma gena za IL-23R.

U cilju testiranja da li distribucija genotipova odgovara distribuciji alela koji su određivani za ispitanike u ovoj studiji, izračunato je da li se dobijeni rezultati učestalosti genotipova nalaze u Hardy-Weinberg ravnoteži (Tabela 20).

Tabela 20. Testiranje distribucije genotipova rs2201841 polimorfizma gena za IL-23R u odnosu na Hardy-Weinberg ravnotežu.

<i>IL23R</i> rs2201841		Kontrola	Psorijaza	Ukupno
Genotipovi	TT	145	50	195
	TC	113	63	176
	CC	33	16	49
Total		291	129	420
HWE		$X^2 = 2,27$	$X^2 = 0,32$	$X^2 = 0,92$

*Hardy-Weinberg ekvilibrijum, nivo značajnosti; $p > 0,05$.

Dobijeni rezultati pokazuju da je distribucija genotipova rs2201841 polimorfizma gena za IL-23R bila u Hardy-Weinberg ravnoteži, $p > 0,05$ (Tabela 20).

Rezultati frekvencije alela za populaciju zdravih osoba iz Srbije poređeni su sa podacima frekvencija alela rs2201841 polimorfizma gena za IL-23R iz literature da bi se utvrdilo da li postoje značajne razlike između frekvencija T i C alela u populaciji Srbije i različitih drugih kontrolnih populacija za koje postoje objavljeni podaci. Ovi rezultati su prikazani u tabeli 21.

Tabela 21. rs2201841 polimorfizam gena za IL-23R kod zdravih osoba u različitim populacijama.

Referenca	Populacija	Broj	Metod	T alel (%)	C alel (%)	p
(Popadic i sar., 2014)	Srbija	291	TaqMan	69,2	30,8	NP
(Yamazaki i sar., 2007)	Japan	439	TaqMan	29,0	71,0	0,001
(Rahman i sar., 2008)	Kanada					
	Toronto	122	Mas. spekt.	56,7	43,3	0,001
	Njufaundlend	219	Mas. spekt.	69,4	30,6	1,000
	Alberta	401	Mas. spekt.	66,4	33,6	0,273
(Lappalainen i sar., 2008)	Finska	292	Mas. spekt.	71,8	28,8	0,424
(Huber i sar., 2008)	SAD	476	PCR-RFLP	64,7	35,3	0,068
(Kim i sar., 2009)	Južna Koreja	991	TaqMan	27,0	73,0	0,001
(Kanaan i sar., 2012)	SAD	478	TaqMan	71,7	28,3	0,315
(Szabo i sar., 2013)	Mađarska	182	PCR-RFLP	69,5	30,5	0,920

NP, nije primenjivo.

Kao što je prikazano u tabeli 21, frekvencije T i C alela rs2201841 polimorfizma gena za IL-23R u zdravoj populaciji Srbije ne razlikuju se statistički značajno u odnosu na populacije Mađarske, SAD, Finske, kao ni populacije Njufaundlenda i Alberte iz Kanade. Statistički visoko značajna razlika u frekvencijama T i C alela ustanovljena je između zdrave populacije Srbije i populacija Japana, Toronta (Kanada), i Južne Koreje.

U tabeli 22 su prikazani rezultati poređenja distribucije T i C alela, genotipova i nosioca alela rs2201841 polimorfizma gena za IL-23R kod pacijenata sa psorijazom, psorijaznim artritismom i kontrola. Ustanovljena je statistički visoko značajna razlika ($p=0,01$), u frekvencijama T i C alela između podgrupe pacijenata sa psorijaznim artritismom i kontrola pri čemu je T alel protektivan (OR= 0,480, 95% IP 0,271–0,850) dok C alel povećava rizik od oboljevanja (OR=2,085, 95% IP 1,177–3,693). Statistički značajno više ($p=0,036$) je nosioca C alela (osobe sa CC i CT genotipovima) u grupi pacijenata sa psorijazom nego među kontrolama. Kod pacijenata sa psorijazom razlika u frekvenciji C alela u odnosu na kontrole nije dostigla nivo statističke značajnosti. Ustanovljena je i statistički visoko značajna razlika, $p=0,009$, (OR=0,302, 95% IP 0,118–0,774) u distribuciji TT genotipa između podgrupe pacijenata sa psorijaznim artritismom i zdravih kontrola, kao i statistički značajna razlika u distribuciji ovog genotipa kod pacijenata sa psorijazom u odnosu na kontrole, $p=0,036$ (OR=0,637, 95% IP 0,418–0,972). Statistički visoko značajna razlika ($p=0,009$) među nosiocima C alela (osobe sa

CC i TC genotipovima) je između podgrupe pacijenata sa psorijaznim artritisom i kontrola (OR=3,331, 95% IP 1,292–8,704), tabela 22.

Tabela 22. Statistička analiza distribucije T i C alela, genotipova i nosioca alela rs2201841 polimorfizma gena za IL-23R između pacijenata sa psorijazom, psorijaznim artritisom i kontrola.

<i>IL23R</i> rs2201841		Psorijaza / kontrole		Psorijazni artritis / kontrole	
		p	OR (95% IP)	p	OR (95% IP)
Aleli	T	0,087	0,762 (0,560–1,037)	0,010	0,480 (0,271–0,850)
	C		1,312 (0,964–1,786)		2,085 (1,177–3,693)
Genotipovi	TT	0,036	0,637 (0,418–0,972)	0,009	0,302 (0,118–0,774)
	TC	0,055	1,504 (0,990–2,284)	0,060	2,148 (0,953–4,843)
	CC	0,752†	1,107 (0,586–2,093)	0,339†	1,862 (0,658–5,269)
Nosioči	T	0,752	0,903 (0,478–1,708)	0,339†	0,537 (0,190–1,521)
	C	0,036	1,569 (1,029–2,394)	0,009	3,311 (1,292–8,704)

OR odnos šansi, IP interval poverenja, †Fišerov test tačne verovatnoće.

Dalje, ispitano je da li se distribucije T i C alela, genotipova i nosioca alela rs2201841 polimorfizma gena za IL-23R razlikuju između pacijenata sa ranim i kasnim početkom bolesti u odnosu na kontrole i međusobno. Kao što je prikazano u tabeli 23, nosioca TT genotipa je statistički značajno manje ($p=0,04$) među pacijentima sa psorijazom tip 1 nego među zdravim kontrolama (OR= 0,554, 95% IP 0,31–0,98), a nosioca CT genotipa značajno više, $p=0,037$, (OR=1,723, 95% IP 1,03–3,11) među pacijentima sa tipom 1 psorijaze nego među zdravim kontrolama. Shodno tome, nosioci C alela imaju značajno veći rizik da obole od psorijaze tip 1, $p=0,040$, (OR=1,806, 95% IP 1,02–3,19). Razlike u učestalosti T i C alela, TT, CT i CC genotipova, kao i razlike u frekvenciji nosioca T i C alela rs2201841 polimorfizma nisu dostigle nivo statističke značajnosti kada su poređene grupe pacijenata sa psorijazom tip 2 i kontrole, kao ni kada su međusobno poređene grupe pacijenata sa ranim i kasnim početkom bolesti (Tabela 23).

Tabela 23. Statistička analiza distribucija T i C alela, genotipova i nosioca alela rs2201841 polimorfizma gena za IL-23R između pacijenata sa psorijazom tip 1 i 2 i kontrola kao i međusobno.

		PV tip 1 / kontrole		PV tip 2 / kontrole		PV tip2 / PV tip 1	
<i>IL23R</i> rs2201841		p	OR (95% IP)	p	OR (95% IP)	p	OR (95% IP)
Aleli	T	0,121	0,728 (0,49–1,09)	0,256	0,796 (0,54–1,18)	0,729	1,094 (0,69–1,81)
	C		1,374 (0,92–2,06)		1,257 (0,85–1,87)		0,914 (0,55–1,52)
Genotipovi	TT	0,040	0,554 (0,31–0,98)	0,235	0,723 (0,42–1,24)	0,462	1,305 (0,64–2,66)
	TC	0,037	1,723 (1,03–3,11)	0,371	1,277 (0,75–2,18)	0,337	0,713 (0,36–1,43)
	CC	1,000	0,995 (0,42–2,37)	0,632	1,213 (0,55–2,67)	0,708	1,219 (0,43–3,50)
Nosioći	T	1,000	1,005 (0,42–2,39)	0,632	0,824 (0,37–1,82)	0,708	0,820 (0,29–2,35)
	C	0,040	1,806 (1,02–3,19)	0,235	1,383 (0,81–2,37)	0,462	0,766 (0,38–1,56)

OR odnos šansi, IP interval poverenja.

U cilju utvrđivanja povezanosti T i C alela rs2201841 polimorfizma gena za IL-23R i težine kliničke manifestacije psorijaze analizirana je distribucija nosioca T i C alela kod pacijenata sa psorijazom grupisanih na osnovu vrednosti PASI skora (Tabela 24).

Tabela 24. Nosioći alela rs2201841 polimorfizma gena za IL-23R grupisani na osnovu vrednosti PASI skora.

<i>IL23R</i> rs2201841	Nizak PASI	Srednji PASI	Visok PASI	p
Nosioći				
T (TT i TC)	10 (83,3%)	58 (93,5%)	45 (81,8%)	0,888
C (CC i CT)	7 (58,3%)	37 (59,7%)	35 (63,6%)	0,144

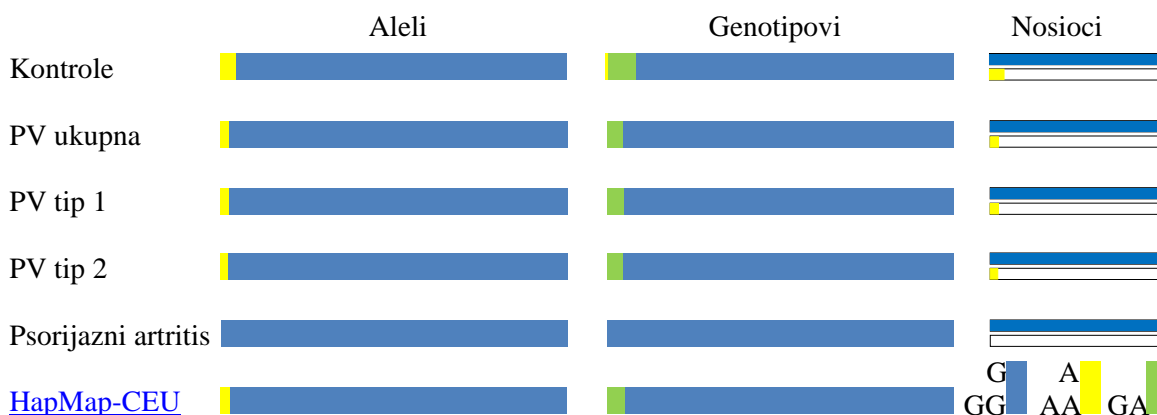
Kao što je prikazano u tabeli 24, nema statistički značajne razlike u frekvencijama nosioca T i C alela između grupa pacijenata sa niskim, srednjim i visokim vrednostima PASI skora.

4.5. Ispitivanje polimorfizma gena za IL-17F (rs11465553) kod kontrola i pacijenata sa psorijazom

TaqMan PCR metoda i komercijalni oligonukleotidi korišćeni su i za ispitivanje rs11465553 polimorfizma u trećem egzonu gena za IL-17F. Rezultati distribucije alela i genotipova rs11465553 polimorfizma prikazani su u tabeli 25 i na prilogu 5. Pored toga, na prilogu 5 prikazana je distribucija alela i genotipova [HapMap-CEU](#) referentne populacije u cilju poređenja sa rezultatima ove teze. Pacijenti sa psorijazom (Tabela 25 i Prilog 5) su prikazani kao jedna grupa (ukupna psorijaza) i podeljeni u dve podgrupe (tip 1 i tip 2) u odnosu na starost u trenutku postavljanja dijagnoze. Iz grupe pacijenata sa psorijazom je posebno izdvojena i analizirana podgrupa pacijenata koji su imali i psorijazni artritis.

Tabela 25. Aleli i genotipovi rs11465553 polimorfizma gena za IL-17F kod kontrola i pacijenata.

	Kontrole		Psoriasis vulgaris				Psorijazni artritis	
	n	f	Ukupna		Tip 1		Tip 2	
	n	f	n	f	n	f	n	f
<i>IL17F</i> rs11465553								
Aleli	G	582 0,954	254 0,977	121 0,976	133 0,978	52 1,000		
	A	28 0,046	6 0,023	3 0,024	3 0,022	0 0,000		
Genotipovi	GG	279 0,915	124 0,954	59 0,952	65 0,956	26 1,000		
	GA	24 0,079	6 0,046	3 0,048	3 0,044	0 0,000		
	AA	2 0,007	0 0,000	0 0,000	0 0,000	0 0,000		
Nosioci	G	303 0,993	130 1,000	62 1,000	68 1,000	26 1,000		
	A	26 0,085	6 0,046	3 0,048	3 0,044	0 0,000		



Prilog 5. Grafički prikaz distribucija alela, genotipova i nosioca alela rs11465553 polimorfizma gena za IL-17F.

U cilju testiranja da li distribucija genotipova odgovara distribuciji G i A alela koji su određivani za ispitanike u ovoj studiji, izračunato je da li se dobijeni rezultati učestalosti genotipova nalaze u Hardy-Weinberg ravnoteži (Tabela 26).

Tabela 26. Testiranje distribucije genotipova rs11465553 polimorfizma gena za IL-17F u odnosu na Hardy-Weinberg ravnotežu.

IL17F rs11465553		Zdrave kontrole	Psorijaza	Ukupno
Genotipovi	GG	279	124	403
	GA	24	6	30
	AA	2	0	2
Ukupno		305	130	435
HWE*		$X^2=3.15$	$X^2=0.07$	$X^2=2.91$

*Hardy-Weinberg ekvilibrijum, nivo značajnosti, $p>0,05$.

Dobijeni rezultati pokazuju da je distribucija genotipova rs11465553 polimorfizma gena za IL-117F bila u Hardy-Weinberg ravnoteži, $p>0,05$ (Tabela 26).

Rezultati raspodele alela u populaciji zdravih osoba iz Srbije upoređeni su sa objavljenim podacima za druge populacione grupe da bi se utvrdilo da li postoje razlike između frekvencija G i A alela rs11465553 polimorfizma gena za IL-17F između kontrola iz Srbije i zdravih osoba iz drugih država. Ovi rezultati su prikazani u tabeli 27.

Tabela 27. rs11465553 polimorfizam gena za IL-17F kod zdravih osoba u različitim populacijama.

Referenca	Populacija	Broj	Metod	G alel (%)	A alel (%)	p
(Popadic S*)	Srbija	305	TaqMan	95.4	4.6	NP
(Jang i sar., 2008)	Južna Koreja	114	dHPLC	100	0	NP
(Bazzi i sar., 2011)	Saudijska Arabija	101	TaqMan	99.5	0.5	0,006

NP, nije primenjivo; *, rezultati ove teze.

Kao što se vidi u tabeli 27, postoji statistički visoko značajna razlika u frekvencijama G i A alela između zdrave populacije Srbije i zdrave populacije Saudijske Arabije, dok u populaciji Južne Koreje nije detektovana nijedna osoba sa redim A alelom.

Mala frekvencija A alela kako u populaciji pacijenata tako i u populaciji kontrola, (Tabela 27), nije omogućila donošenje definitivnih zaključaka o značaju ovog lokusa za nastanak psorijaze i psorijaznog artritisa (Tabela 28). Ipak, poređenjem frekvencija alela i

genotipova rs11465553 polimorfizma gena za IL-17F stiče se utisak da bi G alel mogao da predstavlja faktor rizika za nastanak psorijaze (OR=2,037, 95% IP 0,833–4,979). Prisustvo GG genotipa moglo bi da uveća šanse za nastanak psorijaze (OR=1,926, 95% IP 0,773–4,797). Nasuprot tome, A alel bi kod nosioca mogao da ima izvesnu protektivnu ulogu u psorijazi (OR=0,519, 95% IP 0,209–1,293), tabela 28.

Tabela 28. Statistička analiza distribucije G i A alela, genotipova i nosioca alela za rs11465553 polimorfizam gena za IL-17F između pacijenata sa psorijazom, psorijaznim artritismom i kontrola.

<i>IL17F</i> rs11465553	Psorijaza / kontrole			Psorijazni artritis / kontrole	
		p	OR (95% IP)	p	OR (95% IP)
Aleli	G	0,112	2,037 (0,833–4,979)	0,157 [†]	NP
	A		0,491 (0,201–1,201)		NP
Genotipovi	GG	0,153	1,926 (0,773–4,797)	0,151 [†]	NP
	GA	0,221	0,567 (0,226–1,421)	0,237 [†]	NP
	AA	0,580 [†]	NP	1,000 [†]	NP
Nosioći	G	0,580 [†]	NP	1,000 [†]	NP
	A	0,153	0,519 (0,209–1,293)	0,151 [†]	NP

OR odnos šansi, IP interval poverenja, [†]Fišerov test tačne verovatnoće, NP, nije primenjivo.

Dalje, ispitivano je da li se distribucije G i A alela, genotipova i nosioca alela rs11465553 polimorfizma gena za IL-17F razlikuju između pacijenata sa ranim i kasnim početkom bolesti u odnosu na kontrole i međusobno. Kao što je prikazano u tabeli 29, nema statistički značajne razlike između poređenih grupa. G alel bi mogao povećavati rizik za nastanak psorijaze tip 2 (OR=2,133, 95% CI 0,639–7,120) i psorijaze tip 1 (OR=1,940, 95% CI 0,581–6,486), ali razlike ne dostižu nivo statističke značajnosti. Prisustvo GG genotipa moglo bi da uveća šanse za nastanak psorijaze tip 2 (OR=2,019, 95% CI 0,593–6,875) i psorijaze tip 1 (OR=1,833, 0,537–6,256), ali razlike nisu dostigle nivo statističke značajnosti. Saglasno prethodnim rezultatima, nosioći A alela bi mogli da imaju manju šansu da dobiju psorijazu tip 1 (OR=0,546, 95% CI 0,160–1,862) i tip 2 (OR=0,495, 95% CI 0,146–1,686), ali razlika nije statistički značajna.

Tabela 29. Statistička analiza distribucije G i A alela, genotipova i nosioca alela rs11465553 polimorfizma gena za IL-17F između pacijenata sa psorijazom tip 1 i 2 i kontrola kao i međusobno.

<i>IL17F</i> rs11465553	PV tip 1 / kontrole		PV tip 2 / kontrole		PV tip2 / PV tip 1	
	p	OR (95% IP)	p	OR (95% IP)	p	OR (95% IP)
Aleli	G	1,940 (0,58–6,47)	0,207	2,133 (0,64–7,12)	1,000†	1,099 (0,22–5,55)
	A	0,515 (0,15–1,72)		0,469 (0,14–1,57)		0,910 (0,18–4,59)
Genotipovi	GG	0,443 1,833 (0,57–6,26)	0,252	2,019 (0,59–6,88)	1,000†	1,102 (0,21–5,67)
	GA	0,449 0,595 (0,17–2,04)	0,441	0,540 (0,16–1,85)	1,000†	0,908 (0,18–4,67)
	AA	1,000† NP	1,000†	NP	1,000†	NP
Nosioci	G	1,000† NP	1,000†	NP	1,000†	NP
	A	0,443 0,546 (0,16–1,86)	0,252	0,495 (0,15–1,67)	1,000†	0,908 (0,18–4,67)

OR odnos šansi, IP interval poverenja, †Fišerov test tačne verovatnoće, NP, nije primenjivo.

