

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Dragana V. Popović-Kuzmanović

**ANALIZA POLIMORFIZAMA GENA
ZNAČAJNIH ZA DIFERENCIJACIJU
T(H)17 I T REGULATORNIH ĆELIJA
KOD BOLESNIKA SA
ANTIFOSFOLIPIDNIM SINDROMOM**

doktorska disertacija

Beograd, 2013.

UNIVERSITY OF BELGRADE

SCHOOL OF MEDICINE

Dragana V. Popović-Kuzmanović

**ANALYSIS OF POLYMORPHISMS IN
GENES IMPORTANT FOR
DIFFERENTIATION OF T(H)17 AND
T REGULATORY CELLS IN
PATIENTS WITH
ANTIPHOSPHOLIPID SYNDROME**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013.

Mentor:

Prof. dr Ivana Novaković

redovni profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu

Komentor:

NS dr Ljudmila Stojanović

naučni savetnik KBC "Bežanijska kosa", nastavna baza Medicinskog fakulteta u Beogradu

Članovi komisije:

Prof. dr Ljiljana Luković

redovni profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu

Prof. dr Dragomir Marisavljević

redovni profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu

Prof. dr Dragana Cvetković

vanredni profesor Biološkog fakulteta u Beogradu

S A Ž E T A K

Uvod: Antifosfolipidni sindrom (AFS) je autoimunska bolest koju karakteriše pojava arterijskih i venskih tromboza, gubitak ploda i prisustvo antifosfolipidnih antitela u serumu. AFS, kao i mnoge druge autoimunske bolesti, ima multifaktorsku etiologiju koja uključuje naslednu komponentu i delovanje faktora spoljašnje sredine. Jedan od pokazatelja nasledne predispozicije kod multifaktorskih bolesti je udruženost određenih genskih polimorfizama sa pojavom oboljenja. Genski tj. DNK polimorfizmi predstavljaju varijacije u naslednoj osnovi koje se sreću u opštoj humanoj populaciji. Najčešći je polimorfizam pojedinačnih nuleotida (SNP) koji obuhvata oko 90% svih DNK polimorfizama. Otkriće Th17 i T regulatornih ćelija (Treg), dve nove subpopulacije CD4⁺ ćelija, ukazalo je na mogućnost učešća ovih ćelijskih linija u patogenezu mnogih autoimunskih bolesti, uključujući i AFS. To je uslovalo i interes za polimorfizme u genima povezanim sa funkcionisanjem ovih ćelija.

Cilj: Cilj ovog istraživanja je bio da ispita povezanost AFS sa nivoima citokina IL-17, IL-23, IL-6, TGFβ i transkripcionih faktora RORγt i Foxp3 kao i mogućnost povezanosti nastanak AFS sa genotipovima na sedam polimorfnihih mesta u genima za te citokine i transkripcione faktore. Svi ovi citokini i transkripcioni faktori su uključeni u neku of faza diferencijacije Th17 ili Treg ćelija. Prema dostupnim podacima iz literature, istraživanja povezanosti ovih citokina i njihovi genskih polimorfizama sa antifosfolipidnim sindromom su retka, a takvi podaci ne postoje za srpsku populaciju.

Materijal i metode: Ispitali smo koncentracije citokina IL-17, IL-23, TGF-β i IL-6 i odabrane genske polimorfizme kao osetljive markere antifosfolipidnog sindroma. Ispitali smo grupu od pedeset bolesnika s primarnim AFS (PAFS), pedeset bolesnika sa sekundarnim AFS (SAFS) i kontrolnu grupu od pedeset zdravih ispitanika. Serumske koncentracije IL-17, IL-23 i TGF-β su merene komercijalnim ELISA kitovima, a IL-6 je meren elektro-hemi-luminescencijom. SNP: rs2275913, rs763780, rs11209026, rs1800471, rs1800795, rs9826 i rs3761548 koji se nalaze u genima IL-17A, IL-17F, IL-23, TGFβ, IL-6, RORγt i FOXP3 (redom) su genotipizirani korišćenjem komercijalnih TaqMan eseja ili metodom alel specifičnog PCR-a.

Rezultati: Koncentracije IL-17 su bile značajno veće kod obolelih sa PAFS ($8.4 \pm 1.1\text{pg/ml}$) i obolelih sa SAFS ($7.6 \pm 0.9\text{pg/ml}$) u odnosu na ispitanike kontrolne grupe ($4.3 \pm 0.5\text{pg/ml}$). Koncentracije IL-23 su bile značajno veća kod obolelih sa PAFS ($14.3 \pm 2.3\text{pg/ml}$) u odnosu na obolele sa SAFS ($8.5 \pm 1.4\text{pg/ml}$) i odnosu na kontrolnu grupu ($7.8 \pm 2.2\text{pg/ml}$). Razlika koja postoji u koncentracijama TGF β između obolelih od PAFS i SAFS i ispitanika kontrolne grupe nije statistički značajna. Vršena je međusobna korelacija koncentracija IL-17, IL-23 i TGF β u sve tri grupe ispitanika. Kod pacijenata sa PAFS postoji visoko značajna pozitivna korelacija između koncentracija IL-17 i IL-23 ($p < 0.01$), a kod pacijenata sa SAFS postoji visoko značajna pozitivna korelacija između koncentracija IL-17 i IL-23 ($p < 0.01$) i značajna pozitivna korelacija između IL-17 i TGF β ($p < 0.05$). Nije utvrđena korelacija između nivoa IL-23 i TGF β .

Značajna korelacija je ustanovljena između povišene koncentracije IL-17 i trombocitopenije ($p = 0,011$). Pacijenti sa PAFS i povišenom koncentracijom IL-17 češće imaju trombocitopeniju.

Nisu utvrđene značajne korelacije koncentracija IL-17, IL-23, TGF β i IL-6 i pojedinih genotipova polimorfizma za te citokine u grupi obolelih sa PAFS i SAFS.

Sve asocijacije ispitivanih polimorfizama su vezane za vaskularne manifestacije antifosfolipidnog sindroma, bilo da su to arterijske ili venske tromboze ili trombocitopenija kao jedini klinički simptom čija je pojava povezana sa povećanom produkcijom IL-17 u primarnom AFS. Više asocijacija je vezano za vaskularne promene kod primarnog AFS nego kod sekundarnog AFS.

Zaključak: U ovoj studiji je pokazano po prvi put da je IL-23/IL-17 osa aktivirana kod AFS bolesnika. Istraživanja većeg broja SNP u ispitivanim genima bi dala bolji uvid i više podataka o njihovoj mogućoj povezanosti sa rizikom od obolevanja i o ulozi Th17 ćelija u vaskularnim i drugim kliničkim manifestacijama ovog autoimunskog poremećaja.

Ključne reči: Th17, Treg, antifosfolipidni sindrom, genski polimorfizmi

ABSTRACT

Introduction: Antiphospholipid syndrome (APS) is an autoimmune disease characterized by the occurrence of arterial and venous thrombosis, fetal loss and the presence of antiphospholipid antibodies in the serum. APS, like other autoimmune diseases, has multifactor etiology which includes hereditary component and the influence of external factors. One of the indicators of hereditary predisposition for multifactorial diseases is the association of certain genetic polymorphisms with the emergence of diseases. Gene Polymorphisms are variations in inherited basis that normally appear in human population. The most common individual nucleotide polymorphism (SNP), which comprises about 90% of all DNA polymorphisms, is an exchange of individual bases. Discovery of Th17 and regulatory T cells (Treg), two new subsets of CD4+ cells, indicates the possibility of involvement of these cell lines in the pathogenesis of many autoimmune diseases, including APS. Subsequently, polymorphisms in corresponding genes are of particular interest.

Aim: The aim of this study was to investigate the association of APS with the cytokine IL-17, IL-23, IL-6, TGF β and the transcription factors ROR γ t and Foxp3 and development of APS possible link with the seven polymorphic genotypes of the genes for these cytokines and transcription factors. All of these cytokines and transcription factors involved in some stage of differentiation of Th17 and Treg cells. According to available data in the literature, researches of these cytokines and their gene polymorphisms in antiphospholipid syndrome are rare, and no such data exist for the Serbian population.

Material and methods: We investigate the serum concentrations of cytokines IL-17, IL-23, TGF- β and IL-6 and gene polymorphisms of those genes as susceptibility markers for Antiphospholipid syndrome. We studied a group of fifty patients with primary APS (PAPS), fifty with secondary APS (SAPS) and fifty healthy controls. Serum concentrations of IL-17, IL-23 and TGF- β were measured by commercial ELISA kits, and IL-6 was measured by electro-chemo-luminescence method. The SNPs: rs2275913, rs763780, rs11209026, rs1800471, rs1800795, rs9826 and rs3761548 located in genes encoding IL-17A, IL-17F, IL-23, TGF β , IL-6, ROR γ t and Foxp3

(respectively) were genotyped using commercial pre-synthesized TaqMan allelic discrimination assay or by allele-specific PCR.

Results: The levels of IL-17 were significantly higher in patients with PAPS (8.4 ± 1.1 pg/ml), and patients with SAPS (7.6 ± 0.9 pg/ml) compared to the control group (4.3 ± 0.5 pg/ml). The levels of IL-23 were significantly higher in patients with PAPS (14.3 ± 2.3 pg/ml) compared with patients with SAPS (8.5 ± 1.4 pg/ml) and compared to the control group (7.8 ± 2.2 pg/ml) The difference that exists between the concentrations of TGF β in PAPS, SAPS and control groups was not statistically significant.

We performed a mutual correlation between IL-17, IL-23 and TGF β in all three groups of patients. There was a significant positive correlation between concentrations of IL-17 and IL-23 ($p < 0.01$) in primary APS, and in secondary APS significant positive correlation was between IL-17 and IL-23 ($p < 0.01$) and between IL-17 and TGF β ($p < 0.05$). There was no correlation between the level of IL-23 and TGF β .

A significant correlation was found between increased concentration of IL-17, and thrombocytopenia ($p = 0.011$). Patients with PAPS and increased levels of IL-17, tend to have thrombocytopenia.

We observed no statistically significant correlation between concentration of IL-17, IL-23, TGF β and IL-6 and genotypes and alleles of these cytokines in PAPS and SAPS.

Almost all associations examined polymorphisms are associated with vascular manifestations of antiphospholipid syndrome, whether it's arterial or venous thrombosis or thrombocytopenia as the only clinical symptom whose occurrence is associated with increased production of IL-17. More association is related to vascular changes in primary than in secondary APS.

Conclusion: We demonstrated for the first time that IL-23/IL-17 axis is stimulated in APS patients. Research of additional SNPs in corresponding genes would give a better insight and more data about their possible association with risk of the disease and involvement Th17 cells in vascular and other clinical manifestations of autoimmune disorders.

Key Words: Th17, Treg, Antiphospholipid syndrome, gene polymorphisms

Zahvaljujem se Prof. dr Ivani Novaković na stručnoj pomoći, strpljenju, te moralnoj podršci prilikom sprovođenja istraživanja i izrade ove doktorske disertacije.

Mojoj Zvezdi vodilji.

SADRŽAJ:

1.0	UVOD	1
1.1	Antifosfolipidni sindrom i genski polimorfizmi.....	2
1.2	Th1/Th2.....	7
1.3	Th17.....	9
1.4	Treg.....	15
1.5	IL-6.....	18
1.6	TGFβ.....	21
1.7	IL-17.....	24
1.8	IL-23.....	28
1.9	Nuklearni receptor RORγt.....	31
1.10	Transkripcioni faktor Foxp3.....	35
2.0	RADNA HIPOTEZA CILJ ISTRAŽIVANJA	38
2.1	Radna hipoteza.....	39
2.2	Cilj istraživanja.....	40
3.0	MATERIJAL I METODOLOGIJA RADA	41
3.1	Ispitanici.....	42

3.2	Izolacija genomske DNK iz nuklearnih ćelija krvi.....	44
3.3	Alel specifični PCR.....	46
3.4	Poliakrilamid gel elektroforeza.....	48
3.5	Real-time PCR (Q-PCR).....	50
3.6	Statistička obrada podataka.....	53
4.0	REZULTATI.....	54
4.1	Demografske karakteristike ispitivanih grupa.....	55
4.2	Imunološke karakteristike ispitivanih grupa.....	56
4.3	Kliničke karakteristike ispitivanih grupa.....	62
4.4	Genitičke karakteristike ispitivanih grupa.....	64
4.5	Povezanost ispitivanih kliničkih i imunoloških parametara u primarnom AFS.....	73
4.6	Povezanost ispitivanih kliničkih i imunoloških parametara u sekundarnom AFS.....	75
4.7	Povezanost ispitivanih genskih polimorfizama sa kliničkim i imunološkim parametrima u primarnom AFS.....	77
4.8	Povezanost ispitivanih genskih polimorfizama sa kliničkim i imunološkim parametrima u sekundarnom AFS.....	79

5.0	<i>DISKUSIJA</i>	81
5.1	IL-17 i polimorfizmi u genu za IL-17.....	83
5.2	IL-23 i polimorfizam u genu za IL-23.....	87
5.3	TGF β i polimorfizam u genu za TGF β	89
5.4	IL-6 i polimorfizam u genu za IL-6.....	91
5.5	ROR γ t i polimorfizam u genu za ROR γ t.....	93
5.6	Foxp3 i polimorfizam u genu za Foxp3.....	94
5.7	Završna diskusija.....	96
6.0	<i>ZAKLJUČCI</i>	99
7.0	<i>POPIS SKRAĆENICA</i>	102
8.0	<i>LITERATURA</i>	109
9.0	<i>BIOGRAFIJA AUTORA</i>	134
10.0	<i>PRILOZI</i>	137

1.0 UVOD

1.1 *Antifosfolipidni sindrom i genski polimorfizmi*

Antifosfolipidni sindrom - AFS, je autoimunska oboljenja koje karakteriše pojava arterijskih i venskih tromboza, ponovljeni gubici ploda kod žena, kao i prisustvo antifosfolipidnih antitela - aFL, u krvi. Bolest je još poznata pod nazivom „sindrom lepljive krvi“ i „sindrom antifosfolipidnih antitela“, a prvi ju je opisao 1983. godine Graham Hughes (1). Kada se bolest ispolji samostalno definiše se kao primarni AFS, a ukoliko se javi udružena sa još nekim autoimunskim oboljenjem, najčešće sa sistemskim eritemskim lupusom - SEL, definiše se kao sekundarni AFS, dok se kao najteži oblik bolesti sa veoma visokom stopom mortaliteta izdvaja katastrofični AFS (2-4).

AFS je poremećaj imunološkog sistema u kome je poremećena regulacija koagulacije u smislu hiperkoagulabilnosti koja se klinički manifestuje pojavom jedne ili više epizoda tromboze arterija, vena ili malih krvnih sudova u nekom tkivu ili organu i pojavom komplikacije trudnoće u smislu jedne ili više neobjašnjenih smrti ili morfoloških nenormalnosti ploda u ili posle desete nedelje gestacije, kao i jednog ili više prevremenih porođaja pre 34. nedelje gestacije i 3 ili više neobjašnjenih abortusa pre 10. nedelja gestacije (5).

U krvi pacijenata sa AFS se mogu naći antitela na molekule fosfolipida koja su usmerena na anjonske fosfolipide ćelijske membrane, kao što je kardiolipin - aKL, ili za njih vezane proteine plazme među kojima je najznačajniji beta2 glikoprotein I - β_2 GP-I, ili kompleks fosfolipid-plazmatski protein lupus antikoagulans - LA. Antifosfolipidna antitela smanjuju nivo aneksina V, proteina koji veže fosfolipide i koji ima snažno antikoagulatívno dejstvo, pa se na taj način povećava sklonost ka zgrušavanju krvi, a kod žena i ka spontaním pobačajima, karakterističnim za ovo stanje (6-8).

Prva preliminarna klasifikacija kriterijuma za AFS je data u Sapporo-u 1998. godine (9). Sledeća revizija je dovela do konsenzusa koji datira iz 2006. godine sa XI internacionalnog kongresa o antifosfolipidnim antitelima u Sidneju (10), da bi 2010. godine u Galvestonu, SAD, bila potvrđena dijagnostika AFS koja se oslanja na laboratorijske testove (11). Trenutni dijagnostički i klasifikacioni kriterijum preporučuje 2 puta u toku 12 nedelja korišćenje tri standardizovana laboratorijska testa za detekciju antifosfolipidnih antitela i to aKL antitela IgG i IgM klase, anti β_2 GP-I antitela IgG i IgM

klase i/ili LA kod bolesnika koji imaju bar jednu od dve kliničke manifestacije, trombozu i/ili gubitak ploda, mada se u nekim slučajevima uzima u obzir i trombocitopenija.

I dalje postoje neusaglašenosti oko kliničke i dijagnostičke vrednosti laboratorijskih testova u AFS. U dijagnostici su još korišćeni testovi za detekciju antitela na fosfatidil-holin, fosfatidil-serin, fosfatidil-etanolamin, protrombin, anexin, protein S, glicerol, inositol, ali nijedan od testova se nije pokazao kao „zlatni standard“ (12-15).

U poslednje vreme kao bitni uzročnici-okidači AFS iz spoljašnje sredine identifikovani su infekcija i zapaljenje (16). Poznato je da u serumu obolelih od AFS mogu dugo da budu prisutna aFL antitela ali se tromboza javlja samo povremeno. Ovakvo stanje ide u prilog teoriji zvanj „second hit“. Prisustvo antitela je prvi događaj koji povećava trombofilni prag, ali se tromboza dešava samo u prisustvu drugog događaja kao što su infekcija, hirurške procedure, upotreba preparata estrogena, produžena imobilizacija i drugo. Teorija „second hit“ sugerise da u AFS postoji dodatni faktor, okidač, za nastanak tromboze (17,18).

Bakterije i virusi mogu izazvati autoimunske bolesti na nekoliko načina: molekularnom mimikrijom, kao superantigeni ili indukujući produkciju proinflamatornih citokina i hemokina (19-21). Sifilis je bila prva infektivna bolest kod koje su detektovana aFL (22). Imunizacija miševa peptidima bakterijskog i virusnog porekla koji imaju sličnost sa β_2 GP-I, dovodi do proizvodnje aFL antitela, što sugerise moguću ulogu molekulske mimikrije u AFS. Ti peptidi koji oponašaju β_2 GP-I inhibišu trombogena svojstva aFL antitela i sprečavaju gubitak ploda kod miševa. To znači da infektivni agensi pored toga što mogu da imaju ulogu u sekundarnom zapaljenskom događaju, naročito kod katastrofičnog AFS, mogu da utiču i na inicijalnu proizvodnju aFL antitela. Kao posledica infekcije, produženi inflamatorni odgovor može dovesti do hroničnog zapaljenja sa aktiviranjem stečenog imunološkog odgovora (23).

Smatra se da je AFS bolest posredovana B ćelijama, ali i T ćelije imaju važnu ulogu u indukciji i regulaciji bolesti jer luče citokine koji modulišu imunološki odgovor. Poznato je da mreža citokina i njihovih receptora igra značajnu ulogu u regulaciji imunološkog odgovora, da pro-inflamatorni i anti-inflamatorni citokini učestvuju u patogenezi autoimunskih bolesti, kao i da aktivnost autoimunskih bolesti zavisi od ravnoteže između ove dve grupe citokina (24).

Takođe se smatralo da su autoimunske bolesti posledica neravnoteže Th1/Th2 ćelija. Otkriće Th17 i T regulatornih ćelija - Treg, dve nove subpopulacije CD4⁺ ćelija, ukazalo je na mogućnost učešća ovih ćelijskih linija u patogenezi mnogih autoimunskih bolesti, uključujući i AFS. Th17 ćelije imaju ulogu u indukciji autoimunosti, a Treg ćelije inhibiraju autoimunost, dok je njihov balans neophodan za održavanje homeostaze. Th17 ćelije su uključene u inflamaciju i odbranu domaćina od ekstracelularnih patogena. Za diferencijaciju naivnih T ćelija u Th17 ćelije neophodni su IL-6 i TGF- β , a relativni balans ova dva citokina može da utiče na diferencijaciju bilo Th17 ili Treg ćelija (25). Supresivna aktivnost Treg ćelija se karakteriše inhibicijom proliferacije ciljnih efektorskih limfocita. Njihovo supresivno dejstvo može biti uzrok perzistencije uzročnika i nastanka hronične infekcije ali istovremeno, supresija inflamatornog odgovora može sprečiti nastanak proinflamatornog oštećenja tkiva (26).

AFS, kao i mnoge druge autoimunske bolesti, ima multifaktorsku etiologiju koja uključuje naslednu komponentu i delovanje faktora spoljašnje sredine. Jedan od pokazatelja nasledne predispozicije kod multifaktorskih bolesti je udruženost određenih genskih polimorfizama sa pojavom oboljenja. Genski polimorfizmi predstavljaju varijacije u naslednoj osnovi, tj. istovremeno prisustvo bar dve genetičke varijante u populaciji, na posmatranom lokusu. To su zapravo različiti alelni oblici jednog gena, pri čemu se ređi alel javlja sa učestalošću većom od 1%.

Humani genom se odlikuje u proseku jednim različitim nukleotidom na 1300 nukleotidnih parova. Polimorfna mesta (mesta na kojima je velika verovatnoća da će se genomi dve osobe razlikovati) su korisna za genetička ispitivanja u kojima je cilj pronaći odgovarajuću vezu između određenih fenotipova i DNK sekvenci. Najčešća genetička varijabilnost u genomu je u obliku polimorfizama pojedinačnih nukleotida - SNP, a prisutni su i polimorfizam broja uzastopnih ponovaka - VNTR, polimorfizam dužine restrikcionih fragmenata - RFLPs, inserciono-delecioni polimorfizam - I/D i polimorfizam broja kopija - CNPs.

SNP čine oko 85-90% svih DNK polimorfizama u genomu čoveka, a predstavljaju zamenu pojedinačnih baza. Ukoliko se nalaze u okviru gena, oni mogu biti locirani unutar promotorskog regiona (polimorfizam se označava predznakom, minusom), unutar kodirajućeg regiona – egzona i unutar nekodirajućeg regiona – introna. Prisutno je preko

3 miliona SNP-ova u humanom genomu, međutim svaka promena neće rezultirati funkcionalnim poremećajem.

Rasprostranjenost polimorfizama u humanom genomu omogućava različite kombinacije alela na različitim lokusima, te ogromnu genetičku varijabilnost populacije, kao i genetičku unikatnost svake jedinke. Više od jedne trećine lokusa koji kodiraju proteine u humanom genomu su polimorfni. Ova genska raznovrsnost je važna za razumevanje različite genetičke predispozicije za neke bolesti, a pored toga je od ključne važnosti za razumevanje genetičke raznolikosti među ljudima. Proučavanja u ovoj oblasti trebalo bi da objasne različite individualne rizike za određena oboljenja. U studijama asocijacije ispituje se udruženost određene genske varijante sa pojavom bolesti, odnosno učestalost genskih polimorfizama kod obolelih u poređenju sa zdravom populacijom. Ako je jedna genska varijanta frekventnija kod obolelih, za taj polimorfizam se kaže da je „asociran“ sa bolešću. Asocirani SNP ukazuje koji gen ili koji region ljudskog genoma utiče na rizik od pojave bolesti. Procena rizika se izračunava preko odnosa šansi - OR, i pokazuje povezanost analiziranog gena sa nastankom poremećaja. Ukoliko je odnos šansi jednak 1, taj SNP nije u vezi sa oboljenjem, ako je OR veći od 1, onda je dati alel SNP povezan sa bolešću, a ako je manji od 1, onda ima protektivnu ulogu u oboljevanju. Za procenu preciznosti OR se koristi interval pouzdanosti - CI. Visoki CI ukazuje na nizak nivo preciznosti OR. U praksi 95% CI se često koristi kao zamena za prisustvo statističke značajnosti (27).

S obzirom na to da je u osnovi AFS poremećaj koagulacije, već su ispitivani polimorfizmi gena za enzim metilen-tetra-hidro-folat reduktazu - MTHFR, za faktor V i faktor II koagulacije, za koje je poznato da predstavljaju rizik za nastanak tromboza. Najčešći polimorfizmi koji se povezuju sa AFS su C677T u genu za MTHFR, G1619A u genu za faktor V (Leiden varijanta) i G20210A u genu za faktor II, koji se i rutinski detektuju u nekim laboratorijama u okviru evaluacije AFS (28,29).

Ispitivano je i više polimorfizama gena za β_2 GP-I. Na poziciji 247 postoje alelne forme sa kodom (tripletom) za Valin (V) i Leucin (L), što za posledicu ima forme VV, VL ili LL. U više studija je pokazano da su VV i VL značajno češći kod obolelih od AFS, tako da se V247 β_2 GP-I alel smatra jednim od genetičkih faktora rizika za razvoj AFS (30-32).

Eksperimentalni modeli na životinjama kao i preliminarne studije o polimorfizmima na kandidat-genima inflamatornih medijatora sugerišu da „pro-inflamatorni fenotip“ igra ulogu u kliničkoj manifestaciji AFS (33-35). Podaci ukazuju da SNP u genima za inflamatorne medijatore mogu biti udruženi sa nižim ili višim inflamatornim odgovorom, te da samim tim mogu imati prediktivnu ulogu u razvoju i kliničkoj manifestaciji bolesti (36).

Poznato je da polimorfizmi, pre svega promotorskih regiona gena, utiču na produkciju citokina, ali još nije jasan značaj prisustva ovih polimorfizama u nastanku i kliničkoj manifestaciji AFS.

Prema najnovijim istraživanjima u IL-17 genskom lokusu kod čoveka opisano je više polimorfizama, a čini se da su najznačajniji rs2275913 u IL-17A i rs763780 u IL-17F. Ove varijante imaju antagonističko delovanje na izvornu formu proteina (37,38). U 25. kodonu gena za TGF β prisutan je polimorfizam rs1800471, čija je C forma povezana sa sniženom produkcijom tog citokina (39). Alelna forma G polimorfizma gena za IL-6, rs1800795, udružena je sa njegovom sniženom ekspresijom (40). Polimorfizmi gena za IL-23R (rs11209026) kao i za transkripcione faktore ROR γ t (rs9826) i Foxp3 (rs3761548) takođe utiču na njihovu aktivnost (41,42).

1.2 *Th1/Th2*

CD4⁺ T pomoćničke ćelije su ključni medijatori celularnog imunog odgovora. Dugi niz godina se smatralo da CD4⁺ T pomoćničke ćelije postoje kao dihotomija rodova Th1 i Th2. Naime, smatralo se da se nakon antigenske stimulacije, naivne CD4⁺ ćelije aktiviraju i diferenciraju u dva različita podskupa. Te podskupove su prvi klasifikovali Mossman i Coffman (43), pre 20 godina. Oni su na osnovu zapažanja da svaki od CD4⁺ podskupova proizvodi različite citokine i ima različite efektorske funkcije, predložili Th1/Th2 paradigmatički koncept po kome se CD4⁺ T ćelije diferenciraju u dva pravca pomoćničkih ćelija, Th1 i Th2. Podela citokina na citokine koje luče Th1 ćelije i citokine koje luče Th2 ćelije najčešće je korišćena u nastojanjima da se istakne stanje imunoregulacije. Th2 ćelije luče uglavnom antiinflamatorne citokine, dok Th1 ćelije luče uglavnom proinflamatorne citokine.

Th1 ćelije proizvode $\text{INF}\gamma$ i IL-2 i igraju ključnu ulogu u zaštiti od intracelularnih mikroba. Th2 ćelije proizvode IL-4, IL-5, IL-9 i IL-13, ali ne i $\text{INF}\gamma$ i uključene su u zaštitu od gastrointestinalnih nematoda, kao i u patogenezu alergijskih oboljenja (44). Th1 ćelije nastaju kao odgovor na produkciju interferona γ i IL-12 od strane dendritičnih i NK ćelija, dok Th2 uglavnom potiču od naivnih Th ćelija uz rano prisustvo IL-4 i odsustvo IL-12 u toku primarnog imunskog odgovora. Razlika Th1-Th2 podskupova postoji i u njihovoj diferencijaciji i na ćelijskom i na molekularnom nivou. Molekuli signalne transdukcije i aktivacije transkripcije - STAT su ključni elementi regulacije. STAT1 i STAT4 igraju značajnu ulogu u održavanju Th1 odgovora (45,46), a STAT6 aktivacija je neophodna za razvoj Th2 ćelija (47). Oba podskupa za svoj razvoj zahtevaju posebne transkripcione faktore, pri čemu je Tbet glavni transkripcioni faktor za Th1 ćelije, dok je GATA3, iz porodice transkripcionih faktora koji imaju sposobnost da se vežu za DNK sekvencu „GATA“, odgovoran za Th2 ćelije (48,49). Citokini imaju značajnu ulogu u polarizaciji Th odgovora. Rano prisustvo IL-4 tokom imunskog odgovora ima odlučujuću ulogu u razvoju Th2 ćelija. Vezivanje IL-4 za IL-4R dovodi do selektivne fosforilacije tirozina u transkripcionom faktoru STAT6. Aktivacija STAT6 dovodi do povećanja ekspresije transkripcionog faktora GATA3, što dovodi do pojačane ekspresije gena za Th2 citokine i smanjenje ekspresije IL-12R β 2 sa inhibicijom Th1 razvoja (50-52). Sa druge strane, IL-12 heterodimerni citokin koji se sastoji od dve

subjedinice (IL-12p35 i IL-12p40) je glavni faktor indukcije i održavanja Th1 ćelija (53). On dovodi do brze fosforilacije tirozina u transkripcionom faktoru STAT4, dok interferoni prenose signale posredstvom STAT1 molekula. Signali koje šalju IL-12 i interferoni posredstvom STAT4, odnosno STAT1, uvećavaju ekspresiju transkripcionog faktora Tbet koji je esencijalan za diferencijaciju Th1 ćelija (54-56).

Th1/Th2 paradigma je bila temelj našeg razumevanja T ćelijskog odgovora do pre 20 godina. Detaljnim ispitivanjem ova dva roda, postalo je očigledno da postoje mnogo komplikovanija patološka stanja koja ne mogu biti razjašnjena ovom paradigmom i da CD4⁺ T pomoćničke ćelije nisu limitirane ovim dvema podgrupama. Dugo se mislilo da su autoimunske bolesti posledica auto-reaktivnosti Th1 ćelija. Onda je pokazano da miševi deficijentni u INF γ i njegovom receptoru, INF γ R, nisu zaštićeni od nastanka bolesti, već, suprotno, razvijaju teži oblik eksperimentalnog autoimuskog encefalomijelitisa - EAE (57,58). Takođe je pokazano da gubitak IL-23, a ne IL-12 kako se mislilo, dovodi do otpornosti na razvoj autoimunosti i upale, što je potvrdilo da Th1 ćelije nisu potrebne za indukciju autoimunski posredovanog zapaljenja (59).