U cilju utvrđivanja povezanosti G i A alela rs11465553 polimorfizma gena za IL-17F i težine kliničke manifestacije psorijaze analizirane su frekvencije nosioca G i A alela kod pacijenata grupisanih na osnovu vrednosti PASI skora (Tabela 30).

Tabela 30. Nosioci alela rs11465553 polimorfizma gena za IL-17F grupisani na osnovu vrednosti PASI skora.

<i>IL17F</i> rs11465553	Nizak PASI	Srednji PASI	Visok PASI	p
Nosioci				
G (GG i GA)	12 (100,0%)	63 (100,0%)	55 (100,0%)	1,000
A (AA i AG)	2 (16,7%)	3 (4,8%)	1 (1,8%)	0,086

Kao što je prikazano u tabeli 30, nema statistički značajne razlike između frekvencija nosioca G i A alela u grupama pacijenata sa niskim, srednjim i visokim vrednostima PASI skora.

5. DISKUSIJA

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitana je učestalost polimorfizama pojedinačnih nukleotida u genima za proinflamatorne molekule: TNF, IFN-gama, IL-12B (p40), IL-23R i IL-17F u populaciji zdravih ljudi u Srbiji i grupi pacijenata sa psoriasis vulgaris. Iako je zahvaljujući izuzetnom napretku savremenih tehnologija i ispitivanjem polimorfizama gena u celokupnom genomu otkriveno više gena čiji su pojedini aleli udruženi sa osetljivošću za nastanak psorijaze ili pak psorijaznog artritisa, kontradiktorni su podaci o polimorfizmima gena koji kodiraju proteine uključene u funkcionisanje subpopulacija T_H1 i T_H17 ćelija, kao i nekih proinflamatornih medijatora važnih u patogenezi psorijaze.

S obzirom da se ovaj tip istraživanja do sada nije sproveo u Srbiji, od značaja je bilo ispitati učestalost alela gena koji kodiraju inflamatorne molekule u populaciji zdravih osoba, dobrovoljnih davalaca krvi, i učestalost alela pomenutih gena kod pacijenata sa psorijazom u Srbiji, kao i utvrditi eventualne razlike u distribuciji alela ovih gena između ispitivanih populacija u Srbiji i njihove distribucije u drugim populacijama.

Psorijaza je dugo smatrana bolešću koja nastaje isključivo usled poremećaja na nivou keratinocita. Uloga T-limfocita u patogenezi psorijaze prvi put je sugerisana 1983. godine (Bos i sar., 1983) nalazom T-ćelija u lokalnim promenama na koži i zapažanjem da je erupcija psorijatičnih lezija u koži praćena influksom dendritskih ćelija i T-limfocita u epiderm (Baker i sar., 1984), dok rezoluciji promena tokom fototerapije prethodi deplecija T-ćelija u epidermu i dermu (Baker i sar., 1985). Danas se zna da psorijaza nastaje usled poremećaja ravnoteže između urođenog i stečenog imunskog odgovora (Kikly i sar., 2006; Li i sar., 2007; van Beelen i sar., 2007; Zaba i sar., 2007; Guttman-Yassky i sar., 2008; Lowes i sar., 2008; Kupetsky i sar., 2013). Nakon početnog stimulansa koji najčešće predstavlja neki od faktora spoljašnje sredine, T_H1 i T_H17 ćelije dolaze u kontakt sa dermalnim dendritskim ćelijama, makrofagima, mast ćelijama i neutrofilima i zajedno sa ovim ćelijama dovode do pokretanja i održavanja inflamacije i povećanja sekrecije velikog broja proinflamatornih i imunomodulatornih citokina (IFN-gama, TNF, IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-17, IL-19, IL-23) što dovodi do zapaljenja i izražene hiperproliferacije keratinocita sa vidljivim karakterističnim promenama na koži (Johnson-Huang i sar., 2012; Perera i sar., 2012; Kupetsky i sar., 2013).

Na osnovu uzrasta pacijenta u trenutku početka bolesti, psorijaza može da se podeli na dva tipa, tip 1 i tip 2 psorijaze. Tip 1 psorijaze javlja se kod mlađih pacijenata,

pre navršene tridesete godine života, dok se tip 2 psorijaze javlja u populaciji starijoj od trideset godina (Henseler i Christophers, 1985; Gudjonsson i sar., 2002).

Svi pacijenti uključeni u ovo istraživanje nalazili su se na bolničkom lečenju u Klinici za dermatovenerologiju Kliničkog centra Srbije tokom 2012 i 2013. godine. Od ukupno 130, pacijenta 93 pacijenta (71,5%) bilo je muškog a 37 pacijenata (28,5%) bilo je ženskog pola. Iako od psorijaze podjednako obolevaju pripadnici oba pola, ovakva distribucija po polu mogla bi da se objasni činjenicom da pacijenti muškog pola koji imaju psorijazu lakše prihvataju lečenje u bolničkim uslovima od pacijenata ženskog pola. Kod 62 pacijenta (47,7%) dijagnostikovano je tip 1 psoriasis vulgaris dok je kod 68 pacijenata (52,3%) dijagnostikovano tip 2 ovog oboljenja što približno odgovara podacima iz drugih studija (Parisi i sar., 2013).

Težina kliničke slike kod pacijenta sa psoriasis vulgaris određuje se, odnosno gradira, takozvanim PASI skorom (Fredriksson i Pettersson, 1978; Schmitt i Wozel, 2005; Naldi, 2010). Kod ispitivanih pacijenata, niske vrednosti PASI skora (od 1-9) ustanovljene su kod 12 osoba (9,2%), 63 osobe (48,5%) imale su PASI skor od 10-20, dok je kod 55 osoba (42,3%) ustanovljena visoka vrednost PASI skora (iznad 20), u opsegu od 21-60. Veliki broj pacijenata sa višim vrednostima PASI skora mogao bi da se objasni činjenicom da se radilo o bolnički lečenim pacijentima, odnosno činjenicom da na bolničko lečenje dolaze pacijenti sa težom kliničkom slikom. Istraživanjem su obuhvaćeni pacijenti hospitalno lečeni na Klinici za Dermatovenerologiju Kliničkog centra Srbije u periodu od 2012-2013. godine, a ne svi oboleli od psorijaze koji su se javljali na Kliniku za Dermatovenerologiju zbog rutinskih, ambulantnih kontrola.

Kontrolnu grupu u ovom istraživanju činili su dobrovoljni davaoci krvi.

Broj pacijenata, kao i broj zdravih osoba, odnosno kontrola, bio je dovoljan kako bi se postigla Hardy-Weinberg ravnoteža što omogućava adekvatnu analizu i interpretaciju dobijenih rezultata.

Psorijazni artritis je zapaljenjsko oboljenje zglobova koje je udruženo sa psorijazom, najčešće uz odsustvo reumatoidnog faktora. Težina kliničke slike kod psorijaznog artritisa može da bude blaga do teške, erozivne artropatije (Gladman i Brockbank, 2000). Kod 20% ispitanih pacijenata sa psorijazom dijagnostikovano je i psorijazni artritis što je u skladu sa podacima iz literature da je kod 5-30% pacijenata sa psorijazom bolest udružena sa psorijaznim artritismom (Gladman i Brockbank, 2000; Balding i sar., 2003; Zhu i sar., 2013).

Psorijaza i psorijazni artritis imaju veliku sličnost u citokinskom profilu, što nameće pretpostavku da ove dve bolesti međusobno dele genetske i etiopatogenetske činioce. Tako na primer, postoje podaci koji ukazuju da su određeni polimorfizmi pojedinačnih nukleotida nekih gena udruženi sa sklonošću ka nastanku psorijaze i psorijaznog artritisa (Filer i sar., 2008; Lowes i sar., 2014). Centralni značaj u patogenezi psorijaze i psorijaznog artritisa imaju pomoćničke T_H1 i T_H17 ćelije (Perera i sar., 2012). U nastanku i održavanju inflamacije u obe bolesti učestvuju brojni citokini kao što su proinflamatorni citokin TNF, citokini T_H1 osovine IL-12 i IFN-gama, kao i citokini T_H17 osovine, IL-23 i IL-17 (Perera i sar., 2012). Produkcija citokina može da zavisi od polimorfizma gena koji ih kodiraju. Ovo može da utiče na sklonost ka razvoju neke hronične inflamatorne bolesti kao što je psorijaza odnosno psorijazni artritis, zatim na težinu kliničke slike kao i na prognozu bolesti.

Brojni podaci ukazuju da je TNF jedan od veoma važnih citokina u patogenezi psorijaze, a jedan od ključnih dokaza je uspešna terapija psorijaze anti-TNF antitelima i drugim biološkim lekovima koji blokiraju funkcionisanje ovog citokina (Zhu i sar., 2013).

Gen za TNF lociran je u HLA regionu na hromozomu 6p21.3 (Kane i FitzGerald, 2004). HLA, a posebno region prve klase je region za koji je pokazano da je udružen sa psorijazom (Gudjonsson i sar., 2002; Veal i sar., 2002). Daljim istraživanjima, ustanovljeno je da su polimorfizmi pojedinačnih nukleotida nekih gena u ovom regionu, a naročito pojedini aleli HLA-C molekula, najsnažnije udruženi sa psorijazom i psorijaznim artritismom tako da je ovaj lokus dobio naziv PSORS1 (*engl.* Psoriasis susceptibility locus 1). Između ispitivanih polimorfizama pokazano je da je najznačajniji među njima HLA Cw*06:02 pa je naziv PSORS1 sužen na ovaj deo lokusa hromozoma 6p21.3 (Huffmeier i sar., 2009). S obzirom na malu udaljenost između HLA-C i TNF lokusa, velika je verovatnoća da se aleli ovih gena nasleđuju delimično kao vezani (*engl.* linkage disequilibrium, LD) (Liu i sar., 2008). Međutim, pretragom Medline baze podataka nije pronađen rad kojim bi se moglo sa sigurnošću tvrditi koliko je snažna vezanost nasleđivanja TNF alela i HLA CW*06:02. Najbliži ispitivani lokus za koji su nađeni podaci je lokus CCHCR1 gena (*engl.* Coiled-Coil Alpha-Helical Rod Protein 1). CCHCR1 gen se nalazi 100 Kb udaljen od HLA-C lokusa pa je usled snažnog LD sa HLA CW*06:02, CCHCR1*WWCC alel smatran kandidatom za PSORS1 (Asumalahti i sar., 2002). Reich i sar. (2007) su pokazali da je D' vrednost za TNF -308 poziciju i CCHCR1*WWCC 0,55 što ukazuje na umereni LD efekat ova dva lokusa, pa se na

osnovu tih podataka može ekstrapolirati i umereni LD između pozicije -308 u promotoru TNF i HLA CW*06:02 (Reich i sar., 2007).

Do sada su u većem broju istraživanja ispitane frekvencije G i A alela na poziciji -308 u okviru gena za TNF u populacijama zdravih osoba većeg broja geografski udaljenih država. Jedan od ciljeva ovog istraživanja je bio da se uporede dobijene frekvencije G i A alela rs1800629 polimorfizma gena za TNF u populaciji zdravih osoba iz Srbije sa frekvencijama ovih alela u kontrolnim populacijama drugih država za koje postoje podaci u literaturi i utvrdi da li postoje značajne razlike između populacije zdravih osoba iz Srbije i drugih, geografski udaljenih i etnički različitih populacija. Frekvencije G i A alela u zdravoj populaciji Srbije nisu bile statistički značajno različite u odnosu na populacije Velike Britanije (Craven i sar., 2001), Nemačke (Hohler i sar., 2002; Reich i sar., 2002), Italije (Poli i sar., 2002), Estonije (Mossner i sar., 2005), Poljske (Baran i sar., 2006), Hrvatske (Boraska i sar., 2008), i Španije (Corchado i sar., 2013). Statistički visoko značajna razlika ustanovljena je između zdrave populacije Srbije i populacija Japana (Hamamoto i sar., 2000), Južne Koreje (Han i sar., 2012) i Egipta (Settin i sar., 2009). Poređenjem rezultata iz ove disertacije i rezultata dve studije iz Indije dobijaju se suprotni zaključci. Prva studija, izvedena na populaciji države Tamil Nadu u jugoistočnoj Indiji ukazuje da nema statistički značajne razlike u odnosu na frekvencije alela u populaciji Srbije (Sandhya i sar., 2013), dok rezultati druge studije sprovedene u državi Utar Pradeš na severu Indije ukazuju da postoji statistički visoko značajna razlika u frekvencijama alela u odnosu na frekvencije G i A alela u populaciji Srbije (Shukla i sar., 2012). S obzirom na slične frekvencije G i A alela rs1800629 polimorfizma gena za TNF u populacijama južne i severne Indije može se zaključiti da je dobijena diskrepancija prevashodno rezultat razlike u broju ispitivanih osoba u kontrolnim grupama, a manje razlike u frekvencijama ispitivanih alela. Naime, u studiji sprovedenoj na jugu Indije analizirano je 39 zdravih osoba (Sandhya i sar., 2013), dok je u studiji sprovedenoj na severu Indije analizirano 208 kontrola (Shukla i sar., 2012). Rezultati ispitivanja rs1800629 polimorfizma u promotoru gena za TNF mogli bi da ukažu i na etničke specifičnosti ispitivanih populacija, i na moguću različitu podložnost inflamatornim oboljenjima u tim populacijama koje se razlikuju po etničkom poreklu. Ustanovljeno je da je rs1800629 polimorfizam gena za TNF udružen sa pojavom astme na Tajvanu kao i da su teže kliničke forme astme udružene sa višim koncentracijama TNF u serumu (Chiang i sar., 2013). Rezultati studije rađene u Turskoj ukazuju da nosioci kombinacije alela TNF -308 A i IL-10 -1082 A imaju četiri puta veći rizik da

obole od Hašimoto tireoiditisa (Baki M, 2012). Brojne studije bavile su se i ispitivanjem udruženosti ovog polimorfizma i sklonosti ka nastanku psorijaze, pa je G/A supstitucija na poziciji -308 u promotoru gena za TNF, odnosno rs1800629 polimorfizam, jedan od najčešće ispitivanih DNK polimorfizama kod pacijenata sa psorijazom (Qidwai i Khan, 2011). U većem broju istraživanja, ovaj polimorfizam je naznačen kao mogući biomarker sklonosti ka nastanku psorijaze (Nair i sar., 2009; Cui i sar., 2012; Cabaleiro i sar., 2013) i psorijazni artritis (Filer i sar., 2008). Ova činjenica se objašnjava rezultatima studija koje su pokazale da se transkripcioni aktivatori AP-2, Sp1 i MZF-1 vezuju blizu pozicije -308, ali se nijedan od njih ne vezuje pretežno za A alel već se za njega pretežno vezuje još uvek nedovoljno okarakterisani protein što verovatno dovodi do toga da AA homozigoti proizvode više TNF (Wilson i sar., 1992; Baseggio i sar., 2004; Smith i Humphries, 2009). Pored brojnih istraživanja u kojima je ispitivana povezanost između SNP na poziciji -308 u promotorskom regionu gena za TNF i sklonosti za razvoj psorijaze i psorijaznog artritisa, definitivni značaj ovih alela u patogenezi ovih bolesti teško je proceniti jer su rezultati istraživanja nekonzistentni (Rahman i sar., 2006; Li i sar., 2007). Publikovani podaci su kontradiktorni tako da neki autori opisuju asocijaciju između ovog SNP i sklonosti ka nastanku psorijaze (Hohler i sar., 2002; Settin i sar., 2009) dok drugi nisu uspeali da pronađu udruženost ovog polimorfizma sa sklonošću za razvoj psorijaze (Arias i sar., 1997; Nishibu i sar., 2002; Tsunemi i sar., 2003). Ovako nekonzistentni rezultati mogu da budu posledica nedovoljnog broja ispitanika u analiziranim kohortama, skromnog uticaja rs1800629 polimorfizma na sklonost ka nastanku psorijaze, a ne može se isključiti ni mogućnost da bi ovaj SNP mogao da ima različite efekte u različitim etničkim grupama u zavisnosti od frekvencije drugih alela koji se nalaze u njegovoj blizini ili čiji su produkti uključeni u iste biohemijske puteve (Li i sar., 2007; Zhu i sar., 2013). Skorašnja meta-analiza ukazala je koji alel i genotipovi ovog polimorfizma imaju protektivnu ulogu u psorijazi (Zhu i sar., 2013). Sa ciljem sumiranja rezultata o značaju polimorfizma na poziciji -308 u promotoru gena za TNF na patogenezu psorijaze urađena je meta-analiza kojom su obuhvaćene 22 studije sa ukupno 2184 pacijenata sa psorijazom i 2126 zdravih osoba. Na osnovu izmerenih vrednosti odnosa šansi, ukazano je da su nosioci A alela (varijante genotipa AA i AG) imali manji rizik od obolevanja, odnosno da A alel deluje protektivno, smanjujući rizik od oboljevanja. U istoj meta-analizi nije ustanovljena udruženost između ovog polimorfizma TNF i pojave psorijaznog artritisa (Zhu i sar., 2013).

Ova doktorska disertacija predstavlja prvo istraživanje kojim je određena frekvencija alela na poziciji -308 u promotoru genu za TNF (rs1800629) i distribucija genotipova kod pacijenata sa psorijazom u Srbiji. Rezultati ukazuju da nema statistički značajne razlike u frekvencijama alela na poziciji -308 u promotoru gena za TNF i distribuciji genotipa između pacijenata sa psorijazom i sa psorijaznim artritismom i zdravih, kontrolnih osoba. Ovi rezultati su u skladu rezultatima istraživanja sprovedenog u SAD u koje je bilo uključeno 99 pacijenata bele rase, gde nije ustanovljena statistička značajnost u frekvencijama G i A alela na poziciji -308 u genu za TNF između pacijenata sa psorijazom i kontrola (Arias i sar., 1997). Rezultati dva nezavisna istraživanja sprovedena u Japanu takođe ukazuju da nema udruženosti između -308 A alela i sklonosti ka nastanku psorijaze i psorijaznog artritisa (Nishibu i sar., 2002; Tsunemi i sar., 2002). U skladu sa rezultatima ove disertacije su i rezultati istraživanja sprovedenih u Engleskoj (Craven i sar., 2001), Južnoj Koreji (Kim i sar., 2003), Brazilu (Magalhaes i sar., 2010) i Španiji (Gallo i sar., 2012) u kojima nije ustanovljen uticaj rs1800629 polimorfizma na sklonost ka nastanku psorijaze.