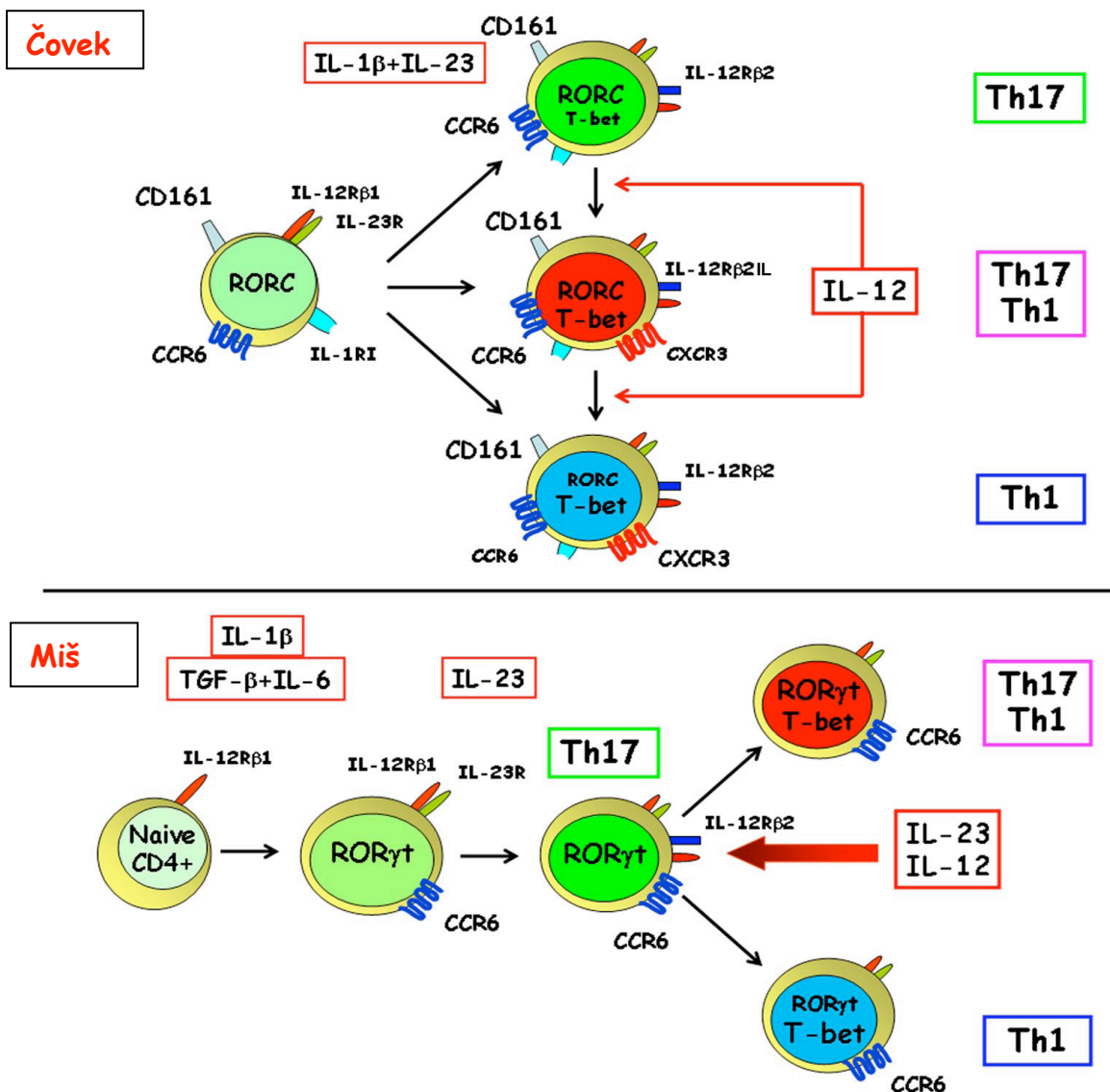
2005. godine je otkrivena takozvana Th17 ćelijska subpopulacija i definitivno je dokazano in vitro i in vivo da se diferencijacija Th17 ćelija odvija nezavisno od razvoja Th1 ili Th2 ćelija (60,61). Tokom narednih godina je bilo mnogo preokreta u razjašnjenju puteva koji vode ka diferencijaciji Th17 ćelija. Iako Th17 ćelije postoje i kod miševa i kod ljudi, izgleda da ipak postoje neke razlike u njihovom sazrevanju.

1.3 *Th17*

Th17 subpopulacija ćelija je otkrivena indirektno izučavanjem IL-23 koji je ključni faktor u preživljavanju Th17 ćelija već diferentovanih iz populacije CD4⁺ T limfocita. IL-23 je heterodimer sa dva lanca, p40 i p19. IL-12 je po strukturi i funkciji sličan IL-23 i takođe ima dva lanca, p40 i p35, tako da je subjedinica p40 zajednička za IL-23 i IL-12 (62). Eksperimenti na miševima su pokazali da su miševi lišeni p19, specifičnog lanca za IL-23, otporni na indukciju autoimunskih bolesti (63). Ovo zapažanje je ukazalo na važnu ulogu IL-23, a ne IL-12, kako se ranije smatralo, u patogenezi autoimunskih bolesti. Kasnija ispitivanja su pokazala da naivni T limfociti na svojoj površini ne ekspresuju receptore za IL-23, ali da je IL-23 neophodan za preživljavanje i ekspanziju već diferentovanih Th17 ćelija kao i za njihov inflamatorni potencijal. U odsustvu IL-23, Th17 ćelije pokazuju smanjenu produkciju inflamatornih citokina i povećanu sekreciju imunoregulatornog citokina IL-10. To je ukazalo da početna diferencijacija Th17 ćelija ne zavisi od IL-23, već zahteva prisustvo nekih drugih citokina (64-66).

Kod miša je za diferencijaciju Th17 ćelija potrebno istovremeno delovanje dva citokina, IL-6 i TGFβ. Ovo otkriće je bilo prilično iznenađujuće, s obzirom na to da se smatralo da TGFβ kao anti-inflamatorni citokin deluje kao supresor u procesu autoimunosti, podsticanjem transkripcije faktora za regulatorne T ćelije. Ispostavilo se da IL-6 inhibira aktivnost Foxp3, transkripcionog faktora Treg ćelija i time igra osovinsku ulogu u održavanju ravnoteže između Th17 i Treg ćelija. IL-6 indukuje ekspresiju IL-21 i ekspresiju IL-23 receptora - IL-23R, na naivnim CD4⁺ ćelijama. Dalje studije su pokazale da je alternativna diferencijacija Th17 ćelija moguća i bez prisustva IL-6, odnosno da TGFβ i IL-21 mogu započeti ovaj proces i kod IL-6 deficijentnih miševa (67-71). Sa druge strane, u nekim studijama je pokazano da za razvoj Th17, nedostatak IL-21 ili nedostatak njegovog receptora - IL-21R, nije prepreka, naprotiv IL-6 izaziva Th17 diferencijaciju nezavisno od IL-21 (72). Uloga IL-21 u razvoju Th17 još uvek je nejasna, ali je izgleda manja nego što se prvobitno mislilo. Ostala je prilično nejasna i uloga IL-23, mada je u njegovom nedostatku diferencijacija Th17 inhibirana u kasnoj fazi. Pokazano je da je ključna uloga IL-23 u formiranju potpuno funkcionalnih Th17 ćelija.

Kod miša su IL-6, IL-21 i IL-23 citokini koji aktiviraju transkripcijski faktor STAT3 za koji se smatra da je neophodan u diferencijaciji Th17 ćelija (Slika 1.). On je esencijalni pozitivni regulator Th17 ćelija, analogno STAT1 i STAT4 u Th1 i STAT6 u Th2 limfocitima. Osim toga, STAT3 reguliše ekspresiju Orphan receptora retinoične kiseline - ROR γ t, specifičnog transkripcijskog faktora Th17 ćelija. Srodan nuklearni receptor ROR α deluje sinergistički sa ROR γ t, te oba ova receptora pokreću transkripciju gena za IL-17 (IL-17A) i IL-17F u naivnim CD4⁺T ćelijama (73-75).



Modifikovano: Annunziato F, Romagnani S. Cytokine. 2011;56:112-5

Slika 1. Šematski prikaz razvoja Th17 ćelija kod čoveka i miša

Poreklo humanih Th17 ćelija, a posebno uloga TGF β u njihovoj diferencijaciji je još uvek predmet intenzivne rasprave. Prvo su različite studije negirale ulogu TGF β u humanoj

Th17 diferencijaciji i ukazivale na ključnu ulogu IL-1 β , IL-23 i IL-6 (76-78). Nakon toga su druge studije potvrdile ulogu TGF β u diferencijaciji Th17 ćelija (79). Izgleda da su za diferencijaciju u pravcu Th17 ćelija potrebne niske koncentracije TGF β , dok visoke koncentracije ovog citokina imaju ulogu u mehanizmu negativne regulacije Th17 ćelija (80) i u diferencijaciji T regulatornih ćelija. IL-6 u prisustvu niskih koncentracija TGF β aktivira ROR γ t koji je glavni transkripcijski faktor u diferencijaciji Th17 ćelija. Bilo je vrlo značajno otkriće da TGF β igra ključnu ulogu u diferencijaciji Th17 ćelija i da Th17 i Treg ćelije recipročno dele put diferencijacije u patogenezi i kontroli inflamacije. Još uvek nije jasno da li Th17 i Treg ćelije imaju dva različita puta aktivacije ili dele isti aktivacioni put sa učešćem različitih kofaktora. I dalje je u velikoj meri nejasno kako TGF β reguliše Th17 ćelijski razvoj i koji TGF β signalni put je u to uključen. Izgleda da TGF β ima dvofaznu funkciju u razvoju T ćelija. Na nivou transkripcije, TGF β pozitivno reguliše ekspresiju ROR γ t i negativno reguliše ekspresiju IL-17 na nivou naivnih T ćelija, te vodi ka diferencijaciji Treg ćelija. Prisustvo proinflamatornog citokina IL-6 ublažava ovu inhibiciju indukujući ekspresiju IL-21, koji povratno indukuje ekspresiju IL-23R što dovodi do favorizovanja Th17 diferencijacije. Sumarno, IL-6, IL-21 i IL-23 deluju zajedno sa TGF β da bi postigli ROR γ t zavisnu diferencijaciju Th17 ćelija. Utvrđeno je, takođe, da STAT3 delujući zajedno sa ROR γ t dovodi do maksimalne diferencijacije u pravcu Th17 ćelija. Pokazano je i da TGF β inhibira ekspresiju supresora citokinskog prenosa signala - SOCS3, značajnog negativnog regulatora STAT3 (81-83).

Još jedan faktor transkripcije ima ulogu u razvoju Th17 ćelija, regulatorni faktor interleukina 4 - IRF4, čiji nedostatak dovodi do redukovane ekspresije ROR γ t i prekomerne ekspresije Foxp3, tako da on stimuliše razvoj Th17 i inhibira razvoj Treg ćelija (84).

Novija istraživanja ističu značaj receptora za aril monovalentni aromatični radikal ugljovodonika - AhR, u stimulaciji diferencijacije Th17 ćelija. AhR ovo dejstvo ostvaruje putem inhibicije aktivacije STAT1 i STAT5 (85).

Cosmi i saradnici su pokazali da Th17 ćelije potiču od CD161⁺ naivnih CD4⁺ T ćelija iz timusa i krvi pupčanika, što implicira CD161 kao površinski marker Th17 humanih ćelija i ukazuje na originalno poreklo Th17 ćelija od CD161⁺ CD4⁺ T ćelija predaka (86). Mehanizam koji omogućava da se iz CD161⁺ CD4⁺ T limfocita u prisustvu IL-1R β , IL-

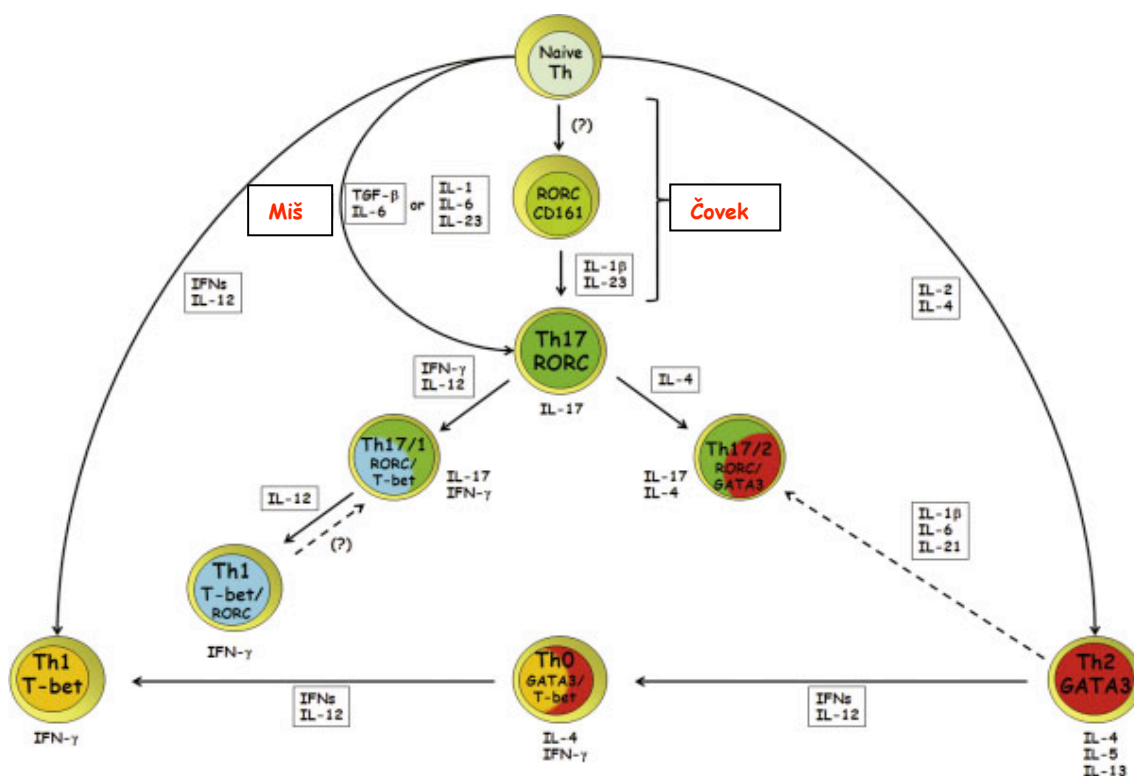
23R i ROR γ t razviju Th17 ćelije nije poznat, mada postoje dokazi da je potrebno i prisustvo još jednog molekula, hemokinskog receptora CCR6 (87).

Skorija istraživanja su pokazala da je hipoksijom-indukovani faktor 1 - INF1, jedan od ključnih faktora koji regulišu ravnotežu diferencijacije između Th17 i Treg ćelija. INF-1 pojačava razvoj Th17 direktnom aktivacijom transkripcije ROR γ t, a istovremeno slabi razvoj Treg degradujući Foxp3. Miševi sa INF-1 deficijencijom su rezistentni na Th17 zavisni eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis, uz smanjenje Th17 i povećanje Treg ćelija (88).