Međutim, postoje istraživanja koja ukazuju na suprotne rezultate. Tako su na primer Hohler i saradnici (2002) u istraživanju sprovedenom u Nemačkoj ustanovili da je frekvencija G alela u promotorskom regionu gena za TNF na poziciji -308 značajno povišena kod pacijenta obolelih od psorijaze u odnosu na zdrave kontrole (Hohler i sar., 2002). Povezanost između ovog polimorfizma i sklonosti ka nastanku psorijaze potvrđena je kasnije i u Egiptu (Settin i sar., 2009) i Estoniji (Mossner i sar., 2005). Štaviše, rezultati istraživanja sprovedenog u Estoniji ukazuju da je frekvencija A alela viša kod pacijenata sa blažom kliničkom formom psorijaze, odnosno da bi ovaj alel mogao povoljno da utiče na težinu kliničke slike psorijaze. Ovaj rezultat može da se poveže sa rezultatom iz ove disertacije koji ukazuje da je nedostatak G alela kod pacijenata sa psorijazom povezan za nižim PASI skorom kod pacijenata. Međutim, postoje podaci koji ukazuju da nosioci A alela imaju težu formu psorijaznog artritisa u Irskoj (Balding i sar., 2003). Kontradiktorni podaci dobijeni iz pomenutih istraživanja mogli bi da reflektuju etničke specifičnosti ispitivanih populacija.

Iako statističke značajnosti nisu dokazane, trendovi rezultata ove disertacije su u skladu sa rezultatima nedavno urađene meta-analize (Zhu i sar., 2013) koji ukazuju da G alel rs1800629 polimorfizma gena za TNF predstavlja faktor rizika za grupu pacijenata sa psorijazom, odnosno za pacijente sa psorijaznim artritismom. U našoj studiji, prisustvo GG genotipa uvećavalo je vrednosti odnosa šansi za oboljevanje od psorijaze i

psorijaznog artritisa. Rezultati ove disertacije ukazuju i na mogućnost da prisustvo makar jednog G alela na poziciji -308 u promotoru gena za TNF korelira sa težom kliničkom slikom i sledstveno, većim vrednostima PASI skora, što ukazuje na mogućnost da je G alel udružen sa težom formom oboljenja. Alternativno, moguće je da A alel ima izvesnu protektivnu ulogu, pa nosioci A alela imaju manju šansu da dobiju psorijazu kao i psorijazni artritis. U ovom istraživanju nije bilo statistički značajne razlike u distribuciji alela i genotipova između pacijenata sa ranim i kasnim početkom bolesti u odnosu na kontrole i međusobno. GG genotip je predstavljao viši faktor rizika za nastanak psorijaze tip 2 nego psorijaze tip 1. Saglasno prethodno iznetom, nosioci A alela imali su manju šansu da dobiju psorijazu tip 2.

Značajno je da se GG homozigotnost povezuje sa niskom produkcijom TNF dok se AA homozigotnost povezuje sa visokom produkcijom TNF (Wilson i sar., 1997) što se čini paradoksalnim s obzirom na pretpostavljenu ulogu TNF u započinjanju i održavanju zapaljenja. TNF prevashodno sekretuju mononuklearni fagociti, T-ćelije i NK ćelije, a u zapaljenju i psorijazi mogu da ga sekretuju mast ćelije, dendritske ćelije i keratinociti (Lowe i sar., 2007; Wagner i sar., 2010; Sweeney i sar., 2011; Kupetsky i sar., 2013). TNF podstiče ekspresiju adhezivnih molekula na ćelijama endotela, dovodi do aktivacije neutrofila i pospešuje sintezu proteina akutne faze i podstiče keratinocite da produkuju IL-1, IL-6 i IL-8 čime indukuje zapaljenjsku reakciju (Perera i sar., 2012). TNF preko transkripcionog faktora NFκB indukuje hiperproliferaciju keratinocita, sintezu anti-apoptotskih faktora i pro-angiogenog VEGF (*engl.* Vascular endothelial growth factor), što doprinosi nastanku i održavanju inflamacije u psorijazi (Avramidis i sar., 2010; Kupetsky i sar., 2013). Pored toga, TNF podstiče produkciju IL-22 koji stimuliše proliferaciju keratinocita (Perera i sar., 2012). Mora se, međutim imati na umu da pored opisanih efekata TNF može da indukuje apoptozu u ćelijama zapaljenjskog infiltrata (Chatzidakis i Mamalaki, 2010; Vujanovic, 2011), pa bi na taj način viša produkcija TNF mogla brzo da ograniči zapaljenjski proces i tako spreči nastanak hroničnih bolesti kao što su psorijaza i psorijazni artritis. TNF može da ispolji anti-zapaljenjske efekte i inhibicijom signalizacije T-ćelijskog receptora, indukcijom apoptoze T-ćelija, inhibicijom kostimulacije od strane dendritskih ćelija kao i indukcijom T_H2 citokina koji mogu da inhibišu imunski odgovor posredovan ćelijama (O'Shea i sar., 2002). Alternativno, veća produkcija TNF mogla bi indukcijom snažnije zapaljenjske reakcije da dovede do brže eliminacije potencijalnih patogena koji su kolonizovali ili prodrli kroz epiderm i na taj način spreči dugotrajan (hroničan) zapaljenjski proces kakav postoji u

koži zahvaćenoj psorijazom. Ovakvi efekti TNF mogu da objasne nalaz da nosioci A alela, inače povezanog sa većom produkcijom TNF (Wilson i sar., 1997), mogu da imaju blažu kliničku sliku psorijaze ili da budu manje skloni obolevanju od psorijaze i psorijaznog artritisa.

Rezultati ove doktorske teze ukazuju da je viša frekvencija A alela povezana sa blažom kliničkom slikom psorijaze. Ovo može da se objasni činjenicom da TNF pored dobro poznatih proinflamatornih efekata može da ispolji i antiinflamatorne efekte, i na taj način da ograniči zapaljenje u psorijazi. Moguće je da ispitivani polimorfizam u promotoru gena za TNF utiče na produkciju drugih citokina koji imaju značajnu ulogu u patogenezi psorijaze (Zhu i sar., 2013).

T_H1 ćelijama i IFN-gama pripisuje se važna uloga u patogenezi psorijaze. IFN-gama je multipotentni pleotropni citokin koji ima veliki značaj u urođenom i stečenom imunskom odgovoru, a proizvode ga prvenstveno T-ćelije (T_H1 ćelije i CD8⁺ T-ćelije) i NK ćelije. Pokazano je da IFN-gama podstiče produkciju IL-1 i IL-23 od strane dendritskih ćelija, i da utiče na aktivaciju T_H17 ćelija koje su veoma značajne u inflamatornoj kaskadi u psorijazi (Johnson-Huang i sar., 2012).

Gen za IFN-gama lociran je na dugačkom kraku hromozoma 12 (12q14). Do sada je poznato nekoliko funkcionalnih polimorfizama ovog gena od kojih je najbolje opisan SNP na poziciji +874 A/T (rs2430561). Neposredno uz rs2430561, i u potpunoj povezanosti sa ovim polimorfizmom, nalazi se mikrosatelitni marker koji se sastoji od CA ponovaka čiji broj korelira sa produkcijom IFN-gama. Osobe homozigoti za alel 2 koji odgovara broju od 12-15 CA ponovaka, proizvode značajno više IFN-gama nego osobe sa manjim brojem CA ponovaka (Pravica i sar., 1999). Pravica i saradnici (2000) su pokazali da je nasleđivanje A ili T nukleotida na poziciji +874 u potpunoj povezanosti sa brojem CA ponovaka, tj. da se T alel nasleđuje zajedno sa nizom od 12-15 CA ponovaka, pa prema tome, T alel na poziciji +874 korelira i sa višom produkcijom IFN-gama. Korelaciju između +874 T alela i produkcije IFN-gama kasnije su potvrdili i drugi istraživači (Hoffmann i sar., 2001; Hutchings i sar., 2002), ali postoje i suprotni rezultati (Cartwright i sar., 1999). Objašnjenje uticaja +874 A/T polimorfizma na produkciju IFN-gama može se naći i u činjenici da se rs2430561 polimorfizam nalazi unutar veznog mesta za NFκB, a prisustvo timina na poziciji +874 neophodno je za specifično vezivanje transkripcionog faktora NFκB (Pravica i sar., 1999). Dokazan je i značaj T alela rs2430561 polimorfizma za povećanje sklonosti ka nastanku sistemskih autoimunskih bolesti kao što je sistemski eritemski lupus (Tangwattanachuleeporn i sar., 2007; Kim i

sar., 2010), kao i zapaljenskih bolesti kao što je Lichen erosivus mucosae oris (Bai i sar., 2008; Kimkong i sar., 2012).

Rezultati istraživanja u kojima je analiziran rs2430561 polimorfizam gena za IFN-gama ukazuju na različite frekvencije alela i genotipova u različitim populacijama (Cardoso i sar., 2010; Wang i sar., 2012), ali i na razlike u okviru istih etničkih grupa kada su ispitivane populacije sa geografski različitih područja (Yang i sar., 2010; Shen i sar., 2013). Te činjenice opravdavaju ispitivanja polimorfizma pojedinačnih nukleotida gena u različitim populacijama, kako pacijenata tako i zdravih osoba da bi mogao da se utvrdi njihov uticaj na podložnost za razvoj određenih bolesti u određenim populacijama. Ustanovljeno je da je frekvencija A alela rs2430561 polimorfizma gena za IFN-gama viša u ispitivanim populacijama u Aziji u odnosu na populacije belaca (Lee i sar., 2010; Kimkong i sar., 2012). U skladu sa tim, frekvencije A i T alela u populaciji zdravih osoba u Srbiji su slične frekvencijama ovih alela u većini evropskih populacija, a postoji statistički visoko značajna razlika u odnosu na većinu populacija u Aziji i Africi. Tako su frekvencije A i T alela u zdravoj populaciji Srbije (Popadic i sar., 2012) slične frekvencijama ovih alela u populacijama Velike Britanije (Craven i sar., 2001), Italije (Poli i sar., 2002), Bugarske (Mihailova i sar., 2005), Hrvatske (Etokebe i sar., 2006), Turske (Sallakci i sar., 2007), pripadnika bele rase iz Kanade (Larcombe i sar., 2008), Poljske (Baran i sar., 2008), Brazila (Moura i sar., 2009) i Kine (Gao i sar., 2009). S druge strane, postoji statistički visoko značajna ili značajna razlika u distribuciji A i T alela u zdravoj populaciji Srbije i populacija Južne Afrike (Govan i sar., 2003), Hong Konga (Tso i sar., 2005), Tajvana (Lee i sar., 2010), Egipta (Mosaad i sar., 2010), Tajlanda (Kimkong i sar., 2012), kanadana indijanskog porekla iz plemena Dene (Larcombe i sar., 2008), i neočekivano, Danske (Taudorf i sar., 2008). Navedeni podaci za kontrolne populacije Danske i Poljske odstupaju od podataka za druge evropske populacije i [HapMap-CEU](#) populaciju, a razlika možda može da se pripiše tipiziranju A odnosno T alela sa reverzne niti DNK.

Iako je utvrđena distribucija A i T alela na poziciji +874 gena za IFN-gama u većem broju populacija zdravih osoba, ovaj polimorfizam je nedovoljno ispitivan kod pacijenata sa psorijazom, što je neobično uzimajući u obzir prevalenciju psorijaze, zdravstveni i socio-ekonomski značaj ovog oboljenja kao i važnost IFN-gama u patogenezi psorijaze. Jedno od mogućih objašnjenja za nesklad između značaja IFN-gama u velikom broju zapaljenskih bolesti uključujući i psorijazu i broja studija u kojima je ispitivan rs2430561 polimorfizam gena za IFN-gama leži u činjenici da ne

postoje komercijalno dostupni oligonukleotidi za analizu prisustva A i T alela u ovom lokusu real time PCR metodom. Zbog toga i ne iznenađuje relativno mali broj istraživanja u kojima je ovaj polimorfizam ispitivan kod pacijenata sa psorijazom. Dizajniranjem prajmera i proba, kao i definisanjem uslova za diskriminaciju između A i T alela rs2430561 polimorfizma gena za IFN-gama omogućeno je većem broju istraživača da koriste ovu brzu i efektivnu metodu za određivanje učestalosti alela ovog polimorfizma. Iz malobrojnih istraživanja u kojima je proučavan ovaj polimorfizam kod pacijenata obolelih od psorijaze, dobijeni su kontradiktorni podaci.

Ovo je prvo istraživanje u kojem je određena distribucija alela na poziciji +874 gena za IFN-gama kod pacijenata obolelih od psorijaze u Srbiji. Rezultati ukazuju da nema statistički značajne razlike u frekvencijama T i A alela na poziciji +874 gena za IFN-gama (rs2430561) i distribuciji genotipova između pacijenata sa psorijazom, psorijaznim artritismom i kontrola, kao ni sa težinom kliničke slike psorijaze koja je merena PASI skorom. Ustanovljene su izvesne razlike kada se poredi grupa pacijenata sa psorijazom tip 1 sa grupom pacijenata sa psorijazom tip 2. Kod pacijenata sa psorijazom tip 1, zastupljenost T alela je veća nego kod pacijenata sa tipom 2 psorijaze. Frekvencija nosioca T alela je viša kod pacijenata sa psorijazom tip 1 u odnosu na grupu pacijenata sa psorijazom tip 2, a frekvencija genotipova u grupi pacijenata sa psorijazom tip 1 bila je TA>TT>AA dok je u grupi pacijenata sa psorijazom tip 2 bila TA>AA>TT. Vrednosti OR u ispitivanim grupama ukazuju da bi prisustvo TT genotipa moglo da doprinese riziku za oboljevanje od psorijaznog artritisa, iako statistička značajnost nije pokazana. Prisustvo TT genotipa kod pacijenata sa psorijazom, na sličan način, moglo bi da predstavlja veći rizik za rano oboljevanje. Rezultati ove disertacije u odnosu na polimorfizam gena za IFN-gama su u skladu sa rezultatima dobijenim analizom uzoraka 68 pacijenata sa psorijazom i 330 kontrola u Velikoj Britaniji (Craven i sar., 2001). Rezultati tog istraživanja ukazuju da u grupi pacijenata sa psorijazom nije ustanovljena značajna razlika u distribuciji genotipova u odnosu na kontrole, kao ni između pacijenata sa različitim tipovima psorijaze i kontrolne grupe, a distribucija genotipova kod pacijenata sa psorijazom tip 1 je bila slična kao u ovoj disertaciji. Sledstveno tome, zaključeno je da razlika u ekspresiji gena za IFN-gama između pacijenata sa psorijazom i kontrola ne može da se objasni ovim polimorfizmom gena za IFN-gama (Craven i sar., 2001). U skladu sa rezultatima ove disertacije i nalazima Cravena i saradnika (2001) su i rezultati istraživanja Chang i saradnika (2007), dobijeni na 170 pacijenata i 210 kontrola u studiji u kojoj je ispitivan mikrosatelitni polimorfizam CA ponovaka u prvom intronu

gena za IFN-gama. Takođe, nije ustanovljena povezanost između ovog polimorfizma i sklonosti ka nastanku psorijaze i psorijaznog artritisa (Chang i sar., 2007). Ni u istraživanju u Južnoj Koreji na 114 pacijenata i 281 zdravoj kontroli nije ustanovljena povezanost između broja CA ponovaka u prvom intronu gena za IFN-gama i sklonosti za razvoj psorijaze (Kim i sar., 2007). Iako je metodološki pristup u navedenim istraživanjima različit od onoga koji je primenjen u istraživanju čiji su rezultati prikazani u ovoj tezi (određivanje broja CA ponovaka i digestija restikcionim enzimima u odnosu na hibridizaciju i hidrolizu TaqMan proba specifičnih za A ili T alel) rezultati se mogu direktno porediti s obzirom na vezano nasleđivanje broja CA ponovaka i A ili T alela. Nasuprot tome, rezultati istraživanja Barana i saradnika (2008) ukazuju na statistički značajnu razliku ($p=0,02$) u distribuciji genotipova rs2430561 polimorfizma gena za IFN-gama pri čemu je TA genotip značajno češći u kontrolnoj grupi nego u grupi pacijenata, dok su AA i TT genotipovi češći kod pacijenata sa psorijazom (Baran i sar., 2008). U tom istraživanju ustanovljene su razlike između pacijenata sa psorijazom tip 1 i kontrola ($p<0,01$), dok nisu dobijene značajne razlike u frekvencijama nosioca A i T alela između ukupne grupe pacijenata sa psorijazom i kontrola kao ni između grupa pacijenata sa psorijazom tip 1 i tip 2. Rezultati istog istraživanja ukazuju da postoji značaj rs2430561 polimorfizma gena za IFN-gama za sklonost ka nastanku psorijaze ali ne i za tip psorijaze koji pacijenti razvijaju (Baran i sar., 2008). Ti rezultati bi mogli da reflektuju etničku specifičnost ispitivane populacije u Poljskoj, ali frekvencije alela i genotipova u kontrolnoj grupi (ali ne i grupi pacijenata sa psorijazom) bitno odstupaju od objavljenih podataka za druge evropske populacije osim za populaciju Danske (Taudorf i sar., 2008). Dobijeni rezultati u oba slučaja se možda mogu objasniti predstavljanjem rezultata sa reverzne niti DNK što se iz teksta metoda u navedenim radovima ne može zaključiti. Veći broj osoba u kontrolnoj grupi poljske populacije je neophodan za definisanje uloge rs2430561 polimorfizma u patogenezi psorijaze kod pacijenata u Poljskoj i dao bi doprinos meta-analizi kojom bi moglo preciznije da se definiše značaj ovog polimorfizma za sklonost ka nastanku psorijaze ili za težinu kliničkog ispoljavanja ove bolesti. Dopunske studije u drugim populacijama svakako su neophodne kako bi se ustanovio pravi značaj ovog polimorfizma za sklonost ka nastanku psorijaze. Optimizovanje TaqMan proba koje bi funkcionisale na temperaturi od 60°C bi omogućilo još širu primenu ovog brzog i relativno jednostavnog metoda za otkrivanje frekvencija alelskih varijanti rs2430561 polimorfizma u različitim populacijama i

olakšalo meta-analize značaja ovog polimorfizma u patogenezi ne samo psorijaze nego i drugih inflamatornih bolesti.

Postoje kontradiktorni rezultati istraživanja u kojima je analiziran uticaj T i A alela na poziciji +874 u genu za IFN-gama na sklonost ka nastanku različitih drugih zapaljenskih bolesti. Neka istraživanja ukazuju da je prisustvo pojedinih alela na poziciji +874 u genu za IFN-gama udruženo sa podložnošću bolestima u čijoj patogenezi je važna inflamatorna komponenta i to u različitim populacionim grupama, ali postoje i podaci o njihovoj protektivnoj ulozi. Rezultati meta-analize de Albuquerque i saradnika (2012) ukazuju da je polimorfizam na poziciji +874 u genu za IFN-gama povezan sa podložnošću tuberkulozi pluća i da je tuberkuloza pluća češća kod pacijenata sa AA genotipom (Etokebe i sar., 2006; Larcombe i sar., 2008; de Albuquerque i sar., 2012). Rezultati dva istraživanja u Kini ukazuju da +874 AA genotip može da bude povezan sa podložnošću tuberkulozi kod ženske dece Han populacije (Shen i sar., 2013), dok rezultati koje su dobili Yang i saradnici (2010) ukazuju da polimorfizam na poziciji +874 nije povezan sa podložnošću za razvoj tuberkuloze kod odraslih osoba Han populacije. Rezultati istraživanja u Tunisu pokazali su da AA genotip ima značajan protektivni efekat tj. da je ovaj genotip udružen sa rezistencijom na razvoj tuberkuloze (Ben Selma i sar., 2011). Istraživanje sprovedeno u Brazilu ukazuje na protektivnu ulogu +874 TA genotipa na infekciju izazvanu *M. lepre* (Cardoso i sar., 2010). Međutim, ovaj rezultat nije potvrđen kod bolesnika sa leprom Han populacije u Kini (Wang i sar., 2012).

IL-12B (p40) protein predstavlja zajedničku podjedinicu IL-12 i IL-23 koji imaju značajnu ulogu u patogenezi psorijaze. Smatra se da promene u genima za IL-12B i IL-23R, utiču na razvoj psorijaze do te mere da se smatraju ključnim genima izvan HLA lokusa za sklonost ka nastanku psorijaze (Cargill i sar., 2007; Smith i sar., 2008). Zapažen je i aditivni efekat pojedinih alela gena koji kodiraju IL-12B i IL-23R u sklonosti ka nastanku psorijaze (Nair i sar., 2008; Smith i sar., 2008). Pokazano je da terapija antitelima protiv IL-12 i IL-23, koji su ključni citokini za indukciju T_H1 i održavanje T_H17 odgovora, dovodi do dugotrajne remisije kod pacijenata sa psorijazom (Lucka i sar., 2012). Geni koji kodiraju činioce IL-23 posredovanog puta inflamacije predstavljaju važne determinante u patogenezi psorijaze u različitim etničkim grupama (Cargill i sar., 2007; Nair i sar., 2010). Ustanovljeno je da su polimorfizmi gena koji kodiraju proteine od značaja za IL-23/T_H17 signalne puteve kao što su *IL-12B* i *IL-23R*,

povezani sa rizikom za oboljevanje od psorijaze u populacijama belaca u Nemačkoj i SAD i populaciji sa Tajlanda (Nair i sar., 2008; Nair i sar., 2010).

IL12B gen kodira protein p40 i lociran je na dugom kraku hromozoma 5 (5q31.1-q33.1). Podjedinica p40 sa podjedinicom p35 gradi heterodimer i formira IL-12 dok sa p19 subjedinicom formira IL-23. Ispitivanjem polimorfizama gena u celokupnom genomu ustanovljeno je da pojedini SNP unutar *IL12B* gena povećavaju rizik za nastanak psorijaze (Nair i sar., 2009; Zhang i sar., 2009; Huffmeier i sar., 2010). Opisano je više polimorfizama *IL12B* gena, a jedan od njih, koji se posebno dovodi u vezu sa sklonošću za nastanak psorijaze, je SNP +1188 A/C (rs3212227) (Capon i sar., 2007; Cargill i sar., 2007; Nair i sar., 2009; Perera i sar., 2012). Ovo je potvrđeno i u dve meta-analize, kojima je ustanovljena značajna udruženost između rs3212227 polimorfizma gena za IL-12B i sklonosti ka nastanku psorijaze (Lee i Song, 2013; Zhu i sar., 2013). Smatra se da je rs3212227 funkcionalni polimorfizam s obzirom da je CC genotip udružen sa povećanom ekspresijom *IL12B* gena i povećanom stabilnosti iRNK koja se prevodi u p40, mehanizmima koji su nedovoljno poznati. Isključena je mogućnost regulacije ekspresije ovog gena i stabilnosti iRNK molekulima miRNK jer ni za jedan od alela nije bilo preferencijalnog vezivanja regulatornih miRNK (Basu i sar., 2012).

Brojna su istraživanja u kojima su ispitivane frekvencije A i C alela rs3212227 polimorfizma gena za IL-12B kod zdravih osoba u različitim sredinama. U ovoj doktorskoj disertaciji je po prvi put na teritoriji republike Srbije utvrđena distribucija A i C alela rs3212227 polimorfizma *IL12B* gena u populaciji zdravih osoba. Rezultati ukazuju da postoji statistički visoko značajna razlika u frekvencijama A i C alela kod stanovnika Srbije u odnosu na populacije: Kine (Chen i sar., 2009), Tajlanda (Nair i sar., 2010), SAD (Haralambieva i sar., 2011), Gambije (Morris i sar., 2011), Gvineje Bisau (Morris i sar., 2011) i Finske (Ohman i sar., 2012). Nije ustanovljena statistički značajna razlika u frekvencijama A i C alela između populacije Srbije i populacija Velike Britanije (Filer i sar., 2008), Poljske (Grzegorzewska i sar., 2012), Češke (Navratilova i sar., 2012) i Nemačke (Glas i sar., 2012).

Ovo je prvo istraživanje kojim je utvrđena distribucija alela na poziciji +1188 u genu za IL-12B (rs3212227) kod zdravih osoba i pacijenata sa psorijazom u Srbiji. Nema značajne razlike u distribuciji A i C alela između pacijenata i zdrave, kontrolne populacije. U svim ispitivanim uzorcima frekvencija A alela je značajno viša u odnosu na frekvenciju C alela. Pored toga, nema značajne razlike u distribuciji AA, AC i CC genotipova u ispitivanim uzorcima pacijenata i zdravih kontrola.

U ovom istraživanju nije ustanovljena udruženost između polimorfizma gena koji kodira p40 podjedinicu IL-12 i IL-23 i sklonosti ka nastanku psorijaze kod osoba obolelih od psorijaze u Srbiji. Međutim, kada su rezultati kontrolne grupe poređeni sa podgrupom pacijenata koji pored psorijaze imaju i psorijazni artritis, dobijene su granične vrednosti rezultata, koji ukazuju na moguću udruženost AC i AA genotipova rs3212227 polimorfizma i sklonosti za oboljevanje od psorijaznog artritisa.

Ovi rezultati su slični rezultatima nekoliko istraživanja sprovedenih u Evropi, Aziji i Americi u kojima je utvrđen protektivni efekat rs3212227 C alela za psorijazu i psorijazni artritis (Zhu i sar., 2013). Rezultati dve meta-analize, jedne u kojoj su obrađeni podaci publikovani u 14 radova (Lee YH, 2013) i druge u kojoj su obrađeni rezultati 16 istraživanja (Zhu i sar., 2013), ukazuju da su rs3212227 i rs6887695 polimorfizmi u genu za IL-12B udruženi sa sklonošću ka nastanku psorijaze. Navedene meta-analize proizašle su iz brojnih istraživanja u kojima je analiziran uticaj rs3212227 polimorfizma na sklonost ka nastanku psorijaze (Tsunemi i sar., 2002; Capon i sar., 2007; Chang i sar., 2007; Liu i sar., 2008; Nair i sar., 2008; Smith i sar., 2008; Nair i sar., 2010). Tako je na primer, u studiji sprovedenoj u Španiji na 304 pacijenta i 422 zdrave osobe ispitivana povezanost rs3212227 polimorfizma i sklonosti ka nastanku psorijaze. AA genotip bio je češći u grupi pacijenata nego kod zdravih kontrola, ali bez statističke značajnosti. U istom istraživanju kod pacijenata sa psorijazom je ustanovljena statistički značajno veća frekvencija udruživanja GG genotipa rs6887695, 80 Kb udaljenog od rs3212227 polimorfizma gena za IL-12B, sa AA genotipom ovog SNP kod pacijenata sa psorijazom nego kod kontrola (Eiris i sar., 2012). U istraživanju sprovedenom na Tajlandu na 206 pacijenata i 114 kontrola ustanovljeno je da marker rs3212227 gena za IL-12B pokazuje statistički značajnu udruženost sa sklonošću ka nastanku psorijaze u ovoj populaciji (Nair i sar., 2010). Dalje, udruženost rs3212227 polimorfizma, i sklonosti ka nastanku psorijaze ustanovljena je u Engleskoj na 308 pacijenata bele rase i 208 kontrola. U ovom istraživanju ustanovljen je minimalni protektivni efekat C alela rs3212227 polimorfizma, a haplotip CC je bio značajno češći kod zdravih kontrola. Rezultati istraživanja kojim je obuhvaćeno 1810 pacijenata bele rase iz SAD i Nemačke, 2522 kontrole kao i 509 članova familija pacijenata ukazuju na značaj rs3212227 markera za sklonost ka nastanku psorijaze kako analizom genotipova pacijenata i kontrola tako i analizom genotipova u okviru porodica obolelih (Nair i sar., 2008). Rezultati studije sprovedene na 577 pacijenata obolelih od psorijaze i 737 kontrola u SAD ukazuju na statistički značajnu povezanost između rs3212227 alela i podložnosti psorijazi (Liu i sar., 2008).

Kompleksna studija koju su sprovedeli Cargill i saradnici (2007) obuhvatila je 1446 pacijenata i 1432 kontrole. Na osnovu vrednosti odnosa šansi, ustanovljeno je da je frekvencija A alela viša kod pacijenata u odnosu na kontrole, kao i da heterozigoti imaju umeren, ali ne i statistički značajan rizik za oboljevanje od psorijaze u poređenju sa CC homozigotima (Cargill i sar., 2007). Analizom uzoraka 597 pacijenata obolelih od psorijaze i 4681 kontrolnog uzorka u Velikoj Britaniji ustanovljena je povezanost između AA genotipa rs3212227 polimorfizma gena za IL-12B i sklonosti ka nastanku psorijaznog artritisa (Filer i sar., 2008). Vrednosti odnosa šansi za AA genotip ukazivale su na veći rizik za oboljevanje od psorijaze tip 1 u Velikoj Britaniji (Smith i sar., 2008). U Japanu je sprovedeno istraživanje na 143 pacijenta sa psorijazom i 100 zdravih kontrola i ustanovljeno je da je A alel rs3212227 polimorfizma značajno udružen sa sklonošću psorijazi (Oka i sar., 2013). Postojanje razlike u nivou statističke značajnosti dobijenih razlika u frekvencijama pojedinih genotipova rs3212227 polimorfizma gena za IL-12B kod pacijenata sa psorijazom i kontrola, uz saglasnost trendova frekvencija ispitivanih alela i genotipova, između rezultata ove disertacije i rezultata drugih istraživanja mogla bi da bude posledica nedovoljnog broja ispitanih osoba u ovom istraživanju. Kada se uzmu u obzir frekvencije genotipova rs3212227 polimorfizma kod obolelih od psoriasis vulgaris u Srbiji, proizilazi da bi bilo neophodno ispitati više od 568 pacijenta da bi se dobili konačni rezultati značajnosti ovog polimorfizma za populaciju obolelih od psorijaze u Srbiji. Slična distribucija genotipova bez statističke značajnosti ustanovljena je u nedavno publikovanom radu gde je rs3212227 polimorfizam ispitivan kod 304 pacijenata sa psorijazom i 422 kontrole u Španiji (Eiris i sar., 2012).

Ispitivan je značaj rs3212227 polimorfizma *IL12B* gena za podložnost ili protektivni efekat i u drugim oboljenjima. Bez obzira na mnoge sličnosti između psorijaze i inflamatorne bolesti creva, nije ustanovljena povezanost ovog polimorfizma sa sklonošću ka nastanku inflamatorne bolesti creva (Marquez i sar., 2008). Dalje, genotip AA rs3212227 polimorfizma je bio protektivan kod pacijenata muškog pola inficiranih sa HCV ali ne i kod žena (Youssef i sar., 2013). Nosioci C alela rs3212227 polimorfizma imali su veći rizik za razvoj karcinoma grlića materice i nazofaringealnog karcinoma (Chen i sar., 2012; Zhou i sar., 2012). Genotipovi AC i CC rs3212227 polimorfizma imaju protektivni efekat kod oboljevanja od astme u kineskoj Han populaciji (Chen i sar., 2011). Zanimljivi su i rezultati nekoliko istraživanja u kojima je ispitivan značaj rs3212227 polimorfizma u patogenezi tuberkulozne infekcije. Tako je na primer u kohorti kojom je obuhvaćeno ispitivanje više polimorfizama, između ostalog i rs3212227

u populacijama Gvineje-Bisao, Gambije, SAD i Argentine pokazano je da je C alel rs3212227 polimorfizma u populacijama Gvineje-Bisau i kod afroamerikanaca povezan sa podložnošću TBC infekciji, ali ne i u populacijama Gambije kao ni kod pripadnika bele rase poreklom iz Argentine (Morris i sar., 2011). U tri odvojena istraživanja, u SAD (Ma i sar., 2003), Indiji (Prabhu Anand i sar., 2007) i Turskoj (Ulger i sar., 2013), nije ustanovljena povezanost između rs3212227 polimorfizma i podložnosti infekciji sa *M. tuberculosis*. Interesantno je da za populaciju crnaca u SAD postoje kontradiktorni podaci. Ma i saradnici (2003) su sekvenciranjem DNK ispitivali značaj rs3212227 polimorfizma za podložnost infekciji sa *M. tuberculosis* kod 186 pacijenata i 167 kontrolnih osoba crne rase sa područja Hjustona i nisu ustanovili da rs3212227 polimorfizam utiče na podložnost ovoj infekciji (Ma i sar., 2003), dok su Morris i saradnici (2011) sprovedli istraživanje na 281 pacijentu i 179 kontrola crne rase sa područja Severne i Južne Karoline korišćenjem TaqMan proba i ustanovili su udruženost C alela rs3212227 polimorfizma i podložnosti infekciji sa *M. tuberculosis* (Morris i sar., 2011). Razlika u dobijenim rezultatima mogla bi da bude posledica različitog metodološkog pristupa i različitog broja pacijenata i kontrola u sprovedenim istraživanjima. Moguće je da dobijeni rezultati ukazuju na geoepidemiološke ili pak etničke specifičnosti ispitivanih populacija.

Na osnovu vrednosti OR dobijenih u ovom istraživanju, može se zaključiti da bi prisustvo A alela moglo da predstavlja faktor rizika za oboljevanje od psorijaze i psorijaznog artritisa. Ustanovljeno je, da nosioci A alela imaju veću šansu da dobiju psorijazu tip 1 kao i da je AC genotip statistički značajno ređi ($p=0.049$) kod pacijenata sa psorijaznim artritismom. Ovi podaci bi mogli da ukažu na mogući protektivni efekat AC genotipa, odnosno C alela za oboljevanje od psorijaznog artritisa.

Pokretanje T_H17 odgovora, odnosno podsticanje i održavanje hronične inflamacije dovodi do porasta nivoa IL-23, većeg broja proinflamatornih citokina, hemokina, antimikrobnih peptida i drugih molekula što održava inflamatorni milje i hiperproliferaciju keratinocita u psorijazi (Perera i sar., 2012). IL-23/ T_H17 osovina predstavlja značajan mehanizam u imunopatogenezi hroničnih inflamatornih bolesti. IL-23 je heterodimerni citokin sačinjen od p19 podjedinice i p40 koju deli sa IL-12 i ostvaruje efekte vezujući se za IL-23R (Kastelein i sar., 2007). Poremećaj, odnosno smanjenje nivoa prenosa signala na nivou IL-23 kod predisponiranih osoba može da

dovede do neadekvatnog, hroničnog, imunskog odgovora usmerenog prema epitelnim ćelijama i na taj način da indukuje nastanak psorijaze (Nair i sar., 2009). Novija istraživanja ukazuju na ključnu ulogu IL-23 u pokretanju T_H17 posredovane hronične inflamacije u psorijazi (Di Cesare i sar., 2009; Nair i sar., 2010). IL-23 utiče na celularni imunski odgovor podstičući T_H17 odgovor koji na nivou epitela ima i antimikrobnu protektivnu ulogu (Bettelli i sar., 2007; Wilson i sar., 2007).

Ustanovljeno je da su geni koji kodiraju proteine od značaja za IL-23/ T_H17 osovino povezani sa rizikom za oboljevanje od psorijaze (Iwakura i Ishigame, 2006; Nair i sar., 2010). Otkriveno je više polimorfizama pojedinačnih nukleotida u genu za IL-23R (rs1884444, rs11209026, rs7530511, rs2201841) čiji pojedini aleli ili genotipovi utiču na sklonost ka nastanku psorijaze (Safrany i sar., 2011; Zhu i sar., 2012).

Ovo je prvo istraživanje u kome je određena distribucija alela rs2201841 polimorfizma gena za IL23R kod zdravih osoba i pacijenata sa psorijazom u Srbiji. Rezultati ukazuju da se frekvencije T i C alela u zdravoj populaciji Srbije ne razlikuju značajno u odnosu na populacije Njufaundlenda i Alberte iz Kanade (Rahman i sar., 2008), Finske (Lappalainen i sar., 2008), SAD (Huber i sar., 2008; Kanaan i sar., 2012) i Mađarske (Szabo i sar., 2013). Statistički visoko značajna razlika u frekvencijama C i T alela rs2201841 polimorfizma ustanovljena je između zdrave populacije Srbije i populacija Japana (Yamazaki i sar., 2007), populacije iz Toronta u Kanadi (Rahman i sar., 2008) i populacije Južne Koreje (Kim i sar., 2009).

Zavisno od populacione grupe u kojoj je ispitivan značaj rs2201841 polimorfizma za podložnost nekom oboljenju, dobijeni su različiti podaci. Tako je na primer studijom sprovedenoj u Mađarskoj ustanovljeno da je CC genotip rs2201841 polimorfizma udružen sa pojavom ankilozirajućeg spondilitisa i Kronove bolesti ali ne i sa pojavom reumatoidnog artritisa (Szabo i sar., 2013). Istraživanjem sprovedenim u SAD, koje je obuhvatilo samo populaciju belaca, nije ustanovljena udruženost između rs2201841 polimorfizma i podložnosti za nastanak Kronove bolesti (Kanaan i sar., 2012). Slično tome, istraživanjem sprovedenim u Južnoj Koreji nije ustanovljena udruženost između rs2201841 polimorfizma i podložnosti za nastanak reumatoidnog artritisa (Park i sar., 2009). U studiji koja je sprovedena u Kanadi na tri populacione grupe, pokazano je da je haplotip koji sadrži AAT u polimorfizmima rs10489629, **rs2201841** i rs11465804 ima protektivan efekat za ankilozirajući spondilitis u populaciji Alberte i Njufaundlenda ali ne i u populaciji Toronta (Rahman i sar., 2008). U istraživanjima sprovedenim u Mađarskoj (Safrany i sar., 2010) i Južnoj Koreji (Kim i sar., 2009), nije ustanovljena

udruženost alela i genotipova ispitivanih polimorfizama *IL23R* gena (uključujući i rs2201841) sa podložnošću za nastanak sistemskog eitemskog lupusa. Pored ovih istraživanja, postoje studije koje ukazuju na značaj rs2201841 polimorfizama *IL-23R* gena za razvoj oftalmopatije u sklopu Grejvsove bolesti (Huber i sar., 2008) ali posebno su interesantne studije koje su ispitivale značaj rs2201841 polimorfizma i drugih SNPova u genu za *IL-23R* za sklonost ka nastanku psorijaze.

Nair i saradnici (2008) su ukazali na značaj *IL-12/23* puta u patogenezi psorijaze. Rezultati Safrany i saradnika (2011) su pokazali da je CC genotip rs2201841 polimorfizma udružen sa sklonošću ka nastanku psorijaze u populaciji Mađarske (Safrany i sar., 2011). Ovi rezultati su u skladu sa našim rezultatima koji ukazuju da je TT genotip statistički značajno zastupljeniji kod zdravih kontrola a da su nosioci C alela statistički značajno zastupljeniji u grupi obolelih od psorijaze u odnosu na zdrave kontrole, odnosno da T alel ima protektivnu ulogu. Rezultati ove teze su u skladu sa meta-analizom kojom su obrađeni podaci 13 objavljenih radova koji ukazuju da je C alel rs2201841 polimorfizma u genu za *IL-23 R* značajno udružen sa sklonošću ka nastanku psorijaze u celokupnoj svetskoj populaciji (Zhu i sar., 2012), dok su rs11209026 i rs7530511 polimorfizmi udruženi sa sklonošću ka nastanku psorijaze prevashodno kod evropskog stanovništva (Lee i Song, 2013).