Th17 ćelije sekretuju IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-6 i TNF α . U mehanizmima njihove negativne regulacije diferencijacije učestvuju IL-27, INF γ kao inhibitori Th17 razvoja preko STAT1 (89-91), dok IL-2 inhibiciju vrši preko STAT5 (92). I povećan broj i povećana funkcija Th17, kao i smanjen broj i smanjena funkcija Treg ćelija mogu dovesti do zapaljenske reakcije. Članovi porodice prenosilaca signala i aktivatora transkripcije aktivacijom različitih citokina obezbeđuju i pozitivnu i negativnu regulaciju razvoja Th17 ćelija. Kontrola nuklearnih receptora signalizacije može da dovede do novih pristupa u lečenju autoimunskih bolesti izazvanih Th17 ćelijama.

Th17 ćelije mogu biti konvertovane u druge podskupove uz koekspresiju citokina tih podskupova (*Slika 2.*). Izgleda da je koekspresija citokina i transkripcionih faktora fleksibilan proces u Th ćelijama, čime je narušen koncept da svaka podgrupa Th ćelija produkuje određeni set citokina karakterističan za taj podskup. Th17 ćelije mogu biti konvertovane u Th1/Th17 ćelije koje eksprimiraju INF γ i IL-17, kao i INF γ i IL-12 koji su odgovorni za Th1 polarizaciju. Th1/Th17 ćelije koeksprimiraju ROR γ t i T-bet, IL-23R i IL-12R β 2, a ova fleksibilnost patogenetski je relevantna (93,94). Stimulacija Th17 ćelija sa IL-12 dovodi do smanjene ekspresije ROR γ t i povećane ekspresije T-bet omogućavajući Th17 ćelijama da pored IL-17A produkuju i INF γ . Postoji mali broj humanih Th17 klonova koji su sposobni da produkuju IL-4 (Th2/Th17), naročito kod pacijenata sa teškom hroničnom astmom. Pokazana je i mogućnost konverzije Th1 u IL-17/INF γ koeksprimovane ćelije u mezenteričnim limfnim nodusima uz prisustvo IL-6, IL-12 i TGF β , s tim da TGF β delimično inhibira razvoj Th1 u zavisnosti od vremena njegovog dodavanja u kulturu ćelija (95). Štaviše, postoji i mogućnost da se Th2 ćelije kod miševa konvertuju u Th2/Th17 ćelije u prisustvu IL1 β , IL-6 i IL-21. S obzirom na složene mehanizme diferencijacije, koekspresiju citokina i patogenetsku ili protektivnu

funkciju Th17 ćelija, njihova modulacija predstavlja veliki terapijski izazov. Sadašnje terapijske mogućnosti u lečenju autoimunskih bolesti uključuju blokadu IL-1, IL-6 i IL-23 (p40), koji su relevantni za održavanje Th17 ćelija (96,97). Primena dva humana antitela na IL-17A se klinički ispituje u reumatoidnom artritisu, psorijazi i uveitisu (98,99). Efekti blokiranja IL-17F samog ili zajedno sa IL-17A ili sa nekim drugim članom familije nisu poznati.



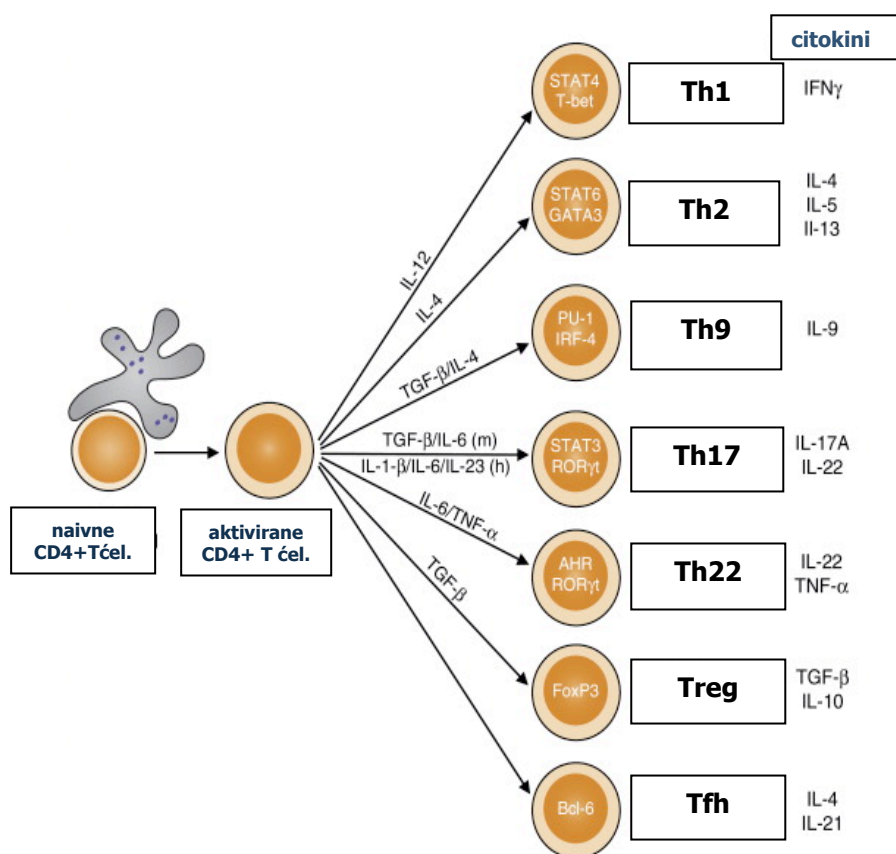
Modifikovano: Annunziato F, Romagnani S. Eur J Immunol. 2010;40:3312-6

Slika 2. Konverzija Th17 ćelija

Ravnoteža različitih subpopulacija T ćelija se reguliše preko produkta sekrecije svakog podskupa (Slika 3.). U infekciji je pravilna ćelijska aktivacija od ključnog značaja za odbranu od infekcije. Th9 su posebna subpopulacija CD4+ T ćelija važnih za odbranu domaćina od crevnih parazita, ali mogu imati i štetne efekte, uključujući razvoj autoimunskih bolesti. Nakon aktivacije, naivne CD4+ T ćelije se diferenciraju u Th9 ćelije u prisustvu TGFβ, IL-4 i IL-2, a inhibiraju ih INFγ. One luče IL-9 u visokoj koncentraciji, ne ekspimiraju nijedan do sada poznat transkripcioni faktor i u tesnoj su vezi sa Th2 ćelijama, mada ne luče IL-4, IL-5 niti IL-13 (100-102).

Posebnu subpopulaciju T pomoćničkih ćelija čine T folikularne ćelije, Tfh, lokalizovane u B ćelijskom folikulu zahvaljujući CXCR5 hemokinskom receptoru. One mogu biti generisane od strane T regulatornih ćelija i mogu lučiti IL-17 ne ekspimirajući ROR γ t. Tfh ćelije ekspimiraju jedinstvenu kombinaciju efektorskih molekula koji su važni za njihov razvoj i funkciju, uključujući visok nivo površinskih receptora za ICOS, CD40L, CXCR5, Bcl-6 i luče IL-21, IL-4 i IL-10 (103,104). Nejasno je da li su humane Tfh ćelije sastavljene od heterogenih ćelijskih populacija, kao kod miša. U tom slučaju bi humoralni odgovor bio regulisan različitim podskupovima Tfh ćelija, što bi moglo imati značajne implikacije za dizajn novih vakcina (105).

Th22 ćelije, sposobne da luče IL-22 i TNF γ , su novi podskup T ćelija, jasno odvojen od ostalih T pomoćničkih ćelija. One regulišu epidermalni odgovor u inflamatornim bolestima kože a uključene su i u patofiziologiju autoimunosti i tumorogeneze (106,107).



Modifikovano: Deenick EK. et all. *Current Opinion in Immunology*. 2011;23:111-8

Slika 3. Podskupovi CD4+ ćelija

1.4 Treg

U patogenezu autoimunskih bolesti zajedno sa Th17 su uključene i regulatorne T ćelije. Za diferencijaciju oba tipa ćelija je potreban TGF β , ali u zavisnosti od prisustva transtkripcionog faktora ROR γ t ili Foxp3 će nastati Th17, odnosno Treg ćelije. U malim koncentracijama TGF β zajedno sa IL-6 dovodi do ekspimiranja IL-23R koji favorizuje Th17 ćelijsku diferencijaciju. Visoka koncentracija TGF β smanjuje ekspresiju IL-23R, favorizuje Foxp3 i Treg ćelijsku diferencijaciju (80). Uzevši u obzir imunosupresivne funkcije i njihov značaj u imunotoleranciji, Treg ćelije su potencijalno jedna od najznačajnijih linija odbrane organizma od autoimunskih bolesti (108). One koekspimiraju CD25 molekul (α lanac receptora za IL-2) i imaju ključnu ulogu u kontroli autoreaktivnih T limfocita (109). Za nastajanje Treg fenotipa neophodne su interakcije autoantigena i glavnog histokompatibilnog kompleksa klase II - GHK II, ali i kontinuirano prisustvo antigena u visokoj koncentraciji.

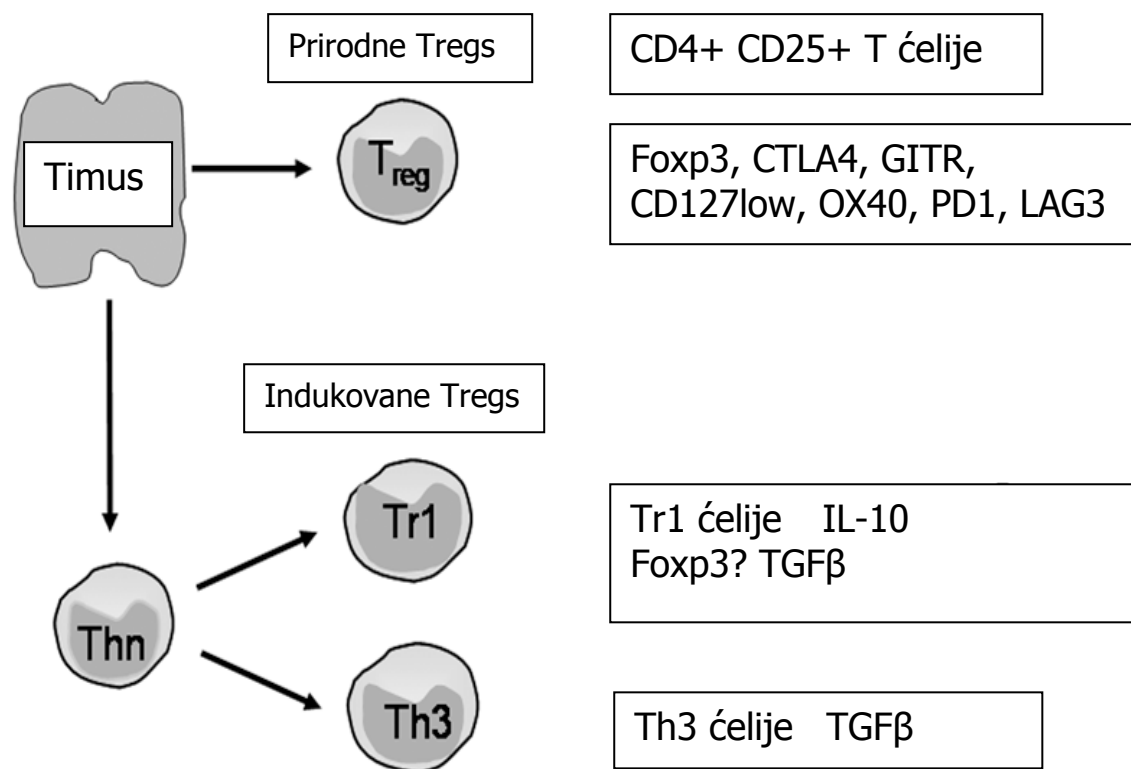
Patološki disbalans ovih ćelija je ispoljen prvenstveno kod dve grupe bolesti, autoimunskih bolesti i tumora. Dok kod autoimunskih bolesti nizak nivo Treg ćelija ne može da zaštiti čoveka od njegovih sopstvenih odbrambenih mehanizama, kod tumora je broj ovih ćelija na periferiji znatno povećan i štiti tumor od imunološkog nadzora domaćina. U različitim uslovima ovakve funkcije mogu biti mač sa dve oštrice. Supresivna aktivnost Treg ćelija se karakteriše inhibicijom proliferacije ciljnih efektonih limfocita što može sprečiti nastanak proinflamatornog oštećenja tkiva, sa jedne strane, a sa druge strane supresivno dejstvo ovih ćelija može biti uzrok perzistencije uzročnika i nastanka hronične infekcije.

T regulatorne ćelije postoje u barem dva oblika: antigen specifične prirodne T regulatorne ćelije - nTreg, koje se razvijaju u timusu i pokazuju visok afinitet za IL-2R (CD25+) i periferno indukovane T regulatorne ćelije - iTreg, koje su manje stabilne i čija se sposobnost sticanja i gubitka Foxp3 zasniva na regulatornim potrebama domaćina (110-114). Obe podgrupe ćelija imaju slične fenotipske karakteristike i sličnu supresorsku funkciju usmerenu protiv T ćelijama posredovanog imunskog odgovora. Međutim, te dve podgrupe ćelija pokazuju i neke razlike, kao što su različiti transkripti iRNK i ekspresija proteina, kao i različite epigenetičke modifikacije i stabilnost.

Prirodne Treg ćelije čine 5-10% perifernih CD4⁺ T limfocita i njih karakteriše konstitutivna membranska ekspresija CD4, CD25, Foxp3 i CTLA4, kao i ekspresija receptora za glikokortikoid indukovan faktor nekroze tumora - GITR, a nastaju u timusu uz učešće Foxp3, koji je ključni regulator njihovog nastanka i funkcije. Na njihovu ulogu u sprečavanju nastanka autoimunosti ukazuju eksperimenati u kojima je eliminacija ove populacije dovela do pojave autoimunskog oštećenja više organa u prethodno zdravih miševa, kao i noviji radovi u kojima je dokazano smanjenje broja ili funkcije T regulatornih ćelija u humanim autoimunskim bolestima (115). Prirodne Treg ćelije predstavljaju stabilnu ćelijsku liniju T regulatornih ćelija, mada one mogu u inflamatornim uslovima preći u Th17 u prisustvu IL-6, za razliku od iTreg koje ne pokazuju tu sposobnost.

Receptor za tip 1 sfingozin1 fosfat - S1P1, koji se nalazi na limfocitima i endotelijalnim ćelijama, kontroliše razvoj, održavanje i supresivnu aktivnost prirodnih Treg ćelija. Naime, gubitak funkcije S1P1 receptora dovodi do poboljšanja timusne diferencijacije i supresivne aktivnosti Treg ćelija, dok povećana ekspresija S1P1 dovodi do smanjenog razvoja i funkcije Treg in vitro i in vivo i što je još važnije dovodi do spontane autoimunosti zbog nedostatka Treg ćelija. S1P1 negativno reguliše i diferencijaciju i aktivnost Treg ćelija putem serin/treonin kinaze Akt, takođe poznate kao protein kinaza B ili PKB, dok IL-2 regulaciju vrši preko STAT5, a TGFβ preko SMAD signalnog puta (116,117).