Ova meta-analiza ne ispituje značaj rs2201841 polimorfizma za podložnost psorijaznom artritisu jer ne postoje publikovani podaci o udruženosti alela rs2201841 polimorfizma i sklonosti ka nastanku psorijaznog artritisa. Rezultati ove doktorske disertacije po prvi put ukazuju na statistički visoko značajnu razliku u frekvencijama T i C alela rs2201841 polimorfizma gena za *IL-23R* između pacijenata sa psorijaznim artritisom i kontrola, pri čemu je T alel protektivan, odnosno smanjuje rizik za nastanak psorijaznog artritisa (Popadic i sar., 2014). U skladu sa tim, rezultati ovog istraživanja ukazuju da postoji statistički visoko značajna razlika u distribuciji TT genotipa, koji je češći kod zdravih kontrola, dok su nosioci C alela tj. osobe sa CC i CT genotipovima češći u podgrupi pacijenata sa psorijaznim artritisom.

U patogenezi psorijaze, indukcija T_H17 odgovora dovodi i do oslobađanja proinflatornih citokina *IL-17* familije kao što su *IL-17A* i *IL-17F* iz T_H17 i $\gamma\delta$ T-ćelija koji dalje utiču na aktivaciju keratinocita (Laggner i sar., 2011). Pored T_H17 ćelija, u koži zahvaćenoj lezijama u psorijazi, *IL-17* mogu da sekretuju i neutrofili kao i mastociti (Lin i sar., 2011).

IL-17F indukuje oslobađanje proinflamatornih citokina i citokina koji dovode do hemotakse neutrofila i na taj način doprinosi procesu inflamacije (Kawaguchi i sar., 2006). Gen za IL-17F lociran je na kratkom kraku hromozoma 6 (6p12), a polimorfizmi ovog gena predstavljaju interesantno polje za izučavanje mehanizama hronične inflamacije. Ustanovljeno je da određeni polimorfizmi pojedinačnih nukleotida u genu za IL-17F, kao što je polimorfizam 7488T/C koji dovodi do zamene histidina na poziciji 161 argininom (rs763780), može da bude udružen sa sklonošću za nastanak ulceroznog kolitisa, klasične T_H17 bolesti, (Arisawa i sar., 2008), ali i bronhijalne astme, koja predstavlja model T_H2 bolesti, što je pokazano kod pacijenata u Japanu (Kawaguchi i sar., 2006). Shibata i saradnici (2009) su ispitivali alelsku distribuciju rs763780 polimorfizma u genu za IL-17F kod pacijenata sa psorijazom u Japanu i nisu pronašli povezanost između ovog polimorfizma i sklonosti ka nastanku psorijaze (Shibata i sar., 2009).

Ovo je prvo istraživanje u kojem je određena distribucija alela (G/A) na poziciji Val 155 Ile (V 155 I, 534G/A) u trećem egzonu gena za IL-17F (rs11465553) kod zdravih osoba i pacijenata sa psorijazom u Srbiji. U dostupnoj literaturi postoje samo dve publikacije u kojima je određena distribucija alela i genotipova ovog polimorfizma. U Saudijskoj Arabiji ispitivan je ovaj polimorfizam kod obolelih od bronhijalne astme, i nije ustanovljena udruženost alela ovog polimorfizma i podložnosti bronhijalnoj astmi (Bazzi i sar., 2011). U navedenom istraživanju učestalost ređeg alela je bila veoma niska (<1%) što je otežalo procenu značaja ovog polimorfizma za sklonost ka nastanku bronhijalne astme. Druga studija, koja je obuhvatila 99 pacijenata sa Behçetovom bolešću i 114 kontrola analizirala je tri polimorfizma gena za IL-17F (rs2397084, rs11465553, i rs763780) i ustanovljeno je da AG i GG haplotipovi rs2397084 i rs763780 imaju statistički visoko značajnu pozitivnu, odnosno inverznu asocijaciju, sa podložnošću za razvoj Behçetove bolesti dok su G i A aleli rs11465553 polimorfizma bili isključeni iz analize zbog veoma male učestalosti A alela (Jang i sar., 2008). Naime, prilikom analize haplotipa izbačeni su podaci za rs11465553 polimorfizam gena za IL-17F jer nije detektovan ni jedan ređi A alel u kompletnoj kontrolnoj grupi, dok je kod pacijenata sa Behçetovom bolešću detektovan sa frekvencijom od oko 1%. U dostupnoj literaturi nema podataka o eventualnoj povezanosti alela rs11465553 polimorfizma i sklonosti ka nastanku psorijaze i drugih hroničnih inflamatornih bolesti. Poređenjem zastupljenosti A alela u populaciji Srbije, Južne Koreje i Saudijske Arabije zaključuje se da je nalaz ovog alela najčešći u ispitivanoj populaciji u Srbiji. Iako je frekvencija ređeg

A alela bila dvostruko viša kod kontrola nego kod pacijenata, mali ukupan broj A alela je doprineo izostanku statistički značajne razlike u frekvenciji ovog alela između kontrola i pacijenata.

6. ZAKLJUČCI

1. Postoji statistički visoko značajna razlika u frekvenciji G alela, odnosno GG i GA genotipa polimorfizma gena za TNF na poziciji -308 (rs1800629) u grupama obolelih od psorijaze sa visokim i srednjim PASI skorom u poređenju sa grupom pacijenata sa niskim PASI skorom.
2. Dobijena je statistički visoko značajna razlika u frekvencijama T i C alela rs2201841 polimorfizma gena za IL-23R između podgrupe pacijenata sa psorijaznim artritismom i kontrolnih, zdravih osoba, pri čemu je T alel protektivan, dok C alel povećava rizik za nastanak psorijaznog artritisa.
3. Nosilaca C alela ispitivanog polimorfizma gena za IL-23R (rs2201841) je značajno više u grupi pacijenata sa psorijazom i podgrupi pacijenata sa psorijaznim artritismom nego među kontrolnim, zdravim osobama.
4. Postoji statistički visoko značajna razlika u učestalosti TT genotipa rs2201841 polimorfizma gena za IL-23R između podgrupe pacijenata sa psorijaznim artritismom i kontrola. TT genotip je značajno ređe zastupljen kod pacijenata sa psorijaznim artritismom.
5. Nosilaca TT genotipa rs2201841 polimorfizma gena za IL-23R je značajno manje među pacijentima sa psorijazom tip 1 u odnosu na kontrole.
6. Učestalost alela ispitivanih polimorfizama gena za TNF, IFN-gama, IL-12B, IL-23R i IL-17F kod zdravih osoba u Srbiji se značajno razlikuje u odnosu na populacije zdravih osoba na geografski udaljenim teritorijama i različitog etničkog porekla.

7. LITERATURA

1. Arias AI, Giles B, Eiermann TH, Sterry W, Pandey JP, 1997. Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism in psoriasis. *Exp Clin Immunogenet* 14, 118-122. [[PubMed](#)]
2. Arisawa T, Tahara T, Shibata T, Nagasaka M, Nakamura M, Kamiya Y, Fujita H, Nakamura M, Yoshioka D, Arima Y, Okubo M, Hirata I, Nakano H, 2008. The influence of polymorphisms of interleukin-17A and interleukin-17F genes on the susceptibility to ulcerative colitis. *J Clin Immunol* 28, 44-49. [[PubMed](#)]
3. Ariza ME, Williams MV, Wong HK, 2013. Targeting IL-17 in psoriasis: from cutaneous immunobiology to clinical application. *Clin Immunol* 146, 131-139. [[PubMed](#)]
4. Asumalahti K, Veal C, Laitinen T, Suomela S, Allen M, Elomaa O, Moser M, de Cid R, Ripatti S, Vorechovsky I, Marcusson JA, Nakagawa H, Lazaro C, Estivill X, Capon F, Novelli G, Saarialho-Kere U, Barker J, Trembath R, Kere J, Psoriasis C, 2002. Coding haplotype analysis supports HCR as the putative susceptibility gene for psoriasis at the MHC PSORS1 locus. *Hum Mol Genet* 11, 589-597. [[PubMed](#)]
5. Avramidis G, Kruger-Krasagakis S, Krasagakis K, Fragiadaki I, Kokolakis G, Tosca A, 2010. The role of endothelial cell apoptosis in the effect of etanercept in psoriasis. *Br J Dermatol* 163, 928-934. [[PubMed](#)]
6. Bai J, Lin M, Zeng X, Zhang Y, Wang Z, Shen J, Jiang L, Gao F, Chen Q, 2008. Association of polymorphisms in the human IFN-gamma and IL-4 gene with oral lichen planus: a study in an ethnic Chinese cohort. *J Interferon Cytokine Res* 28, 351-358. [[PubMed](#)]
7. Baker BS, Swain AF, Fry L, Valdimarsson H, 1984. Epidermal T lymphocytes and HLA-DR expression in psoriasis. *Br J Dermatol* 110, 555-564. [[PubMed](#)]
8. Baker BS, Swain AF, Griffiths CE, Leonard JN, Fry L, Valdimarsson H, 1985. Epidermal T lymphocytes and dendritic cells in chronic plaque psoriasis: the effects of PUVA treatment. *Clin Exp Immunol* 61, 526-534. [[PubMed](#)]
9. Baker H, Ryan TJ, 1968. Generalized pustular psoriasis. A clinical and epidemiological study of 104 cases. *Br J Dermatol* 80, 771-793. [[PubMed](#)]
10. Balding J, Kane D, Livingstone W, Mynett-Johnson L, Bresnihan B, Smith O, FitzGerald O, 2003. Cytokine gene polymorphisms: association with psoriatic arthritis susceptibility and severity. *Arthritis Rheum* 48, 1408-1413. [[PubMed](#)]
11. Baran W, Szepietowski JC, Mazur G, Baran E, 2006. A - 308 promoter polymorphism of tumor necrosis factor alpha gene does not associate with the susceptibility to psoriasis vulgaris. No difference either between psoriasis type I and type II patients. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat* 15, 113-118. [[PubMed](#)]

12. Baran W, Szepietowski JC, Mazur G, Baran E, 2008. IFN-gamma promoter gene polymorphism in psoriasis vulgaris. *Biomarkers* 13, 52-58. [[PubMed](#)]
13. Baseggio L, Bartholin L, Chantome A, Charlot C, Rimokh R, Salles G, 2004. Allele-specific binding to the -308 single nucleotide polymorphism site in the tumour necrosis factor-alpha promoter. *Eur J Immunogenet* 31, 15-19. [[PubMed](#)]
14. Basu M, Das T, Ghosh A, Majumder S, Maji AK, Kanjilal SD, Mukhopadhyay I, Roychowdhury S, Banerjee S, Sengupta S, 2012. Gene-gene interaction and functional impact of polymorphisms on innate immune genes in controlling *Plasmodium falciparum* blood infection level. *PLoS One* 7, e46441. [[PubMed](#)]
15. Bazzi MD, Sultan MA, Al Tassan N, Alanazi M, Al-Amri A, Al-Hajjaj MS, Al-Muhsen S, Alba-Concepcion K, Warsy A, 2011. Interleukin 17A and F and asthma in Saudi Arabia: gene polymorphisms and protein levels. *J Investig Allergol Clin Immunol* 21, 551-555. [[PubMed](#)]
16. Ben Selma W, Harizi H, Bougmiza I, Hannachi N, Ben Kahla I, Zaieni R, Boukadida J, 2011. Interferon gamma +874T/A polymorphism is associated with susceptibility to active pulmonary tuberculosis development in Tunisian patients. *DNA Cell Biol* 30, 379-387. [[PubMed](#)]
17. Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK, 2007. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol* 8, 345-350. [[PubMed](#)]
18. Boehncke WH, Schon MP, 2007. Animal models of psoriasis. *Clin Dermatol* 25, 596-605. [[PubMed](#)]
19. Boraska V, Skrabic V, Culic VC, Becic K, Kapitanovic S, Zemunik T, 2008. Association of TNF promoter polymorphisms with type 1 diabetes in the South Croatian population. *Biol Res* 41, 157-163. [[PubMed](#)]
20. Bos JD, Hulsebosch HJ, Krieg SR, Bakker PM, Cormane RH, 1983. Immunocompetent cells in psoriasis. In situ immunophenotyping by monoclonal antibodies. *Arch Dermatol Res* 275, 181-189. [[PubMed](#)]
21. Bowcock AM, 2005. The genetics of psoriasis and autoimmunity. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 6, 93-122. [[PubMed](#)]
22. Boyman O, Hefti HP, Conrad C, Nickoloff BJ, Suter M, Nestle FO, 2004. Spontaneous development of psoriasis in a new animal model shows an essential role for resident T cells and tumor necrosis factor-alpha. *J Exp Med* 199, 731-736. [[PubMed](#)]
23. Brandrup F, Holm N, Grunnet N, Henningsen K, Hansen HE, 1982. Psoriasis in monozygotic twins: variations in expression in individuals with identical genetic constitution. *Acta Derm Venereol* 62, 229-236. [[PubMed](#)]

24. Brookes AJ, 1999. The essence of SNPs. *Gene* 234, 177-186. [[PubMed](#)]
25. Cabaleiro T, Roman M, Gallo E, Ochoa D, Tudelilla F, Talegon M, Prieto-Perez R, Garcia-Diez A, Dauden E, Abad-Santos F, 2013. Association between psoriasis and polymorphisms in the TNF, IL12B, and IL23R genes in Spanish patients. *Eur J Dermatol* 23, 640-645. [[PubMed](#)]
26. Cantini F, Niccoli L, Nannini C, Kaloudi O, Bertoni M, Cassara E, 2010. Psoriatic arthritis: a systematic review. *Int J Rheum Dis* 13, 300-317. [[PubMed](#)]
27. Capon F, Di Meglio P, Szaub J, Prescott NJ, Dunster C, Baumber L, Timms K, Gutin A, Abkevic V, Burden AD, Lanchbury J, Barker JN, Trembath RC, Nestle FO, 2007. Sequence variants in the genes for the interleukin-23 receptor (IL23R) and its ligand (IL12B) confer protection against psoriasis. *Hum Genet* 122, 201-206. [[PubMed](#)]
28. Cardoso CC, Pereira AC, Brito-de-Souza VN, Dias-Baptista IM, Maniero VC, Venturini J, Vilani-Moreno FR, de Souza FC, Ribeiro-Alves M, Sarno EN, Pacheco AG, Moraes MO, 2010. IFNG +874 T>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians. *Hum Genet* 128, 481-490. [[PubMed](#)]
29. Cargill M, Schrodi SJ, Chang M, Garcia VE, Brandon R, Callis KP, Matsunami N, Ardlie KG, Civello D, Catanese JJ, Leong DU, Panko JM, McAllister LB, Hansen CB, Papenfuss J, Prescott SM, White TJ, Leppert MF, Krueger GG, Begovich AB, 2007. A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes. *Am J Hum Genet* 80, 273-290. [[PubMed](#)]
30. Cartwright N, Demaine A, Jahromi M, Sanders H, Kaminski ER, 1999. A study of cytokine protein secretion, frequencies of cytokine expressing cells and IFN-G gene polymorphisms in normal individuals. *Transplantation* 68, 1546-1552. [[PubMed](#)]
31. Chakravarti A, 2001. To a future of genetic medicine. *Nature* 409, 822-823. [[PubMed](#)]
32. Chan JR, Blumenschein W, Murphy E, Diveu C, Wiekowski M, Abbondanzo S, Lucian L, Geissler R, Brodie S, Kimball AB, Gorman DM, Smith K, de Waal Malefyt R, Kastelein RA, McClanahan TK, Bowman EP, 2006. IL-23 stimulates epidermal hyperplasia via TNF and IL-20R2-dependent mechanisms with implications for psoriasis pathogenesis. *J Exp Med* 203, 2577-2587. [[PubMed](#)]
33. Chandran V, Raychaudhuri SP, 2010. Geoepidemiology and environmental factors of psoriasis and psoriatic arthritis. *J Autoimmun* 34, J314-321. [[PubMed](#)]
34. Chang YT, Chou CT, Yu CW, Lin MW, Shiao YM, Chen CC, Huang CH, Lee DD, Liu HN, Wang WJ, Tsai SF, 2007. Cytokine gene polymorphisms in Chinese patients with psoriasis. *Br J Dermatol* 156, 899-905. [[PubMed](#)]

35. Chatzidakis I, Mamalaki C, 2010. T cells as sources and targets of TNF: implications for immunity and autoimmunity. *Curr Dir Autoimmun* 11, 105-118. [[PubMed](#)]
36. Chaudhari U, Romano P, Mulcahy LD, Dooley LT, Baker DG, Gottlieb AB, 2001. Efficacy and safety of infliximab monotherapy for plaque-type psoriasis: a randomised trial. *Lancet* 357, 1842-1847. [[PubMed](#)]
37. Chen H, Cheng S, Wang J, Cao C, Bunjhoo H, Xiong W, Xu Y, 2012. Interleukin-12B rs3212227 polymorphism and cancer risk: a meta-analysis. *Mol Biol Rep* 39, 10235-10242. [[PubMed](#)]
38. Chen T, Liang W, Gao L, Wang Y, Liu Y, Zhang L, Zhang L, 2011. Association of single nucleotide polymorphisms in interleukin 12 (IL-12A and -B) with asthma in a Chinese population. *Hum Immunol* 72, 603-606. [[PubMed](#)]
39. Chen X, Han S, Wang S, Zhou X, Zhang M, Dong J, Shi X, Qian N, Wang X, Wei Q, Shen H, Hu Z, 2009. Interactions of IL-12A and IL-12B polymorphisms on the risk of cervical cancer in Chinese women. *Clin Cancer Res* 15, 400-405. [[PubMed](#)]
40. Chiang CH, Chuang CH, Liu SL, 2013. Transforming Growth Factor-beta1 and Tumor Necrosis Factor-alpha are Associated with Clinical Severity and Airflow Limitation of COPD in an Additive Manner. *Lung* doi: 10.1007/s00408-013-9520-2. [[PubMed](#)]
41. Collins FS, Guyer MS, Charkravarti A, 1997. Variations on a theme: cataloging human DNA sequence variation. *Science* 278, 1580-1581. [[PubMed](#)]
42. Corchado S, Marquez M, Montes de Oca M, Romero-Cores P, Fernandez-Gutierrez C, Giron-Gonzalez JA, 2013. Influence of Genetic Polymorphisms of Tumor Necrosis Factor Alpha and Interleukin 10 Genes on the Risk of Liver Cirrhosis in HIV-HCV Coinfected Patients. *PLoS One* 8, e66619. [[PubMed](#)]
43. Craven NM, Jackson CW, Kirby B, Perrey C, Pravica V, Hutchinson IV, Griffiths CE, 2001. Cytokine gene polymorphisms in psoriasis. *Br J Dermatol* 144, 849-853. [[PubMed](#)]
44. Cui G, Wang H, Li R, Zhang L, Li Z, Wang Y, Hui R, Ding H, Wang DW, 2012. Polymorphism of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) gene promoter, circulating TNF-alpha level, and cardiovascular risk factor for ischemic stroke. *J Neuroinflammation* 9, 235. [[PubMed](#)]
45. de Albuquerque AC, Rocha LQ, de Moraes Batista AH, Teixeira AB, Dos Santos DB, Nogueira NA, 2012. Association of polymorphism +874 A/T of interferon-gamma and susceptibility to the development of tuberculosis: meta-analysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31, 2887-2895. [[PubMed](#)]