Indukovana forma Treg ćelija je heterogena grupa ćelija koja sadrži više tipova T regulatornih ćelija čiji nastanak je uslovljen antigenskim kontaktom na periferiji. Nju čine Tr1 ćelije, koje nastaju van timusa i sekretuju IL-10, ne ekspresuju Foxp3 i mogu biti CD25⁺ i CD25⁻, kao i Th3 ćelije koje sekretuju TGFβ. Ove indukovane T regulatorne ćelije ne ispoljavaju nužno klasični fenotip CD4⁺CD25⁺ T ćelija i pored Tr1 i Th3 obuhvataju i CD8⁺, prirodne T ćelije ubice, a mogu nastati i iz konvencionalnih CD4⁺ i CD8⁺ T limfocita pod posebnim uslovima in vitro ili in vivo (118). Njih karakteriše visoka produkcija inhibitornih citokina i to IL-10 i TGFβ. Indukovane T regulatorne ćelije su timus nezavisne ali im je za razvoj neophodan IL-2. Nestabilan fenotip iTreg može biti povezan sa metilacijom Foxp3, a IL-2 stabilizuje Foxp3 njegovom demetilacijom (119,120).



Modifikovano: Maiese K. "Forkhead transcription factors" 2009 ISBN: 978-1-4419-1598-6

Slika 4. Šematski prikaz T regulatornih ćelija

Teško je definisati precizne razlike između nTreg i iTreg zbog nedostatka površinskih markera koji bi razdvojili ovu jedinstvenu vrstu ćelija (121). Njihovim razlikovanjem bi se razjasnile biološke karakteristike svakog od ova dva podskupa, kao i njihova uloga u perifernoj toleranciji, autoimunosti i tumorskoj imunologiji. Helios (122) i Neuropilin 1 - Nrp1, izgleda da mogu obezbediti, pojedinačno ili zajedno, neophodnu specifičnost da se razlikuju nTreg od iTreg. Nrp1 je nTreg marker kojim mogu da se izoluju ove ćelije (123).

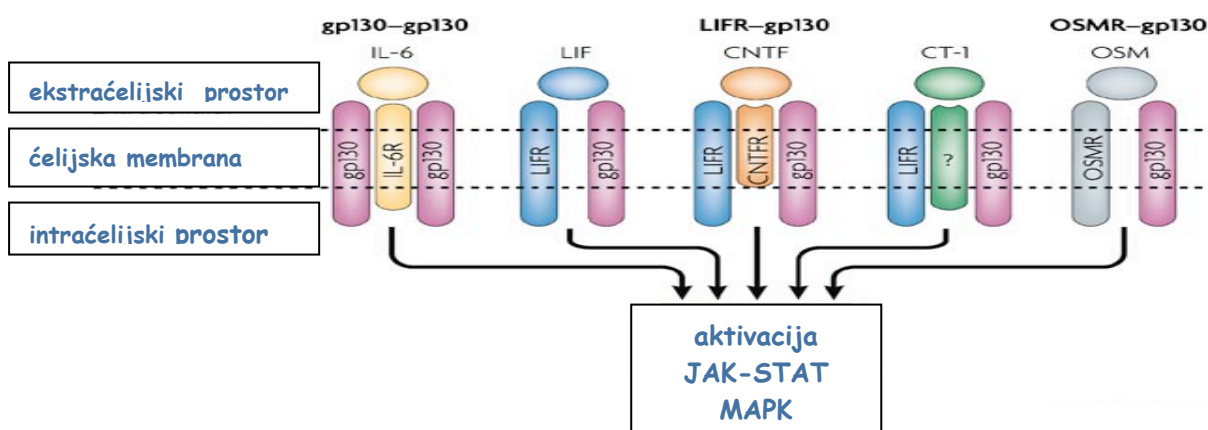
Iako je sposobnost regulatornih ćelija da inhibiraju imunski odgovor nedvosmisleno dokazana, još uvek nisu u potpunosti poznati mehanizmi ovog delovanja koje se može ostvariti bilo kroz direktni ćelijski kontakt i/ili posredstvom solubilnih faktora.

1.5 IL-6

Interleukin 6, IL-6, je protein iz porodice hematopoetina. Ranije je bio poznat kao: interferon β 2 - $\text{INF}\beta$ 2, B ćelijski stimulirajući faktor 2 - BSF-2, stimulirajući faktor hepatocita - HSF, faktor citotoksične T ćelijske diferencijacije - CDF, interleukin HP1 - IL-HP1, monocitno-granulocitni induktor tip 2 - MGI-2, hibridni-plazmocitni faktor rasta - HPGF/HGF, da bi 1988. godine dobio definitivno ime IL-6 (124). To je monomer od 184 aminokiseline, kodiran genom koji se kod ljudi nalazi na hromozomu 7 (region 7p21). Izlučuju ga prvenstveno T limfociti i makrofagi, a receptor za IL-6, transmembranski glikoprotein, eksprimira veliki broj ćelija kao što su T i B limfociti, neutrofilni i eozinofilni granulociti, monociti, megakariociti, nervne ćelije, hepatociti, osteoblasti, veliki broj epitelnih ćelija, čak i adipociti.

Gen za IL-6, u genomu čoveka zauzima 1.125 bp i sastoji se od pet egzona i četiri introna. Do danas je poznato 147 polimorfizama u ovom genu. Unutar egzona su opisana 54 polimorfizama, i to 37 u kodirajućem području, 12 ispred i 5 iza kodirajućeg područja.

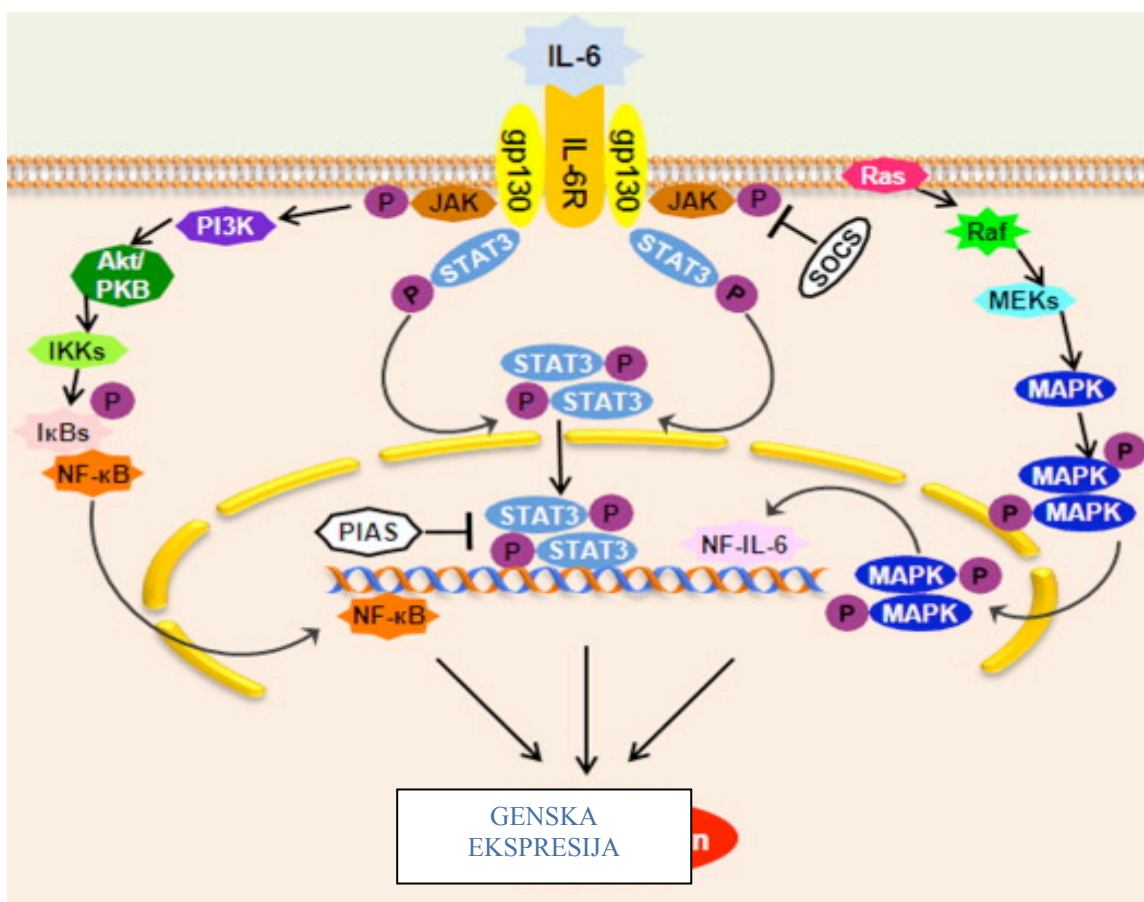
Interleukin 6 receptor, (poznat kao CD126), je proteinski kompleks koji se sastoji od IL-6 receptor subjedinice α - $\text{IL-6R}\alpha$, kao i od interleukin 6 transduktor signala, glikoproteina 130 (poznat kao CD130), koji deli sa drugim citokinima članovima IL-6 familije (125).



Modifikovano: Bauer S. et all. Nat Rev Neuroscience 2007;8:221-32

Slika 5. Šematski prikaz IL-6 receptora

Ostali članovi familije IL-6 su: IL-11, IL-27, cilijarni neutrofilni faktor - CNTF, kardiotrofin1 - CT-1, kardiotrofinu sličan citokin - CLC, inhibicioni faktor leukemije - LIF, onkostatin M - OSM i KAPOŠIJEV sarkom asocirani herpesvirus - KSHV. Vezivanjem IL-6 za njegov receptor se inicira kaskada prenosa signala preko Janus kinaze - JAK, kao i vezivanjem STAT, transkripcionog faktora, posebno STAT3. Fosforilisani STAT3 formira dimer koji u jedru aktivira transkripciju gena koji sadrže elemente STAT3 odgovora. (Slika 6.). Mutacije u Janus kinazi su glavni molekularni poremećaj u hematološkim malignitetima kod ljudi (126).



Modifikovano: Parvin AK et al. *Citokine and Growth Factor Reviews* 2013;24:16373

Slika 6. Šematskim prikaz prenosa signala IL-6

Drugi put prenosa signala putem aktivacije IL-6R je Ras posredovani put prenosa signala. On se odvija preko mitogenom aktiviranog proteina - Map kinaze, koji aktivira transkripcione faktore kao što su ELK-1 i NF-IL-6, koji zajedno sa transkripcionim faktorom AP-1 i faktorom serumskog odgovora - SRF, regulišu niz kompleksnih promotora i enhansera da reaguju na IL-6 i druge signalne faktore (127). Pored

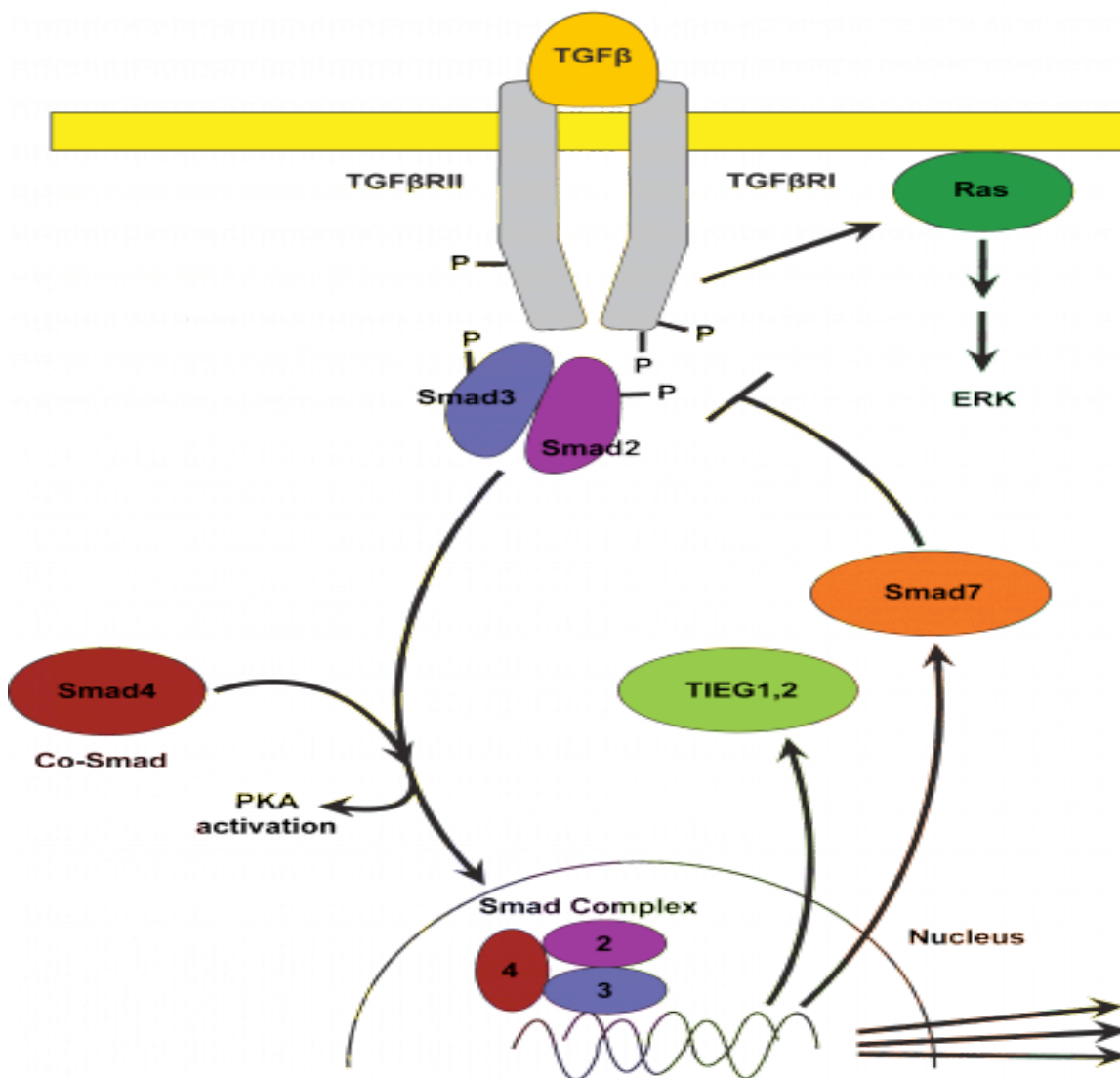
JAK/STAT i Ras/MAP puteva prenosa signala, IL-6 aktivira i PI3K i proteinski kompleks NF-Kappa B (128). PI3K/Akt/NF-KappaB kaskada finalno utiče na anti-apoptotički efekat IL-6 koji se pripisuje fosforilaciji BCL-2. IL-6 takođe blokira TGFβ indukovanu aktivaciju kaspaze 3, koja je od suštinskog značaja za programiranu ćelijsku smrt. (129). Neuspela apoptoza je jedan od glavnih razloga nastanka tumora i razvoja autoimunskih bolesti, dok neželjena apoptoza nastaje kod ishemija ili Alzheimer-ove bolesti.

IL-6 ima plejotropno dejstvo, može da deluje pro-inflamatorno i anti-inflamatorno, tj. upalno i anti-upalno. Čitav spektar različitih uticaja IL-6 na razne ćelije jasno ukazuje na veliku aktivnost i važnost ovog citokina u regulaciji imunskog odgovora i zapaljenjske reakcije. On takođe inicira imunski odgovor na traumatu, posebno na opekotine, kao i na neoplazije. I pored toga što spada u grupu Th2 citokina, IL-6 podjednako pomaže rast i naročito diferencijaciju T i B limfocita. IL-6 ne podstiče sekreciju citokina, ali povećava osetljivost imunokompetentnih ćelija na druge citokine, najverovatnije uticajem na broj i afinitet citokinskih receptora. Produkcija i sekrecija IL-6 se uvek povećava u akutnoj fazi zapaljenja, a njegova uloga kao anti-upalnog citokina se ogleda u njegovom inhibitornom delovanju na TNFα i IL-1 i aktivacijskom delovanju na IL-1Rα i IL-10. Pro-inflamatorna uloga IL-6 se ogleda u promociji Th17 diferencijacije i inhibiciji Treg diferencijacije, što ukazuje na to da kontrola IL-6 normalizuje balans između ove dve populacije ćelija i može ublažiti simptome autoimunskih bolesti. Interleukin 6 ima pro-osteoklastično dejstvo, vrši aktivaciju progenitora osteoklasta nakon čega započinje proces osteoklastogeneze ali ima i pro-osteoblastično dejstvo, direktno vršeći aktivaciju osteoblasta.

Novije studije su pokazale da IL-6 ima važnu ulogu u regulisanju ravnoteže između Th17 i Treg ćelija. Sadašnji konsenzus podržava tvrdnju da IL-6 zajedno sa TGFβ indukuje diferencijaciju Th17 ćelija. IL-6 podstiče razvoj Th17 ćelija i inhibira TGFβ indukovanu Treg diferencijaciju, ali nije neophodan za održavanje Th17 nakon diferencijacije. Poremećaj u regulaciji IL-6 može dovesti do narušavanja ravnoteže Treg/Th17, a kontrola aktivnosti ovog interleukina je potencijalno efikasan pristup u lečenju različitih autoimunskih i inflamatornih bolesti (130). Antitela na IL-6 receptor su postala novi strategijski pristup u lečenju nekih inflamatornih i autoimunskih bolesti, uključujući reumatoidni artritis - RA (131), sistemski juvenilni idiopatski artritis - JIA, Chron-ovu bolest (132), multipli mijelom, kao i sistemski eritemski lupus (133).

1.6 TGF β

Faktor transformacije rasta-beta je protein koji kontroliše proliferaciju i diferencijaciju ćelija, a postoji u tri izoforme: TGF β 1, TGF β 2 i TGF β 3, od kojih je svaka kodirana unikatnim genom. On pokazuje više važnih bioloških efekata, kao što su kontrola ćelijskog rasta, diferencijacija i migracija ćelija, produkcija intercelularnog matriksa, angiogeneza, kao i programirana ćelijska smrt, apoptoza. U isto vreme TGF β suprimira diferencijaciju i aktivnost Th1 i Th2 limfocita i smanjuje sekreciju njihovih citokina (134,135).



Modifikovano: TGF- β Pathway, The Pancreapedia

Slika 7. Šematski prikaz prenosa signala TGF β

TGF β indukuje apoptozu mnogih ćelija preko dva signalna puta: SMAD i DAXX. SMAD transkripcioni faktor čine proteini koji učestvuju u prenosu signala iz spoljašnje sredine u citoplazmu i jedro (*Slika 7.*)

Ova vrsta signalizacije omogućava da okruženje van ćelije utiče na produkciju proteina same ćelije. U SMAD signalnom putu, TGF β se vezuje za svoj tip II receptor-dimer na ćelijskoj membrani, koji vezuje tip I receptor-dimer formirajući hetero-tetramerni kompleks serin/treonin kinaza receptor, koji zatim aktivira grupu SMAD proteina zvanih SMAD proteini regulisani preko receptora - R-SMADs. R-SMADs uključuje SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5 i SMAD8/9 proteine koji se povezuju sa SMAD4 proteinom, zvanim zajednički SMAD posrednik - Co-SMAD. Ovaj kompleks zatim ulazi u ćelijsko jedro, gde deluje kao transkripcioni faktor za različite gene, uključujući i one koji aktiviraju MAP8 kinazu koja pokreće apoptozu (136,137). Kada signalni put treba da se isključi, dva SMAD proteina, SMAD6 i SMAD7, zvani inhibitorni SMAD proteini, - I-SMADs, inaktiviraju receptore na površini ćelije (138). Mutacije na SMAD genima mogu da dovedu do povećanja genske aktivnosti i abnormalne ćelijske proliferacije.

DAXX gen kodira multifunkcionalni protein koji se nalazi u jedru i citoplazmi i koji stupa u interakcije sa proteinima kao što su Fas apoptoza receptor ili TGF β receptor tip II i učestvuje u regulaciji apoptoze preko c-JUN-N terminal kinaze - JNK (139,140).

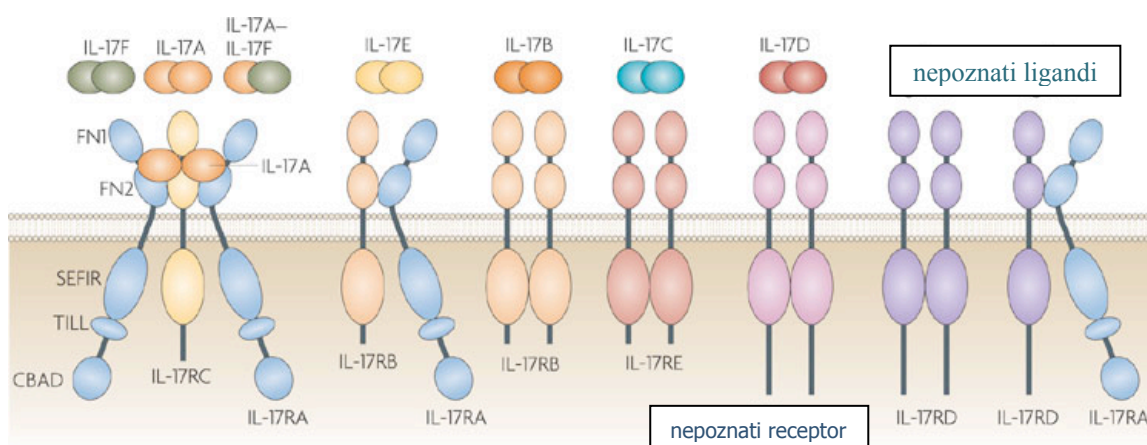
Imunomodulatorna uloga TGF β je danas potvrđena i preciznije definisana. Ovaj citokin ima značajan utjecaj na remodeliranje kosti. Deluje kao RANKL inhibitor, što se ogleda u inhibiciji osteoklastogeneze. Kao što je već rečeno, on je ključni faktor diferencijacije Th prekursora u smeru Th17 i Treg ćelija, mada je pokazano da je TGF β uključen i u nastanak Th9 pomoćničkih ćelija (102). On ima esencijalnu ulogu u nastajanju iTreg ćelija (110), dok nastanak nTreg ćelija ne zavisi od TGF β . Šta više, pokazano je da je u prisustvu IL-6 inhibirana indukcija Treg i favorizovana diferencijacija Th17 ćelija od strane TGF β (68). Noviji radovi su pokazali da kod ljudi generisanje patogenetskih Th17 ćelija može da se odvija i u odsustvu prenosa signala putem TGF β (141). TGF β učestvuje u diferencijaciji Th17 ćelija preko SMAD nezavisnih mehanizama, dok u diferencijaciji Foxp3⁺ Treg ćelija, SMAD2 i SMAD3 igraju važnu ulogu (142). U procesu diferencijacije Treg ćelija, pre vezivanja za svoje receptore TGF- β mora biti konvertovan u svoju aktivnu formu iz jednog od svoja tri latentna oblika (LTGF β - mali oblik, LTGF β +LTBP-veliki, sekretorni oblik i mLTGF β – membranski oblik). Balans Th17 i

Treg ćelija može da zavisi od prisustva drugih citokina, kao što su IL-2 ili retinoična kiselina za iTreg, odnosno IL-6, IL-1/IL-21 za Th17 ćelije (143).

Najčešće ispitivani polimorfizmi u genu za TGFβ1 su u kodonu 10, 25 i u promotorskom regionu. Polimorfizam rs1800471 (913G/C, Arg25Pro) je lociran na 25. kodonu gena za TGFβ1. Nosioci G alela u ovom polimorfizmu se odlikuju većom produkcijom TGFβ (144).

1.7 IL-17

Porodica IL-17 citokina se sastoji od najmanje 6 članova pro-inflamatornih citokina uključujući IL-17A (IL-17), IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (IL-25) i IL-17F (Slika 8.). Svi članovi porodice su sekretorni proteini sa konzerviranom strukturom i svi su disulfidno vezani dimeri, osim IL-17B, koji je nekovalentno vezan dimer (145,146). Filogenetski među članovima familije najveću homologiju sa IL-17A pokazuje IL17F, oko 50%, a dele i isti receptor. Na aminokiselinskom nivou humani IL-17 pokazuje veliku homologiju sa proteinima herpes virusa i sa IL-17 glodara, poznatim kao CTLA8 (147,148).

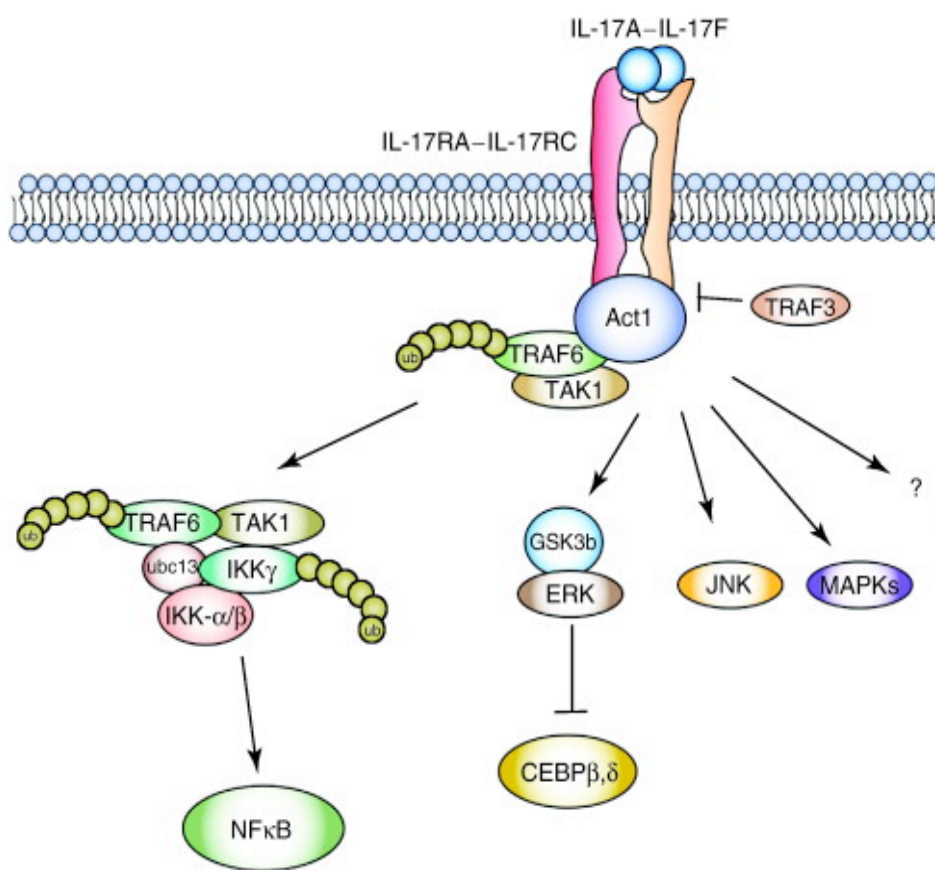


Preuzeto: Gaffen S. *Nat Rev Immunol.* 2009;9:556-67

Slika 8. Šematski prikaz porodice IL-17 citokina i njihovih receptora

Interleukin-17 - IL-17A je najznačajniji predstavnik IL-17 familije. Njega sekretuju aktivirani CD4⁺ T limfociti i to uglavnom memorijski, ali i CD8⁺ T ćelije, eozinofili, neutrofil, prirodne T ćelije ubice, dok IL-17F stvaraju CD4⁺ T ćelije i monociti. IL-17A je disulfidno vezan homodimerni glikoprotein koji sadrži 155 aminokiselina, dok IL-17F sadrži 163 aminokiseline. IL-17A ima veći značaj za razvoj autoimunosti i zapaljenje nego IL-17F, a takođe igra važnu ulogu u odbrani od bakterijskih i gljivičnih infekcija. IL17F je uglavnom uključen u mukozne odbrambene mehanizme. Njihova osnovna fiziološka funkcija je regrutovanje, aktiviranje i migracija neutrofila (149).

IL-17 su jedinstveni, budući da nemaju nikakvu sličnost sa drugim poznatim citokinima, kao ni sa bilo kojim drugim proteinima (150). Vezuju se za receptor IL-17R koji takođe nema homologiju sa bilo kojom porodicom receptora, a humani molekul pokazuje homologiju sa IL-17R miša. IL-17R ima najmanje pet varijanti: IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD i IL-17RE i distribuiran je na različitim ćelijama i tkivima. U okviru ove familije receptora najbolje je proučen IL-17RA, za koji se vezuju IL-17A i IL-17F, a prenos signala putem ovog receptora je raznolik koliko i njegova distribucija. Druga otkrivena receptorska subjedinica je IL-17RC koja je takođe zajednički receptor za IL-17A i IL-17F. Novije studije ukazuju da IL-17RA i IL-17RC formiraju heteroreceptorski kompleks. Vezivanje IL-17 za ovaj kompleks stimuliše mitogenom aktiviran protein, MAP kinazu i nukleusni faktor kapa B - NF- κ B, koji predstavljaju signale aktivacije inflamatornog odgovora (Slika 9.). IL-17A indukuje ekspresiju IL-17RA. IL-17RC, kao i IL-17RD mogu se javiti u formi membranskog ili solubilnog receptora. IL-17RB vezuje IL-17B i IL-17E (151).



Preuzeto: Jarod Z. Trends in Immunobiology. 2011;2:232-9

Slika 9. Šematski prikaz prenosa signala IL-17R

Aggravel i saradnici su 2003. godine pokazali da je sekrecija IL-17 zavisna od IL-23 (152). Kasnije, 2006. godine su Cho i saradnici otkrili da su transkripcioni faktor STAT3 i signalni put NF- κ B uključeni u IL-23 zavisnu produkciju IL-17 (153), a u skladu sa tim otkrićem Chen i saradnici su pokazali da još jedan molekul, SOCS3, igra važnu ulogu u proizvodnji IL-17. U njegovom odsustvu, IL-23 indukovana fosforilacija STAT3 se ubrzava, a fosforilisani STAT3 se vezuje za promotorski region IL-17A i IL-17F i na taj način povećavaju gensku aktivnost (154). Nasuprot tome, ima mišljenja da je indukcija IL-17 nezavisna od IL-23. Nekoliko grupa naučnika je in vitro i in vivo pokazala da lučenje IL-17 mogu da podstaknu i TGF β i IL-6, bez prisustva IL-23 (155,156).