46. de Oliveira ST, Maragno L, Arnone M, Fonseca Takahashi MD, Romiti R, 2010. Generalized pustular psoriasis in childhood. *Pediatr Dermatol* 27, 349-354. [[PubMed](#)]
47. Di Cesare A, Di Meglio P, Nestle FO, 2009. The IL-23/Th17 axis in the immunopathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol* 129, 1339-1350. [[PubMed](#)]
48. Drulovic J, Popadic D, Mesaros S, Dujmovic I, Cvetkovic I, Miljkovic D, Stojavljevic N, Pravica V, Pekmezovic T, Bogdanovic G, Jarebinski M, Mostarica Stojkovic M, 2003. Decreased frequency of the tumor necrosis factor alpha -308 allele in Serbian patients with multiple sclerosis. *Eur Neurol* 50, 25-29. [[PubMed](#)]
49. Eiris N, Santos-Juanes J, Coto-Segura P, Gomez J, Alvarez V, Morales B, Queiro R, Diaz M, Corao AI, Lopez-Corte K, Coto E, 2012. Resequencing of the IL12B gene in psoriasis patients with the rs6887695/rs3212227 risk genotypes. *Cytokine* 60, 27-29. [[PubMed](#)]
50. Ellis TN, Beaman BL, 2004. Interferon-gamma activation of polymorphonuclear neutrophil function. *Immunology* 112, 2-12. [[PubMed](#)]
51. Emmert-Streib F, Dehmer M, 2013. Enhancing systems medicine beyond genotype data by dynamic patient signatures: having information and using it too. *Front Genet* 4, 241. [[PubMed](#)]
52. Etokebe GE, Bulat-Kardum L, Johansen MS, Knezevic J, Balen S, Matakovic-Mileusnic N, Matanic D, Flego V, Pavelic J, Beg-Zec Z, Dembic Z, 2006. Interferon-gamma gene (T874A and G2109A) polymorphisms are associated with microscopy-positive tuberculosis. *Scand J Immunol* 63, 136-141. [[PubMed](#)]
53. Fierlbeck G, Rassner G, Muller C, 1990. Psoriasis induced at the injection site of recombinant interferon gamma. Results of immunohistologic investigations. *Arch Dermatol* 126, 351-355. [[PubMed](#)]
54. Filer C, Ho P, Smith RL, Griffiths C, Young HS, Worthington J, Bruce IN, Barton A, 2008. Investigation of association of the IL12B and IL23R genes with psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum* 58, 3705-3709. [[PubMed](#)]
55. Fredriksson T, Pettersson U, 1978. Severe psoriasis--oral therapy with a new retinoid. *Dermatologica* 157, 238-244. [[PubMed](#)]
56. Fry L, Baker BS, 2007. Triggering psoriasis: the role of infections and medications. *Clin Dermatol* 25, 606-615. [[PubMed](#)]
57. Gallo E, Cabaleiro T, Roman M, Abad-Santos F, Dauden E, 2012. [Study of genetic polymorphisms in the tumor necrosis factor alpha promoter region in Spanish patients with psoriasis]. *Actas Dermosifiliogr* 103, 301-307. [[PubMed](#)]

58. Gao QJ, Liu DW, Zhang SY, Jia M, Wang LM, Wu LH, Wang SY, Tong LX, 2009. Polymorphisms of some cytokines and chronic hepatitis B and C virus infection. *World J Gastroenterol* 15, 5610-5619. [[PubMed](#)]
59. Gao QJ, Liu DW, Zhang SY, Jia M, Wu LH, 2010. [Association between IFN-gamma+874 polymorphisms and the clinical outcomes of hepatitis B and/or hepatitis C virus infection.]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 31, 324-328. [[PubMed](#)]
60. Gelfand JM, Feldman SR, Stern RS, Thomas J, Rolstad T, Margolis DJ, 2004. Determinants of quality of life in patients with psoriasis: a study from the US population. *J Am Acad Dermatol* 51, 704-708. [[PubMed](#)]
61. Gerkowicz A, Pietrzak A, Szepietowski JC, Radej S, Chodorowska G, 2012. Biochemical markers of psoriasis as a metabolic disease. *Folia Histochem Cytobiol* 50, 155-170. [[PubMed](#)]
62. Gladman DD, Brockbank J, 2000. Psoriatic arthritis. *Expert Opin Investig Drugs* 9, 1511-1522. [[PubMed](#)]
63. Glas J, Seiderer J, Wagner J, Olszak T, Fries C, Tillack C, Friedrich M, Beigel F, Stallhofer J, Steib C, Wetzke M, Goke B, Ochsenkuhn T, Diegelmann J, Czamara D, Brand S, 2012. Analysis of IL12B gene variants in inflammatory bowel disease. *PLoS One* 7, e34349. [[PubMed](#)]
64. Govan VA, Carrara HR, Sachs JA, Hoffman M, Stanczuk GA, Williamson AL, 2003. Ethnic differences in allelic distribution of IFN-g in South African women but no link with cervical cancer. *J Carcinog* 2, 3. [[PubMed](#)]
65. Griffiths CE, Barker JN, 2007. Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *Lancet* 370, 263-271. [[PubMed](#)]
66. Grzegorzewska AE, Wobszal PM, Mostowska A, Jagodzinski PP, 2012. Antibodies to hepatitis B virus surface antigen and interleukin 12 and interleukin 18 gene polymorphisms in hemodialysis patients. *BMC Nephrol* 13, 75. [[PubMed](#)]
67. Gudjonsson JE, Karason A, Antonsdottir A, Runarsdottir EH, Hauksson VB, Upmanyu R, Gulcher J, Stefansson K, Valdimarsson H, 2003. Psoriasis patients who are homozygous for the HLA-Cw*0602 allele have a 2.5-fold increased risk of developing psoriasis compared with Cw6 heterozygotes. *Br J Dermatol* 148, 233-235. [[PubMed](#)]
68. Gudjonsson JE, Karason A, Antonsdottir AA, Runarsdottir EH, Gulcher JR, Stefansson K, Valdimarsson H, 2002. HLA-Cw6-positive and HLA-Cw6-negative patients with Psoriasis vulgaris have distinct clinical features. *J Invest Dermatol* 118, 362-365. [[PubMed](#)]

69. Gupta AK, Pandey SS, Pandey BL, 2013. Effectiveness of conventional drug therapy of plaque psoriasis in the context of consensus guidelines: a prospective observational study in 150 patients. *Ann Dermatol* 25, 156-162. [[PubMed](#)]
70. Guttman-Yassky E, Lowes MA, Fuentes-Duculan J, Zaba LC, Cardinale I, Nogales KE, Khatcherian A, Novitskaya I, Carucci JA, Bergman R, Krueger JG, 2008. Low expression of the IL-23/Th17 pathway in atopic dermatitis compared to psoriasis. *J Immunol* 181, 7420-7427. [[PubMed](#)]
71. Hamamoto Y, Tateno H, Ishida T, Muto M, 2000. Lack of association between promoter polymorphism of the tumor necrosis factor-alpha gene and psoriatic arthritis in Japanese patients. *J Invest Dermatol* 115, 1162-1164. [[PubMed](#)]
72. Han L, Song JH, Yoon JH, Park YG, Lee SW, Choi YJ, Nam SW, Lee JY, Park WS, 2012. TNF-alpha and TNF-beta Polymorphisms are Associated with Susceptibility to Osteoarthritis in a Korean Population. *Korean J Pathol* 46, 30-37. [[PubMed](#)]
73. Haralambieva IH, Ovsyannikova IG, Kennedy RB, Vierkant RA, Pankratz VS, Jacobson RM, Poland GA, 2011. Associations between single nucleotide polymorphisms and haplotypes in cytokine and cytokine receptor genes and immunity to measles vaccination. *Vaccine* 29, 7883-7895. [[PubMed](#)]
74. Hedrick MN, Lonsdorf AS, Shirakawa AK, Richard Lee CC, Liao F, Singh SP, Zhang HH, Grinberg A, Love PE, Hwang ST, Farber JM, 2009. CCR6 is required for IL-23-induced psoriasis-like inflammation in mice. *J Clin Invest* 119, 2317-2329. [[PubMed](#)]
75. Henseler T, Christophers E, 1985. Psoriasis of early and late onset: characterization of two types of psoriasis vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 13, 450-456. [[PubMed](#)]
76. Hoffmann SC, Stanley EM, Darrin Cox E, Craighead N, DiMercurio BS, Koziol DE, Harlan DM, Kirk AD, Blair PJ, 2001. Association of cytokine polymorphic inheritance and in vitro cytokine production in anti-CD3/CD28-stimulated peripheral blood lymphocytes. *Transplantation* 72, 1444-1450. [[PubMed](#)]
77. Hohler T, Grossmann S, Stradmann-Bellinghausen B, Kaluza W, Reuss E, de Vlam K, Veys E, Marker-Hermann E, 2002. Differential association of polymorphisms in the TNFalpha region with psoriatic arthritis but not psoriasis. *Ann Rheum Dis* 61, 213-218. [[PubMed](#)]
78. Huber AK, Jacobson EM, Jazdzewski K, Concepcion ES, Tomer Y, 2008. Interleukin (IL)-23 receptor is a major susceptibility gene for Graves' ophthalmopathy: the IL-23/T-helper 17 axis extends to thyroid autoimmunity. *J Clin Endocrinol Metab* 93, 1077-1081. [[PubMed](#)]

79. Huffmeier U, Lascorz J, Becker T, Schurmeier-Horst F, Magener A, Ekici AB, Ende S, Thiel CT, Thoma-Uszynski S, Mossner R, Reich K, Kurrat W, Wienker TF, Traupe H, Reis A, 2009. Characterisation of psoriasis susceptibility locus 6 (PSORS6) in patients with early onset psoriasis and evidence for interaction with PSORS1. *J Med Genet* 46, 736-744. [[PubMed](#)]
80. Huffmeier U, Uebe S, Ekici AB, Bowes J, Giardina E, Korendowych E, Juneblad K, Apel M, McManus R, Ho P, Bruce IN, Ryan AW, Behrens F, Lascorz J, Bohm B, Traupe H, Lohmann J, Gieger C, Wichmann HE, Herold C, Steffens M, Klareskog L, Wienker TF, Fitzgerald O, Alenius GM, McHugh NJ, Novelli G, Burkhardt H, Barton A, Reis A, 2010. Common variants at TRAF3IP2 are associated with susceptibility to psoriatic arthritis and psoriasis. *Nat Genet* 42, 996-999. [[PubMed](#)]
81. Hutchings A, Guay-Woodford L, Thomas JM, Young CJ, Purcell WM, Pravica V, Perrey C, Hutchinson IV, Benfield MR, 2002. Association of cytokine single nucleotide polymorphisms with B7 costimulatory molecules in kidney allograft recipients. *Pediatr Transplant* 6, 69-77. [[PubMed](#)]
82. Hvid H, Teige I, Kvist PH, Svensson L, Kemp K, 2008. TPA induction leads to a Th17-like response in transgenic K14/VEGF mice: a novel in vivo screening model of psoriasis. *Int Immunol* 20, 1097-1106. [[PubMed](#)]
83. Iwakura Y, Ishigame H, 2006. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest* 116, 1218-1222. [[PubMed](#)]
84. Jacobi A, Manger B, Schuler G, Hertl M, 2003. [Therapeutic application of TNF-alpha inhibitors infliximab and etanercept in inflammatory skin disorders]. *J Dtsch Dermatol Ges* 1, 259-272. [[PubMed](#)]
85. Jang WC, Nam YH, Ahn YC, Lee SH, Park SH, Choe JY, Lee SS, Kim SK, 2008. Interleukin-17F gene polymorphisms in Korean patients with Behcet's disease. *Rheumatol Int* 29, 173-178. [[PubMed](#)]
86. Johnson-Huang LM, Lowes MA, Krueger JG, 2012. Putting together the psoriasis puzzle: an update on developing targeted therapies. *Dis Model Mech* 5, 423-433. [[PubMed](#)]
87. Kanaan Z, Ahmad S, Bilchuk N, Vahrenhold C, Pan J, Galandiuk S, 2012. Perianal Crohn's disease: predictive factors and genotype-phenotype correlations. *Dig Surg* 29, 107-114. [[PubMed](#)]
88. Kane D, FitzGerald O, 2004. Tumor necrosis factor-alpha in psoriasis and psoriatic arthritis: a clinical, genetic, and histopathologic perspective. *Curr Rheumatol Rep* 6, 292-298. [[PubMed](#)]

89. Kanelleas A, Liapi C, Katoulis A, Stavropoulos P, Avgerinou G, Georgala S, Economopoulos T, Stavrianeas NG, Katsambas A, 2011. The role of inflammatory markers in assessing disease severity and response to treatment in patients with psoriasis treated with etanercept. *Clin Exp Dermatol* 36, 845-850. [[PubMed](#)]
90. Kastelein RA, Hunter CA, Cua DJ, 2007. Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation. *Annu Rev Immunol* 25, 221-242. [[PubMed](#)]
91. Kawaguchi M, Takahashi D, Hizawa N, Suzuki S, Matsukura S, Kokubu F, Maeda Y, Fukui Y, Konno S, Huang SK, Nishimura M, Adachi M, 2006. IL-17F sequence variant (His161Arg) is associated with protection against asthma and antagonizes wild-type IL-17F activity. *J Allergy Clin Immunol* 117, 795-801. [[PubMed](#)]
92. Kikly K, Liu L, Na S, Sedgwick JD, 2006. The IL-23/Th(17) axis: therapeutic targets for autoimmune inflammation. *Curr Opin Immunol* 18, 670-675. [[PubMed](#)]
93. Kim HS, Kim I, Kim JO, Bae JS, Shin HD, Bae SC, 2009. No association between interleukin 23 receptor gene polymorphisms and systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* 30, 33-38. [[PubMed](#)]
94. Kim K, Cho SK, Sestak A, Namjou B, Kang C, Bae SC, 2010. Interferon-gamma gene polymorphisms associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 69, 1247-1250. [[PubMed](#)]
95. Kim TG, Pyo CW, Hur SS, Kim YK, Hwang HY, Youn JI, Kim TY, 2003. Polymorphisms of tumor necrosis factor (TNF) alpha and beta genes in Korean patients with psoriasis. *Arch Dermatol Res* 295, 8-13. [[PubMed](#)]
96. Kim YK, Pyo CW, Choi HB, Kim SY, Kim TY, Kim TG, 2007. Associations of IL-2 and IL-4 gene polymorphisms with psoriasis in the Korean population. *J Dermatol Sci* 48, 133-139. [[PubMed](#)]
97. Kimkong I, Nakkuntod J, Sodsai P, Hirankarn N, Kitkumthorn N, 2012. Association of interferon-gamma gene polymorphisms with susceptibility to oral lichen planus in the Thai population. *Arch Oral Biol* 57, 491-494. [[PubMed](#)]
98. Krueger GG, Langley RG, Leonardi C, Yeilding N, Guzzo C, Wang Y, Dooley LT, Lebwohl M, Group CPS, 2007. A human interleukin-12/23 monoclonal antibody for the treatment of psoriasis. *N Engl J Med* 356, 580-592. [[PubMed](#)]
99. Kupetsky EA, Mathers AR, Ferris LK, 2013. Anti-cytokine therapy in the treatment of psoriasis. *Cytokine* 61, 704-712. [[PubMed](#)]

100. Kurd SK, Gelfand JM, 2009. The prevalence of previously diagnosed and undiagnosed psoriasis in US adults: results from NHANES 2003-2004. *J Am Acad Dermatol* 60, 218-224. [[PubMed](#)]
101. LaFramboise T, 2009. Single nucleotide polymorphism arrays: a decade of biological, computational and technological advances. *Nucleic Acids Res* 37, 4181-4193. [[PubMed](#)]
102. Laggner U, Di Meglio P, Perera GK, Hundhausen C, Lacy KE, Ali N, Smith CH, Hayday AC, Nickoloff BJ, Nestle FO, 2011. Identification of a novel proinflammatory human skin-homing Vgamma9Vdelta2 T cell subset with a potential role in psoriasis. *J Immunol* 187, 2783-2793. [[PubMed](#)]
103. Lappalainen M, Halme L, Turunen U, Saavalainen P, Einarsdottir E, Farkkila M, Kontula K, Paavola-Sakki P, 2008. Association of IL23R, TNFRSF1A, and HLA-DRB1*0103 allele variants with inflammatory bowel disease phenotypes in the Finnish population. *Inflamm Bowel Dis* 14, 1118-1124. [[PubMed](#)]
104. Larcombe LA, Orr PH, Lodge AM, Brown JS, Dembinski IJ, Milligan LC, Larcombe EA, Martin BD, Nickerson PW, 2008. Functional gene polymorphisms in canadian aboriginal populations with high rates of tuberculosis. *J Infect Dis* 198, 1175-1179. [[PubMed](#)]
105. Lee HC, Chang TY, Yeung CY, Chan WT, Jiang CB, Chen WF, Chan HW, Liu HF, Lin M, Lee YJ, 2010. Association of interferon-gamma gene polymorphisms in Taiwanese children with biliary atresia. *J Clin Immunol* 30, 68-73. [[PubMed](#)]
106. Lee YH, Song GG, 2013. Associations between interleukin-23R and interleukin-12B polymorphisms and psoriasis susceptibility: a meta-analysis. *Immunol Invest* 42, 726-736. [[PubMed](#)]
107. Li C, Wang G, Gao Y, Liu L, Gao T, 2007. TNF-alpha gene promoter -238G>A and -308G>A polymorphisms alter risk of psoriasis vulgaris: a meta-analysis. *J Invest Dermatol* 127, 1886-1892. [[PubMed](#)]
108. Li J, Chen X, Liu Z, Yue Q, Liu H, 2007. Expression of Th17 cytokines in skin lesions of patients with psoriasis. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 27, 330-332. [[PubMed](#)]
109. Li WH, Sadler LA, 1991. Low nucleotide diversity in man. *Genetics* 129, 513-523. [[PubMed](#)]
110. Liao PB, Rubinson R, Howard R, Sanchez G, Frieden IJ, 2002. Annular pustular psoriasis--most common form of pustular psoriasis in children: report of three cases and review of the literature. *Pediatr Dermatol* 19, 19-25. [[PubMed](#)]