IL17A i IL-17F produkuju i Th17 ćelije koje su povezane sa mnogim autoimunskim i malignim bolestima. IL-17 dovodi do lokalne zapaljenske reakcije, ali ima i brojne imuno-regulatorne funkcije. Najznačajnija njegova uloga je učešće u podsticanju i posredovanju imunskog odgovora. Podstiče proizvodnju drugih citokina, hemokina i prostaglandina, kao što su: IL-6, IL-1 β , IL-8, IL-21, IL-22, IL-26, TGF β , TNF α , MCP1, PGE2 od strane različitih vrsta ćelija, kao što su fibroblasti, endotelijalne ćelije, epitelijalne ćelije, keratociti i makrofagi. Poseban značaj IL-17 ima u odbrani od ekstracelularnih bakterija i gljivica kao što su: *Klebsiella pneumoniae* (157), *Bacteroides fragilis* (158) i *Toxoplasma Gondii* (159), zatim od intracelularnih bakterija: *Salmonella enteridis* (160), *Listeria monocytogenes* (161), *Campylobacter jejuni* (162) i *Micobacterium tuberculosos* (163), kao i virusa hepatita B (164) i Coxackie B3 (165). Veći broj istraživanja ukazuje na ulogu IL-17 u nastanku hroničnog artritisa. IL-17 ima ulogu kako u početnoj fazi inflamacije zgloba, tako i u destrukciji zglobne hrskavice i koštanih struktura. Ove funkcije IL-17 ostvaruje kroz stimulaciju produkcije pro-inflamatornih citokina, kao što su IL-1, TNF α , IL-6, IL-8, stimulacijom stvaranja destruktivnih enzima, kao i indukcijom povećane ekspresije liganda za receptor aktivacije NF- κ B – RANK-L koji pozitivno reguliše osteoklastogenezu (166). RANK-L je član TNF-R superfamilije i ima centralno mesto u kontroli osteoklastogeneze. Njegovu produkciju stimuliše IL-17 i na taj način pospešuje razgradnju kostiju, dok sa druge strane osteoprotegerin smanjuje produkciju osteoklasta i produkuje osteoblaste. IL-17 utiče na odnos RANK-L/osteoprotegerin i na taj način posreduje u nastanku erozije kosti, a pored toga IL-17 smanjuje koštanu masu i inhibicijom sinteze kolagena tip I (167).

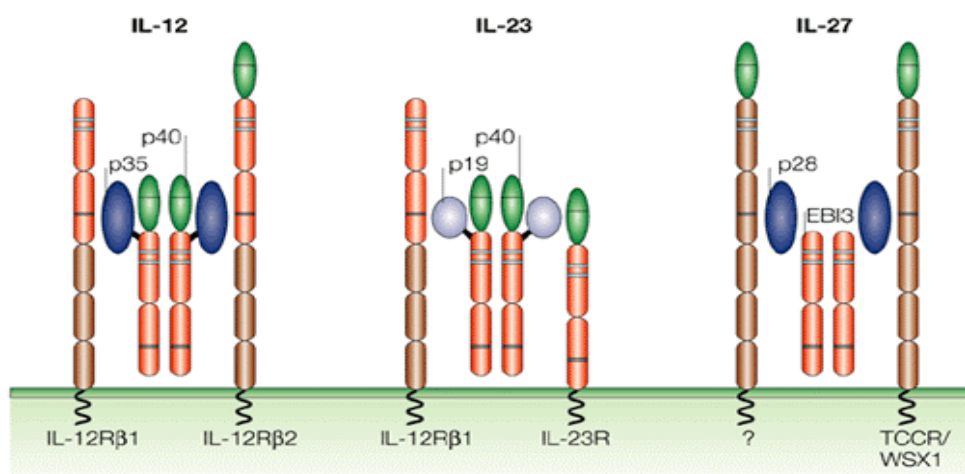
Primena anti-IL-17 terapije kod ljudi dovodi do neutralizacije bioloških efekata IL-17, regresije inflamacije i erozije kosti kao i poboljšanja kliničkih simptoma kod

reumatoidnog artritisa (168). Signifikantno povišene vrednosti IL-17 u odnosu na kontrolnu grupu registrovane su i kod Behcetove bolesti, a kod Sjögrenovog sindroma IL-17 značajno doprinosi disfunkciji pljuvačnih žlezda (169,170). U serumu bolesnika sa astmom utvrđen je povišen nivo IL-17, a njegova vrednost korelira sa težinom bolesti (171,172). IL-17 igra važnu ulogu i u patofiziologiji inflamatorne bolesti creva (173).

Alelske varijante gena citokina su povezane sa većom ili manjom produkcijom citokina. Predpostavka je da te alelske varijacije mogu da utiču na ekspresiju i/ili aktivnost IL-17, što dalje implicira njihov uticaj na nastanak autoimunskih bolesti. IL-17A i IL17F geni su mapirani na istom hromozomu na poziciji 6p12, a najčešće ispitivani polimorfizmi u genu za IL-17A je G197A, rs2275913, a genu za IL-17F je C7488T, rs763780. Nosioi alela A u polimorfizmu rs2275913 produkuju više IL-17 i imaju povećan rizik za nastanak autoimunskih bolesti, a C alel u polimorfizmu rs763780 ima protektivnu ulogu u inflamatornim bolestim. Pokazano je da su ovi polimorfizmi povezani sa reumatoidnim artritisom i ulceroznim kolitisom (174,175).

1.8 IL-23

IL-23 je, kao što je napred rečeno, heterodimer koji se sastoji od dve subjedinice, p40 koju deli sa IL-12 i p19 koja se označava i kao IL-23A (62). IL-12 i IL-23 pripadaju istoj familiji pro-inflamatornih citokina i oba citokina mogu da aktiviraju STAT4 i da stimulišu produkciju $\text{INF}\gamma$. Za razliku od IL-12 koji deluje na naivne CD4^+ T ćelije indukujući njihovu diferencijaciju u pravcu Th1 ćelija, IL-23 deluje na memorijske CD4^+ T limfocite. Receptor za IL-23 se formira od strane $\beta 1$ subjedinice IL-12 (IL-12R $\beta 1$) i od IL-23 specifične subjedinice IL-23R (Slika 11.) (176). IL-23R je asocirana sa Janus kinazom 2 - Jak2 i aktivira STAT3, dok IL-23R $\beta 1$ intereaguje direktno sa Tyrosin kinazom 2 - Tyk2. IL-23 indukovana aktivacija STAT3 dovodi do direktnog vezivanja fosforilisanog STAT3 za promotore IL17-A i IL-17F (152). STAT3 pozitivno reguliše ekspresiju ROR γ , koji ima ključnu ulogu u ekspresiji ova dva citokina (177). Pored toga, IL-23 indukovana Jak2 kinaza aktivira fosfoinositol 3 kinazu - PI3K, alfa-serin-treonin kinazu - AKT i NF-kB signalne puteve koji su takođe odgovorni za IL-17 produkciju. SOCS3 mogu suprimirati Jak2 kinazu i na taj način umanjiti IL-23 indukovanu IL-17 produkciju (178).



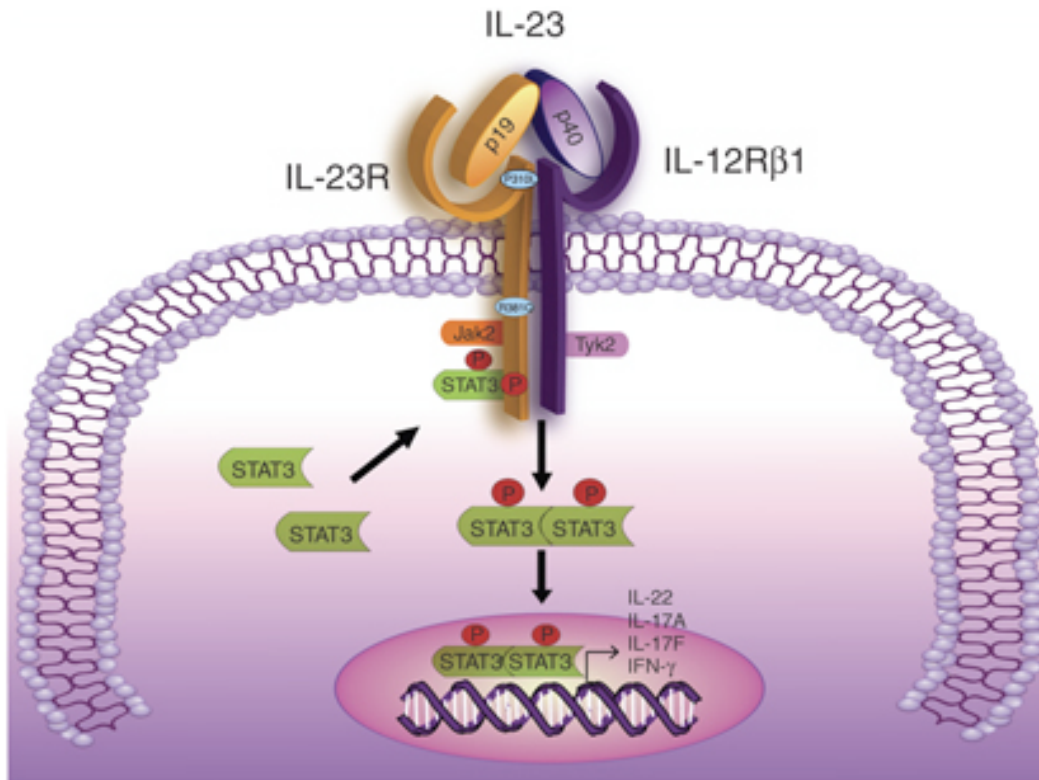
Preuzeto: Trinchieri G. *Nat Rev Immunol.* 2003;3:133-46

Slika 10. Šematski prikaz receptora za IL-12 i IL-23

IL-23 proizvode prvenstveno dendritične ćelije i makrofagi. On kao i IL-12 stimulacijom $\text{INF}\gamma$ reguliše Th1 odgovor. Međutim, IL-23 ima i jedinstvenu ulogu u održavanju Th17

ćelija i time važnu ulogu u patogenezi autoimunskih bolesti. Ekspresija IL-12R β 2 i IL-23R receptora je od ključne važnosti da li će se IL-12 ili IL-23 uključiti u diferencijaciju u pravcu Th1 ili Th17. Samo memorijske i/ili aktivirane T ćelije ekspimiraju IL-23R, naivne CD4⁺ T ćelije nemaju taj molekul, što ukazuje na ranu inhibiciju diferencijacije u pravcu Th17 ćelija. INF γ i IL-4 inhibiraju ekspresiju IL-23R na naivnim CD4⁺ T limfocitima i na taj način isključuju Th17 diferencijaciju (179).

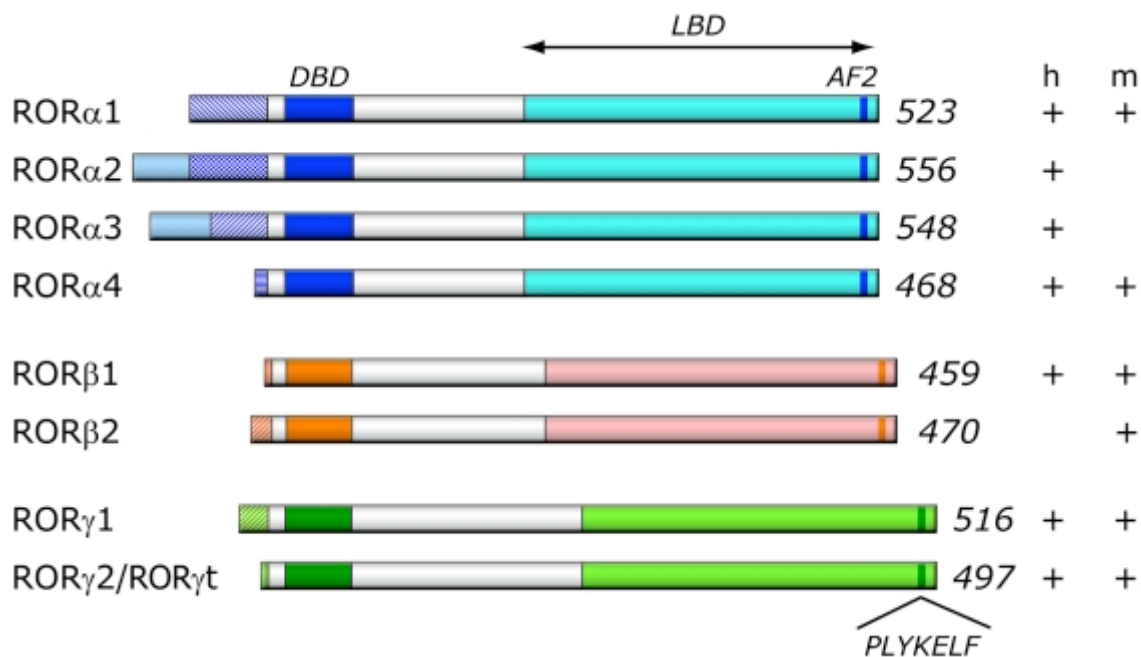
Gen za IL-23R je kod čoveka lociran na hromozomu br. 1, u regionu 1p31.3. Cho i saradnici su pokazali udruženost polimorfizama u genu za IL-23R sa inflamatornom bolešću creva, psorijazom i ankilozirajućim spondilitisom (180). Zamena arginina glutaminom na poziciji 381 u polipeptidu je varijacija koja smanjuje verovatnoću za razvoj ovih bolesti. Sve tri bolesti su povezane sa povećanom produkcijom IL-17 i prisustvom Th17 ćelija. Nisu samo polimorfizmi IL-23R gena udruženi sa oboljevanjem od IBD, već su Barrett i saradnici na preko 3.000 obolelih pokazali udruženost sa Kronovom bolešću više od 30 lokusa, uključujući STAT3, p40, Jak2 i hemokin receptor CCR6 (181).



Preuzeto: Di Cesare A et al. *J Investigative dermatology* 2009;129:1339-50

Slika 11. Šematski prikaz prenosa signala IL-23R

Vezivanje heterodimeričnog IL-23, za njegov heterodimeričan receptor, koji se sastoji od IL-12R β 1 i IL-23R, izaziva konformacione promene u citoplazmatičnom repu receptora, što dovodi do aktiviranja autofosforilacijom vezane Jak2 kinaze. Aktivirana Jak2 kinaza fosforiliše citoplazmatični rep IL-23R. To dovodi do regrutovanja STAT3 monomera iz citoplazme i do njihove fosforilacije. Aktivirani monomeri STAT3 prave dimere i ulaze u jedro gde započinju transkripciju (*Slika 12.*) (152).



Preuzeto: Jetten A. *Nucl Recept Signal.*2009;7: e003

Slika 13. Šematski prikaz strukture različitih humanih i mišjih ROR izoformi.