111. Lin AM, Rubin CJ, Khandpur R, Wang JY, Riblett M, Yalavarthi S, Villanueva EC, Shah P, Kaplan MJ, Bruce AT, 2011. Mast cells and neutrophils release IL-17 through extracellular trap formation in psoriasis. *J Immunol* 187, 490-500. [[PubMed](#)]
112. Liu Y, Helms C, Liao W, Zaba LC, Duan S, Gardner J, Wise C, Miner A, Malloy MJ, Pullinger CR, Kane JP, Saccone S, Worthington J, Bruce I, Kwok PY, Menter A, Krueger J, Barton A, Saccone NL, Bowcock AM, 2008. A genome-wide association study of psoriasis and psoriatic arthritis identifies new disease loci. *PLoS Genet* 4, e1000041. [[PubMed](#)]
113. Lowes MA, Bowcock AM, Krueger JG, 2007. Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature* 445, 866-873. [[PubMed](#)]
114. Lowes MA, Kikuchi T, Fuentes-Duculan J, Cardinale I, Zaba LC, Haider AS, Bowman EP, Krueger JG, 2008. Psoriasis vulgaris lesions contain discrete populations of Th1 and Th17 T cells. *J Invest Dermatol* 128, 1207-1211. [[PubMed](#)]
115. Lowes MA, Suarez-Farinas M, Krueger JG, 2014. Immunology of psoriasis. *Annu Rev Immunol* 32, 227-255. [[PubMed](#)]
116. Lucka TC, Pathirana D, Sammain A, Bachmann F, Rosumeck S, Erdmann R, Schmitt J, Orawa H, Rzany B, Nast A, 2012. Efficacy of systemic therapies for moderate-to-severe psoriasis: a systematic review and meta-analysis of long-term treatment. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 26, 1331-1344. [[PubMed](#)]
117. Ma HL, Napierata L, Stedman N, Benoit S, Collins M, Nickerson-Nutter C, Young DA, 2010. Tumor necrosis factor alpha blockade exacerbates murine psoriasis-like disease by enhancing Th17 function and decreasing expansion of Treg cells. *Arthritis Rheum* 62, 430-440. [[PubMed](#)]
118. Ma X, Reich RA, Gonzalez O, Pan X, Fothergill AK, Starke JR, Teeter LD, Musser JM, Graviss EA, 2003. No evidence for association between the polymorphism in the 3' untranslated region of interleukin-12B and human susceptibility to tuberculosis. *J Infect Dis* 188, 1116-1118. [[PubMed](#)]
119. Magalhaes RF, Biral AC, Pancoto JA, Donadi EA, Mendes CT, Jr., Magna LA, Kraemer MH, 2010. Human leukocyte antigen (HLA) and single nucleotide polymorphisms (SNPs) tumor necrosis factor (TNF)-alpha -238 and -308 as genetic markers of susceptibility to psoriasis and severity of the disease in a long-term follow-up Brazilian study. *Int J Dermatol* 49, 1133-1140. [[PubMed](#)]
120. Marquez A, Mendoza JL, Taxonera C, Diaz-Rubio M, De La Concha EG, Urcelay E, Martinez A, 2008. IL23R and IL12B polymorphisms in Spanish IBD patients: no evidence of interaction. *Inflamm Bowel Dis* 14, 1192-1196. [[PubMed](#)]

121. Mattei PL, Corey KC, Kimball AB, 2013. Psoriasis Area Severity Index (PASI) and the Dermatology Life Quality Index (DLQI): the correlation between disease severity and psychological burden in patients treated with biological therapies. *J Eur Acad Dermatol Venereol* doi: 10.1111/jdv.12106. [[PubMed](#)]
122. McKenzie RC, Sabin E, Szepietowski JC, Gracie JA, Forsey RJ, Howie S, 2003. Interferon gamma in keratinocytes in psoriasis. *Eur J Dermatol* 13, 315-316. [[PubMed](#)]
123. Mihailova S, Ivanova M, Mihaylova A, Quin L, Mikova O, Naumova E, 2005. Pro- and anti-inflammatory cytokine gene polymorphism profiles in Bulgarian multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol* 168, 138-143. [[PubMed](#)]
124. Mizutani H, Yamanaka K, Konishi H, Murakami T, 2003. Animal models of psoriasis and pustular psoriasis. *Arch Dermatol Res* 295 Suppl 1, S67-68. [[PubMed](#)]
125. Morris GA, Edwards DR, Hill PC, Wejse C, Bisseye C, Olesen R, Edwards TL, Gilbert JR, Myers JL, Stryjewski ME, Abbate E, Estevan R, Hamilton CD, Tacconelli A, Novelli G, Brunetti E, Aaby P, Sodemann M, Ostergaard L, Adegbola R, Williams SM, Scott WK, Sirugo G, 2011. Interleukin 12B (IL12B) genetic variation and pulmonary tuberculosis: a study of cohorts from The Gambia, Guinea-Bissau, United States and Argentina. *PLoS One* 6, e16656. [[PubMed](#)]
126. Mosaad YM, Soliman OE, Tawhid ZE, Sherif DM, 2010. Interferon-gamma +874 T/A and interleukin-10 -1082 A/G single nucleotide polymorphism in Egyptian children with tuberculosis. *Scand J Immunol* 72, 358-364. [[PubMed](#)]
127. Mossner R, Kingo K, Kleensang A, Kruger U, Konig IR, Silm H, Westphal GA, Reich K, 2005. Association of TNF -238 and -308 promoter polymorphisms with psoriasis vulgaris and psoriatic arthritis but not with pustulosis palmoplantaris. *J Invest Dermatol* 124, 282-284. [[PubMed](#)]
128. Moura E, Mattar R, de Souza E, Torloni MR, Goncalves-Primo A, Daher S, 2009. Inflammatory cytokine gene polymorphisms and spontaneous preterm birth. *J Reprod Immunol* 80, 115-121. [[PubMed](#)]
129. Mueller W, Herrmann B, 1979. Cyclosporin A for psoriasis. *N Engl J Med* 301, 555. [[PubMed](#)]
130. Nair RP, Duffin KC, Helms C, Ding J, Stuart PE, Goldgar D, Gudjonsson JE, Li Y, Tejasvi T, Feng BJ, Ruether A, Schreiber S, Weichenthal M, Gladman D, Rahman P, Schrodi SJ, Prahalad S, Guthery SL, Fischer J, Liao W, Kwok PY, Menter A, Lathrop GM, Wise CA, Begovich AB, Voorhees JJ, Elder JT, Krueger GG, Bowcock AM, Abecasis GR, Collaborative Association Study of P, 2009. Genome-wide scan reveals association of psoriasis with IL-23 and NF-kappaB pathways. *Nat Genet* 41, 199-204. [[PubMed](#)]

131. Nair RP, Ruether A, Stuart PE, Jenisch S, Tejasvi T, Hiremagalore R, Schreiber S, Kabelitz D, Lim HW, Voorhees JJ, Christophers E, Elder JT, Weichenthal M, 2008. Polymorphisms of the IL12B and IL23R genes are associated with psoriasis. *J Invest Dermatol* 128, 1653-1661. [[PubMed](#)]
132. Nair RP, Stuart PE, Kullavanijaya P, Kullavanijaya P, Tejasvi T, Voorhees JJ, Elder JT, 2010. Genetic evidence for involvement of the IL23 pathway in Thai psoriatics. *Arch Dermatol Res* 302, 139-143. [[PubMed](#)]
133. Nakajima K, 2012. Critical role of the interleukin-23/T-helper 17 cell axis in the pathogenesis of psoriasis. *J Dermatol* 39, 219-224. [[PubMed](#)]
134. Nakajima K, Kanda T, Takaishi M, Shiga T, Miyoshi K, Nakajima H, Kamijima R, Tarutani M, Benson JM, Elloso MM, Gutshall LL, Naso MF, Iwakura Y, DiGiovanni J, Sano S, 2011. Distinct roles of IL-23 and IL-17 in the development of psoriasis-like lesions in a mouse model. *J Immunol* 186, 4481-4489. [[PubMed](#)]
135. Naldi L, 2010. Scoring and monitoring the severity of psoriasis. What is the preferred method? What is the ideal method? Is PASI passe? facts and controversies. *Clin Dermatol* 28, 67-72. [[PubMed](#)]
136. Navratilova Z, Gallo J, Mrazek F, Petrek M, 2012. Genetic variation in key molecules of the Th-17 immune response is not associated with risk for prosthetic joint infection in a Czech population. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 156, 248-252. [[PubMed](#)]
137. Nedoszytko B, Szczerkowska-Dobosz A, Zablotna M, Glen J, Rebala K, Roszkiewicz J, 2007. Associations of promoter region polymorphisms in the tumour necrosis factor-alpha gene and early-onset psoriasis vulgaris in a northern Polish population. *Br J Dermatol* 157, 165-167. [[PubMed](#)]
138. Nestle FO, Kaplan DH, Barker J, 2009. Psoriasis. *N Engl J Med* 361, 496-509. [[PubMed](#)]
139. Nestle FO, Nickoloff BJ, 2005. From classical mouse models of psoriasis to a spontaneous xenograft model featuring use of AGR mice. *Ernst Schering Res Found Workshop* doi, 203-212. [[PubMed](#)]
140. Nickoloff BJ, 1999. Animal models of psoriasis. *Expert Opin Investig Drugs* 8, 393-401. [[PubMed](#)]
141. Nishibu A, Oyama N, Nakamura K, Kaneko F, 2002. Lack of association of TNF-238A and -308A in Japanese patients with psoriasis vulgaris, psoriatic arthritis and generalized pustular psoriasis. *J Dermatol Sci* 29, 181-184. [[PubMed](#)]

142. Nishimoto S, Kotani H, Tsuruta S, Shimizu N, Ito M, Shichita T, Morita R, Takahashi H, Amagai M, Yoshimura A, 2013. Th17 cells carrying TCR recognizing epidermal autoantigen induce psoriasis-like skin inflammation. *J Immunol* 191, 3065-3072. [[PubMed](#)]
143. Nograles KE, Davidovici B, Krueger JG, 2010. New insights in the immunologic basis of psoriasis. *Semin Cutan Med Surg* 29, 3-9. [[PubMed](#)]
144. O'Shea JJ, Ma A, Lipsky P, 2002. Cytokines and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2, 37-45. [[PubMed](#)]
145. Ohman H, Bailey R, Natividad A, Ragoussis J, Johnson LL, Tiitinen A, Halttunen M, Paavonen J, Surcel HM, 2012. Effect of IL12A and IL12B polymorphisms on the risk of Chlamydia trachomatis-induced tubal factor infertility and disease severity. *Hum Reprod* 27, 2217-2223. [[PubMed](#)]
146. Oka A, Mabuchi T, Ikeda S, Terui T, Haida Y, Ozawa A, Yatsu K, Kulski JK, Inoko H, 2013. IL12B and IL23R gene SNPs in Japanese psoriasis. *Immunogenetics* 65, 823-828. [[PubMed](#)]
147. Oka A, Mabuchi T, Ozawa A, Inoko H, 2012. Current understanding of human genetics and genetic analysis of psoriasis. *J Dermatol* 39, 231-241. [[PubMed](#)]
148. Parisi R, Symmons DP, Griffiths CE, Ashcroft DM, Identification, Management of P, Associated Comorbidity project t, 2013. Global epidemiology of psoriasis: a systematic review of incidence and prevalence. *J Invest Dermatol* 133, 377-385. [[PubMed](#)]
149. Park JH, Kim YJ, Park BL, Bae JS, Shin HD, Bae SC, 2009. Lack of association between interleukin 23 receptor gene polymorphisms and rheumatoid arthritis susceptibility. *Rheumatol Int* 29, 781-786. [[PubMed](#)]
150. Parkes M, Barrett JC, Prescott NJ, Tremelling M, Anderson CA, Fisher SA, Roberts RG, Nimmo ER, Cummings FR, Soars D, Drummond H, Lees CW, Khawaja SA, Bagnall R, Burke DA, Todhunter CE, Ahmad T, Onnie CM, McArdle W, Strachan D, Bethel G, Bryan C, Lewis CM, Deloukas P, Forbes A, Sanderson J, Jewell DP, Satsangi J, Mansfield JC, Wellcome Trust Case Control C, Cardon L, Mathew CG, 2007. Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat Genet* 39, 830-832. [[PubMed](#)]
151. Perera GK, Di Meglio P, Nestle FO, 2012. Psoriasis. *Annu Rev Pathol* 7, 385-422. [[PubMed](#)]
152. Pietrzak A, Michalak-Stoma A, Chodorowska G, Szepietowski JC, 2010. Lipid disturbances in psoriasis: an update. *Mediators Inflamm* 2010. [[PubMed](#)]

153. Poli F, Nocco A, Berra S, Scalamogna M, Taioli E, Longhi E, Sirchia G, 2002. Allele frequencies of polymorphisms of TNFA, IL-6, IL-10 and IFNG in an Italian Caucasian population. *Eur J Immunogenet* 29, 237-240. [[PubMed](#)]
154. Popadic D, Savic E, Spuran Z, Markovic M, Mostarica Stojkovic M, Ramic Z, Pravica V, 2012. Distinctive frequencies of +874T/A IFN-gamma gene polymorphism in a healthy Serbian population. *Clin Transl Sci* 5, 461-463. [[PubMed](#)]
155. Popadic S, Ramic Z, Medenica Lj, Pravica V, Popadic D, 2014. IL-23R gene polymorphism rs2201841 is associated with psoriatic arthritis. *Int J Immunogenet* doi: 10.1111/iji.12127. [[PubMed](#)]
156. Prabhu Anand S, Selvaraj P, Jawahar MS, Adhilakshmi AR, Narayanan PR, 2007. Interleukin-12B & interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis. *Indian J Med Res* 126, 135-138. [[PubMed](#)]
157. Pravica V, Asderakis A, Perrey C, Hajeer A, Sinnott PJ, Hutchinson IV, 1999. In vitro production of IFN-gamma correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN-gamma gene. *Eur J Immunogenet* 26, 1-3. [[PubMed](#)]
158. Pravica V, Perrey C, Stevens A, Lee JH, Hutchinson IV, 2000. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production. *Hum Immunol* 61, 863-866. [[PubMed](#)]
159. Puig L, Carrascosa JM, Carretero G, de la Cueva P, Lafuente-Urrez RF, Belinchon I, Sanchez-Regana M, Garcia-Bustinduy M, Ribera M, Alsina M, Ferrandiz C, Fonseca E, Garcia-Patos V, Herrera E, Lopez-Estebarez JL, Marron SE, Moreno JC, Notario J, Rivera R, Rodriguez-Cerdeira C, Romero A, Ruiz-Villaverde R, Taberner R, Vidal D, Spanish Psoriasis Group of the Spanish Academy of D, Venereology, 2013. Spanish evidence-based guidelines on the treatment of psoriasis with biologic agents, 2013. Part 1: on efficacy and choice of treatment. *Actas Dermosifiliogr* 104, 694-709. [[PubMed](#)]
160. Puzenat E, Bronsard V, Prey S, Gourraud PA, Aractingi S, Bagot M, Cribier B, Joly P, Jullien D, Le Maitre M, Paul C, Richard-Lallemand MA, Ortonne JP, Aubin F, 2010. What are the best outcome measures for assessing plaque psoriasis severity? A systematic review of the literature. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 24 Suppl 2, 10-16. [[PubMed](#)]
161. Qidwai T, Khan F, 2011. Tumour necrosis factor gene polymorphism and disease prevalence. *Scand J Immunol* 74, 522-547. [[PubMed](#)]
162. Qureshi AA, Choi HK, Setty AR, Curhan GC, 2009. Psoriasis and the risk of diabetes and hypertension: a prospective study of US female nurses. *Arch Dermatol* 145, 379-382. [[PubMed](#)]

163. Rahman P, Inman RD, Gladman DD, Reeve JP, Peddle L, Maksymowych WP, 2008. Association of interleukin-23 receptor variants with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 58, 1020-1025. [[PubMed](#)]
164. Rahman P, Siannis F, Butt C, Farewell V, Peddle L, Pellett F, Gladman D, 2006. TNFalpha polymorphisms and risk of psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis* 65, 919-923. [[PubMed](#)]
165. Reich K, Huffmeier U, Konig IR, Lascorz J, Lohmann J, Wendler J, Traupe H, Mossner R, Reis A, Burkhardt H, 2007. TNF polymorphisms in psoriasis: association of psoriatic arthritis with the promoter polymorphism TNF*-857 independent of the PSORS1 risk allele. *Arthritis Rheum* 56, 2056-2064. [[PubMed](#)]
166. Reich K, Mossner R, Konig IR, Westphal G, Ziegler A, Neumann C, 2002. Promoter polymorphisms of the genes encoding tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta are associated with different subtypes of psoriasis characterized by early and late disease onset. *J Invest Dermatol* 118, 155-163. [[PubMed](#)]
167. Reid-Lombardo KM, Petersen GM, 2010. Understanding genetic epidemiologic association studies Part 1: fundamentals. *Surgery* 147, 469-474. [[PubMed](#)]
168. Risch N, 2001. The genetic epidemiology of cancer: interpreting family and twin studies and their implications for molecular genetic approaches. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10, 733-741. [[PubMed](#)]
169. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, Sherry S, Mullikin JC, Mortimore BJ, Willey DL, Hunt SE, Cole CG, Coggill PC, Rice CM, Ning Z, Rogers J, Bentley DR, Kwok PY, Mardis ER, Yeh RT, Schultz B, Cook L, Davenport R, Dante M, Fulton L, Hillier L, Waterston RH, McPherson JD, Gilman B, Schaffner S, Van Etten WJ, Reich D, Higgins J, Daly MJ, Blumenstiel B, Baldwin J, Stange-Thomann N, Zody MC, Linton L, Lander ES, Altshuler D, International SNPMPWG, 2001. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 409, 928-933. [[PubMed](#)]
170. Safrany E, Hobor R, Jakab L, Tarr T, Csongei V, Jaromi L, Sipeky C, Valasek A, Zeher M, Fust G, Czirjak L, Melegh B, 2010. Interleukin-23 receptor gene variants in Hungarian systemic lupus erythematosus patients. *Inflamm Res* 59, 159-164. [[PubMed](#)]
171. Safrany E, Szell M, Csongei V, Jaromi L, Sipeky C, Szabo T, Kemeny L, Nagy J, Melegh B, 2011. Polymorphisms of the IL23R gene are associated with psoriasis but not with immunoglobulin A nephropathy in a Hungarian population. *Inflammation* 34, 603-608. [[PubMed](#)]

172. Sallakci N, Coskun M, Berber Z, Gurkan F, Kocamaz H, Uysal G, Bhuj S, Yavuzer U, Singh M, Yegin O, 2007. Interferon-gamma gene+874T-A polymorphism is associated with tuberculosis and gamma interferon response. *Tuberculosis (Edinb)* 87, 225-230. [[PubMed](#)]
173. Sandhya P, Danda S, Danda D, Lonarkar S, Luke SS, Sinha S, Joseph G, 2013. Tumour necrosis factor (TNF)-alpha-308 gene polymorphism in Indian patients with Takayasu's arteritis - a pilot study. *Indian J Med Res* 137, 749-752. [[PubMed](#)]
174. Scarpa R, Ayala F, Caporaso N, Olivieri I, 2006. Psoriasis, psoriatic arthritis, or psoriatic disease? *J Rheumatol* 33, 210-212. [[PubMed](#)]
175. Schmitt J, Wozel G, 2005. The psoriasis area and severity index is the adequate criterion to define severity in chronic plaque-type psoriasis. *Dermatology* 210, 194-199. [[PubMed](#)]
176. Settin A, Hassan H, El-Baz R, Hassan T, 2009. Association of cytokine gene polymorphisms with psoriasis in cases from the Nile Delta of Egypt. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat* 18, 105-112. [[PubMed](#)]
177. Shen C, Jiao WW, Feng WX, Wu XR, Xiao J, Miao Q, Sun L, Wang BB, Wang J, Liu F, Shen D, Shen AD, 2013. IFNG polymorphisms are associated with tuberculosis in Han Chinese pediatric female population. *Mol Biol Rep* 40, 5477-5482. [[PubMed](#)]
178. Shibata S, Saeki H, Tsunemi Y, Kato T, Nakamura K, Kakinuma T, Kagami S, Fujita H, Tada Y, Sugaya M, Tamaki K, 2009. IL-17F single nucleotide polymorphism is not associated with psoriasis vulgaris or atopic dermatitis in the Japanese population. *J Dermatol Sci* 53, 163-165. [[PubMed](#)]
179. Shukla RK, Kant S, Bhattacharya S, Mittal B, 2012. Association of cytokine gene polymorphisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Oman Med J* 27, 285-290. [[PubMed](#)]
180. Smith AJ, Humphries SE, 2009. Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality. *Cytokine Growth Factor Rev* 20, 43-59. [[PubMed](#)]
181. Smith RL, Warren RB, Eyre S, Ho P, Ke X, Young HS, Griffiths CE, Worthington J, 2008. Polymorphisms in the IL-12beta and IL-23R genes are associated with psoriasis of early onset in a UK cohort. *J Invest Dermatol* 128, 1325-1327. [[PubMed](#)]
182. Stern RS, Nijsten T, Feldman SR, Margolis DJ, Rolstad T, 2004. Psoriasis is common, carries a substantial burden even when not extensive, and is associated with widespread treatment dissatisfaction. *J Invest Dermatol Symp Proc* 9, 136-139. [[PubMed](#)]

183. Stoneking M, 2001. Single nucleotide polymorphisms. From the evolutionary past. *Nature* 409, 821-822. [[PubMed](#)]
184. Sweeney CM, Tobin AM, Kirby B, 2011. Innate immunity in the pathogenesis of psoriasis. *Arch Dermatol Res* 303, 691-705. [[PubMed](#)]
185. Szabo M, Safrany E, Pazar B, Melegh BI, Kisfali P, Poor G, Figler M, Szekanecz Z, Czirjak L, Melegh B, 2013. Marked diversity of IL23R gene haplotype variants in rheumatoid arthritis comparing with Crohn's disease and ankylosing spondylitis. *Mol Biol Rep* 40, 359-363. [[PubMed](#)]
186. Tangwattanachuleeporn M, Sodsai P, Avihingsanon Y, Wongpiyabovorn J, Wongchinsri J, Hirankarn N, 2007. Association of interferon-gamma gene polymorphism (+874A) with arthritis manifestation in SLE. *Clin Rheumatol* 26, 1921-1924. [[PubMed](#)]
187. Taudorf S, Krabbe KS, Berg RM, Moller K, Pedersen BK, Bruunsgaard H, 2008. Common studied polymorphisms do not affect plasma cytokine levels upon endotoxin exposure in humans. *Clin Exp Immunol* 152, 147-152. [[PubMed](#)]
188. Tonel G, Conrad C, Laggner U, Di Meglio P, Grys K, McClanahan TK, Blumenschein WM, Qin JZ, Xin H, Oldham E, Kastelein R, Nickoloff BJ, Nestle FO, 2010. Cutting edge: A critical functional role for IL-23 in psoriasis. *J Immunol* 185, 5688-5691. [[PubMed](#)]
189. Tso HW, Ip WK, Chong WP, Tam CM, Chiang AK, Lau YL, 2005. Association of interferon gamma and interleukin 10 genes with tuberculosis in Hong Kong Chinese. *Genes Immun* 6, 358-363. [[PubMed](#)]
190. Tsunemi Y, Nishibu A, Saeki H, Oyama N, Nakamura K, Kishimoto M, Mitsui H, Tada Y, Torii H, Komine M, Asahina A, Kaneko F, Tamaki K, 2003. Lack of association between the promoter polymorphisms at positions -308 and -238 of the tumor necrosis factor alpha gene and psoriasis vulgaris in Japanese patients. *Dermatology* 207, 371-374. [[PubMed](#)]
191. Tsunemi Y, Saeki H, Nakamura K, Sekiya T, Hirai K, Fujita H, Asano N, Kishimoto M, Tanida Y, Kakinuma T, Mitsui H, Tada Y, Wakugawa M, Torii H, Komine M, Asahina A, Tamaki K, 2002. Interleukin-12 p40 gene (IL12B) 3'-untranslated region polymorphism is associated with susceptibility to atopic dermatitis and psoriasis vulgaris. *J Dermatol Sci* 30, 161-166. [[PubMed](#)]
192. Ulger M, Emekdas G, Aslan G, Tas D, Ilvan A, Tezcan S, Calikoglu M, Erdal ME, Kartaloglu Z, 2013. [Determination of the cytokine gene polymorphism and genetic susceptibility in tuberculosis patients]. *Mikrobiyol Bul* 47, 250-264. [[PubMed](#)]
193. van Beelen AJ, Teunissen MB, Kapsenberg ML, de Jong EC, 2007. Interleukin-17 in inflammatory skin disorders. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 7, 374-381. [[PubMed](#)]

194. van der Fits L, Mourits S, Voerman JS, Kant M, Boon L, Laman JD, Cornelissen F, Mus AM, Florencia E, Prens EP, Lubberts E, 2009. Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. *J Immunol* 182, 5836-5845. [[PubMed](#)]
195. Veal CD, Capon F, Allen MH, Heath EK, Evans JC, Jones A, Patel S, Burden D, Tillman D, Barker JN, Trembath RC, 2002. Family-based analysis using a dense single-nucleotide polymorphism-based map defines genetic variation at PSORS1, the major psoriasis-susceptibility locus. *Am J Hum Genet* 71, 554-564. [[PubMed](#)]
196. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di Francesco V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nusskern D, Rusch DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng ML, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferriera S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkoch C, Pratts E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers YH, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigo R, Campbell MJ, Sjolander KV, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yooseph S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang YH, Coyne M, Dahlke C, Mays A, Dombroski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, Nodell M, Pan S, Peck J, Peterson M, Rowe W, Sanders R, Scott J, Simpson M, Smith T, Sprague A, Stockwell T, Turner R, Venter E, Wang M, Wen M, Wu D, Wu M, Xia A, Zandieh A, Zhu X, 2001. The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304-1351. [[PubMed](#)]

197. Villablanca EJ, Mora JR, 2008. A two-step model for Langerhans cell migration to skin-draining LN. *Eur J Immunol* 38, 2975-2980. [[PubMed](#)]
198. Vujanovic NL, 2011. Role of TNF superfamily ligands in innate immunity. *Immunol Res* 50, 159-174. [[PubMed](#)]
199. Wagner EF, Schonthaler HB, Guinea-Viniegra J, Tschachler E, 2010. Psoriasis: what we have learned from mouse models. *Nat Rev Rheumatol* 6, 704-714. [[PubMed](#)]
200. Wang D, Feng JQ, Li YY, Zhang DF, Li XA, Li QW, Yao YG, 2012. Genetic variants of the MRC1 gene and the IFNG gene are associated with leprosy in Han Chinese from Southwest China. *Hum Genet* 131, 1251-1260. [[PubMed](#)]
201. Watanabe H, Kawaguchi M, Fujishima S, Ogura M, Matsukura S, Takeuchi H, Ohba M, Sueki H, Kokubu F, Hizawa N, Adachi M, Huang SK, Iijima M, 2009. Functional characterization of IL-17F as a selective neutrophil attractant in psoriasis. *J Invest Dermatol* 129, 650-656. [[PubMed](#)]
202. Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AI, Duff GW, 1992. Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. *Hum Mol Genet* 1, 353. [[PubMed](#)]
203. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW, 1997. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3195-3199. [[PubMed](#)]
204. Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD, Basham B, Smith K, Chen T, Morel F, Lecron JC, Kastelein RA, Cua DJ, McClanahan TK, Bowman EP, de Waal Malefyt R, 2007. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 8, 950-957. [[PubMed](#)]
205. Yamazaki K, Onouchi Y, Takazoe M, Kubo M, Nakamura Y, Hata A, 2007. Association analysis of genetic variants in IL23R, ATG16L1 and 5p13.1 loci with Crohn's disease in Japanese patients. *J Hum Genet* 52, 575-583. [[PubMed](#)]
206. Yang H, Liang ZH, Liu XL, Wang F, 2010. [Association between polymorphisms of interleukin-10, interferon-gamma gene and the susceptibility to pulmonary tuberculosis]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 31, 155-158. [[PubMed](#)]
207. Yates VM, Watkinson G, Kelman A, 1982. Further evidence for an association between psoriasis, Crohn's disease and ulcerative colitis. *Br J Dermatol* 106, 323-330. [[PubMed](#)]
208. Youssef SS, Abd El Aal AM, Nasr AS, el Zanaty T, Seif SM, 2013. Interleukin-12B gene polymorphism frequencies in Egyptians and sex-related susceptibility to hepatitis C infection. *J Interferon Cytokine Res* 33, 415-419. [[PubMed](#)]

209. Zaba LC, Cardinale I, Gilleaudeau P, Sullivan-Whalen M, Suarez-Farinas M, Fuentes-Duculan J, Novitskaya I, Khatcherian A, Bluth MJ, Lowes MA, Krueger JG, 2007. Amelioration of epidermal hyperplasia by TNF inhibition is associated with reduced Th17 responses. *J Exp Med* 204, 3183-3194. [[PubMed](#)]
210. Zhang XJ, Huang W, Yang S, Sun LD, Zhang FY, Zhu QX, Zhang FR, Zhang C, Du WH, Pu XM, Li H, Xiao FL, Wang ZX, Cui Y, Hao F, Zheng J, Yang XQ, Cheng H, He CD, Liu XM, Xu LM, Zheng HF, Zhang SM, Zhang JZ, Wang HY, Cheng YL, Ji BH, Fang QY, Li YZ, Zhou FS, Han JW, Quan C, Chen B, Liu JL, Lin D, Fan L, Zhang AP, Liu SX, Yang CJ, Wang PG, Zhou WM, Lin GS, Wu WD, Fan X, Gao M, Yang BQ, Lu WS, Zhang Z, Zhu KJ, Shen SK, Li M, Zhang XY, Cao TT, Ren W, Zhang X, He J, Tang XF, Lu S, Yang JQ, Zhang L, Wang DN, Yuan F, Yin XY, Huang HJ, Wang HF, Lin XY, Liu JJ, 2009. Psoriasis genome-wide association study identifies susceptibility variants within LCE gene cluster at 1q21. *Nat Genet* 41, 205-210. [[PubMed](#)]
211. Zhou L, Yao F, Luan H, Wang Y, Dong X, Zhou W, Wang Q, 2012. Functional polymorphisms in the interleukin-12 gene contribute to cancer risk: evidence from a meta-analysis of 18 case-control studies. *Gene* 510, 71-77. [[PubMed](#)]
212. Zhu J, Qu H, Chen X, Wang H, Li J, 2013. Single nucleotide polymorphisms in the tumor necrosis factor-alpha gene promoter region alter the risk of psoriasis vulgaris and psoriatic arthritis: a meta-analysis. *PLoS One* 8, e64376. [[PubMed](#)]
213. Zhu KJ, Zhu CY, Shi G, Fan YM, 2012. Association of IL23R polymorphisms with psoriasis and psoriatic arthritis: a meta-analysis. *Inflamm Res* 61, 1149-1154. [[PubMed](#)]
214. Zhu KJ, Zhu CY, Shi G, Fan YM, 2013. Meta-analysis of IL12B polymorphisms (rs3212227, rs6887695) with psoriasis and psoriatic arthritis. *Rheumatol Int* 33, 1785-1790. [[PubMed](#)]
215. HapMap-CEU populacija:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_viewTable.cgi?pop=1409
216. Pilot 1-CEU subpopulacija:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_viewTable.cgi?pop=13148

Spisak skraćenica

AGR 129	soj miševa koji su deficitarni za receptore za IFN tip I, tip II i Rag2
AP-2	(<i>engl.</i> Activating Protein 2)
ARMS	(<i>engl.</i> Amplification-Refractory Mutation System)
CCHCR1	(<i>engl.</i> Coiled-Coil Alpha-Helical Rod Protein 1)
CCL	ligand receptora za hemokine sa CC motivom
CXCL	ligand receptora za hemokine sa CXC motivom
dHPLC	(<i>engl.</i> denaturing High Pressure Liquid Chromatography) tečna hromatografija pod visokim pritiskom i denaturišućim uslovima
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
Dsg3H1	transgeni miš kod koga su transgeni T-ćelijski receptori specifični za dezoglein 3
EDTA	(<i>engl.</i> Ethylenediaminetetraacetic acid) etilen diamin tetrasirćetna kiselina
EP	(<i>lat.</i> Erythrodermia psoriatica)
FAM	6-fluorescein amidit
GWAS	(<i>engl.</i> Genome-Wide Association Study), ispitivanje polimorfizama gena u celokupnom genomu
HLA	humani leukocitni antigen
HDL	(<i>engl.</i> High-density lipoprotein) lipoprotein velike gustine
IFIH1	(<i>engl.</i> InterFeron-Induced Helicase C domain-containing protein 1)
IFN	interferon
IL	interleukin
IL-23R	IL-23 receptor
IL-28RA	IL-28 receptor antagonist
IP 95%	interval poverenja od 95%
iRNK	informaciona RNK
K5-STAT3C	konstrukt u kome je STAT3 pod kontrolom promotora keratina 5
K14-VEGFk	konstrukt u kome je VEGF pod kontrolom promotora keratina 14
Kb	kilobaza
LCE3C	(<i>engl.</i> Late Cornified Envelope protein 3C)
LCE3E	(<i>engl.</i> Late Cornified Envelope protein 3E)
LD	(<i>engl.</i> Linkage Disequilibrium), vezanost nasleđivanja
LL37	antimikrobni peptid nastao odvajanjem od katjonskog antimikrobnog proteina katelicidina
MALDI-TOF	(<i>engl.</i> Matrix-assisted laser desorption/ionization-Time of Flight)
Mas. spekt.	masena spektrometrija
MCA	(<i>engl.</i> Melting Curve Analysis), analiza temperaturnog profila disocijacije lanaca DNK
MGB	(<i>engl.</i> Minor Groove Binder), hemijska grupa koja povećava temperaturu hibridizacije oligonukleotida
miRNK	mikroRNK
MZF-1	(<i>engl.</i> Myeloid zinc finger 1)
NFκB	(<i>engl.</i> Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
NFκBIα	(<i>engl.</i> NFκB Inhibitor, alpha)
OR	(<i>engl.</i> Odds Ratio), odnos šansi

PASI	(<i>engl.</i> Psoriasis Area and Severity Index), skoriranje površine zahvaćene kože i težine kliničke slike
PCR	polimerazna reakcija lančanog umnožavanja
PSORS1	(<i>engl.</i> Psoriasis susceptibility 1)
pyroSeq	pirosekvenciranje
Rag2	(<i>engl.</i> Recombination-activating gene 2)
REL	protoonkogen c-Rel, produkt <i>REL</i> gena
RFLP	(<i>engl.</i> Restriction Fragment Length Polymorphism), polimorfizam dužine fragmenata nastalih restrikcionom digestijom
RNK	ribonukleinska kiselina
SCID	(<i>engl.</i> Severe Combined ImmunoDeficiency), teška kombinovana imunodeficijencija
SNP	(<i>engl.</i> Single Nucleotide Polymorphism), polimorfizmi pojedinačnih nukleotida
Sp1	(<i>engl.</i> Specificity protein 1)
SSP	(<i>engl.</i> sequence specific primers)
STAT3C	(<i>engl.</i> Signal Transducer and Activator of Transcription 3), prenosilac signala i aktivator transkripcije 3
TNF	(<i>engl.</i> Tumor Necrosis Factor), faktor nekroze tumora
TNFAIP3	(<i>engl.</i> TNF-Alpha-Induced Protein 3)
TNIP1	(<i>engl.</i> TNFAIP3-Interacting Protein 1)
TRAF3IP2	(<i>engl.</i> TNF Receptor-Associated Factor 3-Interacting Protein 2)
T _H	(<i>engl.</i> T-helper cell), pomoćnička T-ćelija
TYK2	tirozin kinaza 2
VEGF	(<i>engl.</i> Vascular Endothelial Growth Factor), faktor rasta vaskularnog endotela
VIC	fluorescentna boja neobjavljene stukture, patent Applied Biosystems
WB	(<i>engl.</i> Wash buffer), pufer za ispiranje

BIOGRAFIJA

Svetlana Popadić je rođena u Beogradu 13. 07. 1974. godine gde je završila osnovnu i srednju školu. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je školske 1993/1994. godine a diplomirala je 1999. godine sa prosečnom ocenom 8,48. Magisterijum iz oblasti dermatovenerologije upisala je 1999. godine i zvanje magistra medicinskih nauka stekla u septembru 2005., odbranom magistarskog rada „Farmakološka modulacija programirane ćelijske smrti u psorijazi“, mentor prof. dr Ljiljana Medenica, komentor prof. dr Zorica Ramić. Specijalizaciju iz dermatovenerologije započela je školske 2002/2003. u Institutu za dermatovenerologiju Kliničkog centra Srbije, a zvanje specijaliste dermatovenerologije stekla marta meseca 2005. položivši specijalistički ispit sa odličnom ocenom.

U radni odnos na Klinici za dermatovenerologiju KCS, na radno mesto specijaliste dermatovenerologije, primljena je oktobra meseca 2006. U zvanje asistenta za užu naučnu oblast Dermatovenerologija na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu izabrana je januara 2009. a ponovo izabrana martu 2012. Od 2003-2005. bila je saradnik na projektu „Efektorski i regulatorni mehanizmi u esperimentalno izazvanim autoimunskim oštećenjima centralnog nervnog sistema“ (br. 2020, Ministarstvo za nauku, tehnologiju i razvoj Republike Srbije), rukovodilac prof. dr Marija Mostarica Stojković. Od 2006-2010. saradnik na projektu „Mehanizmi urođene i stečene imunosti u autoimunskim bolestima i infekciji“ (br. 145066, Ministarstvo nauke Srbije), rukovodilac prof. dr Marija Mostarica Stojković. Od 2011. angažovana je kao saradnik na projektu „Imunopatogenetski i regulatorni mehanizmi u autoimunskim bolestima i hroničnoj inflamaciji“ (br. 175038 Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije), rukovodilac prof. dr Marija Mostarica Stojković do 1.10.2013. a zatim prof. dr Vera Pravica. Član je međunarodnog projekta u okviru COST akcije TD 1206. Autor je ili koautor 14 publikacija objavljenih u celini u časopisima indeksiranim u Institute of Science Index bazama podataka (SCI i SCIE).

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisana **Svetlana Popadić**

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

GENETSKI MARKERI INFLAMACIJE KOD PACIJENATA SA PSORIASIS VULGARIS

- 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 kršila autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranta

U Beogradu, 10.6.2014. godine



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora **Svetlana Popadić**

Naslov rada **GENETSKI MARKERI INFLAMACIJE KOD PACIJENATA SA PSORIASIS VULGARIS**

Mentor: **Prof. dr Ljiljana Medenica**

Komentor: **Prof. dr Vera Pravica**

Potpisani **Svetlana Popadić**

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, 10.6.2014. godine



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

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

GENETSKI MARKERI INFLAMACIJE KOD PACIJENATA SA PSORIASIS VULGARIS

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predala 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 odlučila.

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

Potpis doktoranda

U Beogradu, 10.6.2014. godine


Dr. Jelena Koprivica