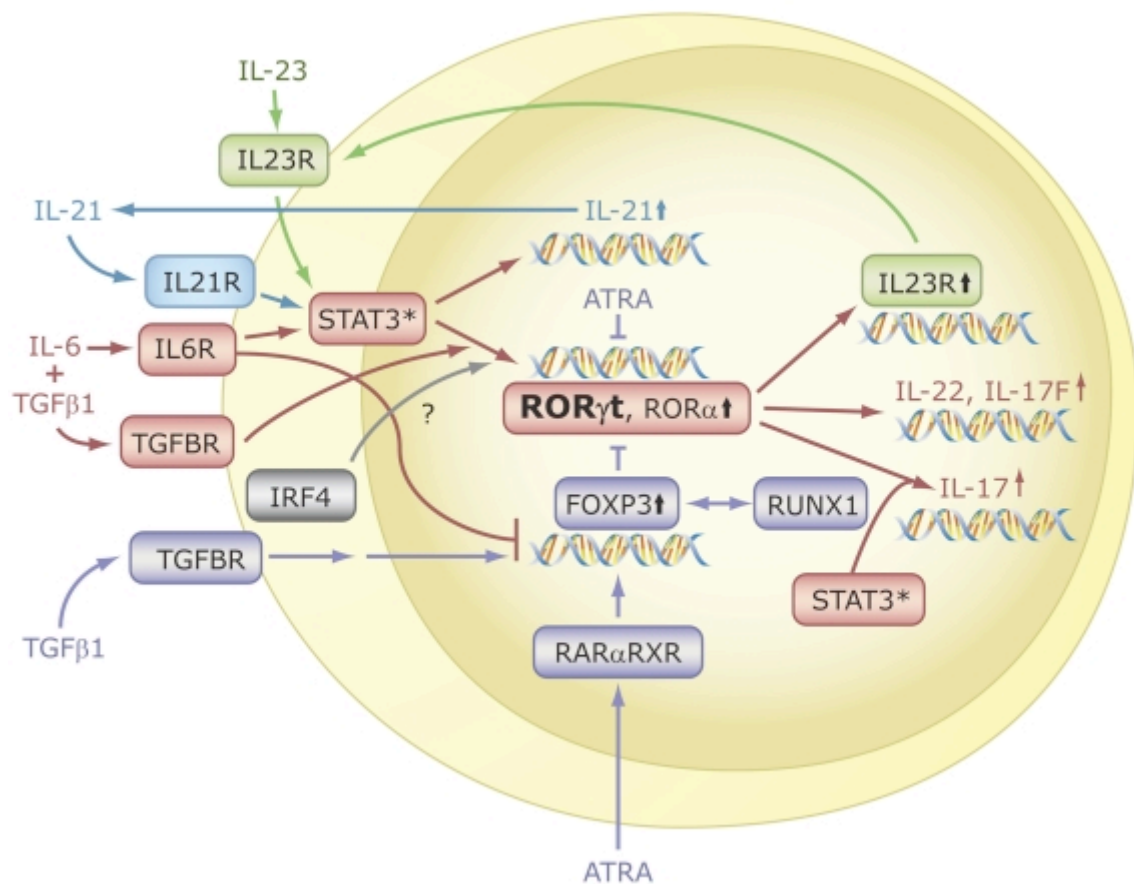
Skorašnje studije su ukazale na kritičnu ulogu ROR γ t u regulaciji diferencijacije Th17 ćelija. Naime, diferencijacija u pravcu Treg i Th17 ćelija je često recipročna, uključujući nekoliko pozitivnih i negativnih regulatornih mehanizama koji favorizuju jednu ili drugu populaciju ćelija.

ROR γ t se indukuje za vreme diferencijacije antigen stimulisanih T pomoćničkih ćelija u pravcu Th17 kao odgovor na IL-6 ili IL-21 i TGF β . IL-6 posreduje kroz aktivaciju STAT3. Deficijencija STAT3 značajno oštećuje aktivaciju ROR γ t ekspresiju i Th17 diferencijaciju, sugerišući da je ova indukcija zavisna od STAT3 (152). Nasuprot tome, deficijencija SOCS3, negativnog regulatora STAT3 aktivnosti, podstiče Th17 diferencijaciju (153). Naredne studije su pokazale da je pored ROR γ t i ROR α visoko indukovano za vreme STAT3 zavisne Th17 diferencijacije. Deficijencija ROR α redukovala je IL-17 i IL-23R ali ne i IL-17F ili IL-22 ekspresiju. Ova zapažanja su pokazala da ROR α takođe vrši pozitivnu regulaciju Th17, mada postoji razlika u stepenu njihovog učešća. Izgleda da ROR γ t ima glavnu ulogu u ovom procesu, zato što njegov nedostatak ima mnogo značajniji efekat na ekspresiju Th17 citokina nego nedostatak ROR α (185).

Diferencijacija u pravcu Th17 je udružena sa povećanom ekspresijom IL-21 i IL-23R (66,69). Indukcija IL-21 u odgovoru na IL-6 uključuje direktno vezivanje STAT3 za IL-21 promotor. IL-21 kroz aktivaciju STAT3 sinergistički deluje sa IL-6 i TGF β u indukciji ekspresije ROR γ t i IL-17. IL-21 je takođe eksprimiran na T folikularnim pomoćničkim ćelijama, novoj T ćelijskoj populaciji koja se razvija nezavisno od ROR (186). Suprotno od IL-21, indukcija IL-23R je znatno smanjena kod ROR γ deficijernih miševa što ukazuje na to da je njegova ekspresija regulisana sa ROR γ t. Sam IL-23R je deo pozitivne povratne sprege, koji dozvoljava vezivanje IL-23 i time pojačava Th17 diferencijaciju preko aktivacije STAT3 (79).

ATRA je funkcionalni ligand ROR β koji je sposban i da se veže za ROR γ i da inhibira ROR γ posredovanu transaktivaciju. ATRA je proizveden od strane dendritičnih ćelija i negativno reguliše Th1 i Th2 diferencijaciju. ATRA takođe inhibira indukciju Th17 diferencijacije, represira ekspresiju IL-23R i IL-6 α i negativno reguliše ekspresiju ROR γ t u odgovoru na TGF β i IL-6 i umesto toga promovise Foxp3 ekspresiju i subsekventno generiše Treg ćelije. Precizni mehanizam na koji ATRA inhibira ROR γ t i indukuje Foxp3 još nije razjašnjen, mada zbog toga što IL-2 indukuje Foxp3 ekspresiju putem STAT5, možda ATRA može da pospeši Foxp3 ekspresiju kroz povećanje IL-2 ekspresije i STAT5 aktivacije (187,188). Inhibicija Th17 diferencijacije ATRA-om može objasniti protektivni efekat retinoida u animalnim modelima u autoimunskim bolestima. Ova supresija izgleda da je u vezi sa inhibicijom Th17 pre nego sa povećanjem Treg ćelija.

U prisustvu TCR-a, tretman CD4⁺ T ćelija sa IL-6 i TGF β 1 indukuje diferencijaciju u pravcu Th17 i aktivaciju određenih gena uključujući gene za IL-21, ROR α , ROR γ t, IL-17, IL-17F, IL-22, i IL-23R. Interakcija IL-23 i IL-21 sa IL-23R i IL-21R pojačava Th17 diferencijaciju i ekspresiju ROR. ROR α i ROR γ t su potrebni za indukciju IL-17, IL-17F i IL-23R, ali ne i za IL-21. Ravnoteža između Foxp3, koja je indukovana samo tretmanom sa TGF β , određuje da li će se CD4⁺ T ćelije diferencirati u Th17 ili Treg ćelije. ATRA, kroz aktivaciju RAR α -RXR kompleksa, vodi do povećane Foxp3 i smanjene ROR ekspresije. Foxp3 inhibiše transkripcionu aktivnost ROR α i ROR γ t interreagujući direktno sa ROR i pri tom izazivajući diferencijaciju u pravcu Treg i inhibišući Th17 diferencijaciju (*Slika 15.*) (189).



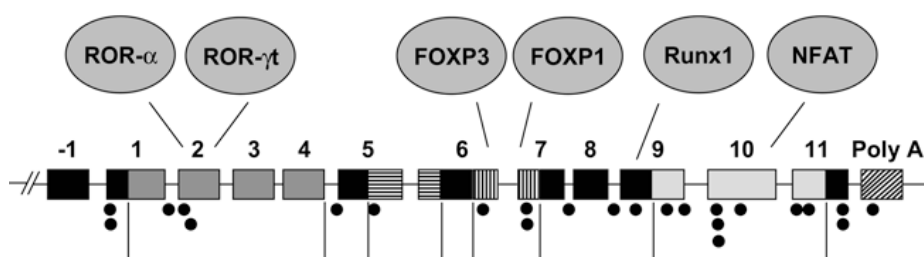
Preuzeto: Jetten A. Nucl Recept Signal.2009;7: e003

Slika 14. Šematski prikaz uloge ROR γ t u Th17 ćelijskoj diferencijaciji

Tokom proteklih godina postala je sve jasnija centralna uloga ROR γ t u diferencijaciji Th17 ćelija. Povišen nivo IL-17 u autoimunskim bolestima ukazao je istovremeno na mogućnost da ROR γ t bude odlična meta za farmakološke manipulacije i atraktivnu terapijsku strategiju u različitim bolestima sa inflamatornom etiologijom (190).

1.10 Transkripcion faktor Foxp3

Foxp3 je specifičan transkripcioni faktor koji je glavni regulator razvoja i funkcije Treg ćelija. Kodiran je genom od 11 egzona koji pripada familiji Fox gena i nalazi se na Xp11.23 hromozomu. Humanu Fox familiju čini 43 člana, podeljena u tri subfamilije: Foxp1, Foxp2 i Foxp3, a njihova disregulacija dovodi do urođenih poremećaja i različitih tumora (Slika 16.) (191).



Preuzeto: „Forkhead Transcription Factors: Vital Elements in Biology and Medicine“,
Alicia N. et all. *Molecular Regulation of Cellular Immunity by FOXP3*

Slika 15. Šematski prikaz Foxp3 gena

Foxp3 protein ima 431 amino kiselinu i molekulsku težinu od 47,25kDa. Sadrži 4 potencijalno aktivna domena uključujući represor domen ZF. Represorni domen je lociran na N-terminalnom kraju i potreban je za represiju NFAT i NFκB posredovanu transkripcionu aktivnost (192). Foxp3, takođe, ima ulogu transkripcionog aktivatora mnogih gena, uključujući CD25, CTLA4, GITR i folat receptor 4. Foxp3⁺ ćelije nastaju u timusu i na periferiji. One koje su nastale u timusu migriraju u sekundarne limfoidne organe i suprimiraju antigen priming limfocita. Prvi susret sa antigenom naivnih Foxp3⁺ i naivnih Foxp3⁻ ćelija dovodi do nastanka Foxp3 memorijskih ćelija koje su efikasne u migraciji u nelimfoidno tkivo. Memorijske Foxp3⁺ T ćelije suprimiraju efektorsku T ćelijsku funkciju, dok naivne Foxp3⁺ T ćelije suprimiraju rani imunski odgovor u limfoidnom tkivu. Obe vrste, naivne i memorijske Foxp3⁺ T ćelije su potrebne za održavanje tolerancije i prevencije autoimunskih bolesti (193).

Mutacije u Foxp3 genu imaju uglavnom za posledicu smanjeni broj ili potpuno odsustvo Treg ćelija, uzrokujući multiple autoimunske poremećaje prisutne kod onih koji imaju

sindrom IPEX. Pacijenti koji boluju od različitih vrsta autoimunskih bolesti imaju relativnu disfunkciju Foxp3+ ćelija. Pacijenti oboleli od različitih vrsta tumora imaju povećan broj Foxp3+ Treg ćelija koje inhibiraju sposobnost organizma da suprimira nastajanje kancerogenih ćelija. Somatske mutacije u Foxp3 genu su najčešće kod tumora dojke, prostate i ovarijuma (194).

Treg i Th17 ćelije su recipročno regulisane, uključujući i nekoliko pozitivnih i negativnih regulatornih mehanizama. Balans između ekspresije ROR γ t i Foxp3 igra ključnu ulogu u determinaciji razvoja naivnih T ćelija u pravcu Treg ili Th17. Foxp3 sadrži represorni domen na N-terminalnom kraju i aktivni domen na C-terminalnom kraju, što omogućava da protein ima funkciju aktivatora ili represora genske transkripcije. Foxp3 je predominantno eksprimiran na CD4+ CD25+ Treg ćelijama. Foxp3 deficitnim miševima nedostaju Treg ćelije i oni su osetljivi na inflamatorne bolesti. Nasuprot tome, indukcija ili endogena ekspresija Foxp3 inhibira Th17 diferencijaciju.

Regulacija Foxp3 ekspresije putem IL-6 i TGF beta igra važnu ulogu u Th17/Treg diferencijaciji. TGF β indukuje Foxp3 ekspresiju i Treg diferencijaciju kod zamorca. Iako TGF β može da poboljša ekspresiju ROR α i ROR γ t, Foxp3 se indukuje mnogo više, pa se ravnoteža ROR/Foxp3 pomera ka Foxp3 i Treg diferencijaciji. Dodatno IL-6 i IL-21 inhibiraju indukciju Foxp3 od strane TGF β i aktiviraju ROR α i ROR γ t ekspresiju, čime se ravnoteža ROR/Foxp3 pomera u korist Th17 diferencijacije (112). Ova zapažanja ukazuju na to da Foxp3 potiskuje Th17 diferencijaciju antagonizujući ROR γ t funkciju pre nego inhibirajući njegovu ekspresiju. Ovaj antagonizam je posredovan kroz direktnu interakciju Foxp3 sa ROR α i ROR γ t. Pored toga u nedavno objavljenim rezultatima Knops i saradnika, potvrđena je uloga SOCS2 proteina u inhibiciji razvoja Th2 ćelija i regulaciji stabilnosti iTreg ćelija (195).

Brojni drugi citokini i transkripcioni faktori utiču na balans Treg i Th17 diferencijaciju. Za razliku od IL-6, IL-21 i IL23, IL-2 inhibiše ROR γ t ekspresiju i Th17 diferencijaciju preko STAT5 zavisnog mehanizma i promovise generisanje Treg ćelija. IL-10 inhibira Th1 diferencijaciju, ali takođe suprimira i Th17 diferencijaciju i ekspresiju ROR γ t i IL-17. Štaviše, tretiranje IL-10+ makrofaga sa LPS značajno indukuje ekspresiju ROR γ t i IL-17. Pored toga IRF4 je potreban za Th17 diferencijaciju, IRF4 je važan za IL-21 indukovanu Th17 diferencijaciju. Ekspresija ROR α , ROR γ t i IL-17 je značajno redukovana kod IRF4 deficitnih T ćelija, dok je Foxp3 povećan, što indikuje da IRF4

takođe ima ulogu u regulisanju ravnoteže između Th17 i Treg ćelija. Ovaj balans je pod kompleksnom kontrolom u koju su uključeni mnogi transkripcioni faktori (196).

Kod Treg ćelija je ustanovljeno nekoliko molekula i puteva aktivacije Foxp3 ekspresije. TGF β preko SMAD signalnog puta, IL-2 putem STAT5 i INF γ preko STAT1 daju pozitivnu signalizaciju za aktivaciju ekspresije Foxp3 u Treg ćelijama (91). Foxp3 ekspresija nije regulisana samo transkripcionim faktorima već i epigenitičkim mehanizmima, metilacijom DNK molekula i remodelovanjem hromatina, što podrazumeva određene promene u acetilaciji histona.

Zanimljiva je epigenitička kontrola FOXP3 lokusa. Epigenitičke modifikacije podrazumevaju nasledne i reverzibilne promene funkcije gena bez promene DNK sekvence u genomu. Dodavanjem (ili oduzimanjem) acetilnih i metilnih grupa na DNK molekul ili na aminokiseline koje grade histone, dolazi do drugačijeg pakovanja DNK molekula i do promene dostupnosti pojedinih gena u procesu prepisivanja. Metilacija molekula DNK u biohemijskom smislu predstavlja kovalentno vezivanje metilne grupe na 5' atom ugljenika, što se dešava pre svega u CpG ostrvcima. CpG ostrvca su područja u promotorskom regionu gena od oko 500bp koja poseduju više od 55% nukleotida sa bazama G+C. U funkcionalnom smislu metilacija DNK molekula dovodi do inaktivacije gena, a demetilacija DNK i acetilacija histona dovode do aktivacije gena. Na taj način se omogućava „uključivanje“ i „isključivanje“ pojedinih gena, što se odražava na transkripciju i može da rezultira smanjenom ekspresijom gena ili disfunkcijom proteina.

U Foxp3 lokusu opisano je više epigenitičkih markera, kao što su acetilacija i metilacija histona i metilacija citozinskog ostatka u CpG dinukleotidima kod naivnih CD4+CD25-T ćelija, aktiviranih CD4+ ćelija i TGF β - indukovanih, iTreg ćelija, dok su prirodne, nTreg ćelije, kompletno demetilovane. DNK metiltransferaza je asocirana sa Foxp3 lokusom kod CD4+ ćelija a metilacija CpG rezidua potiskuje Foxp3 ekspresiju (197,198).

2.0 RADNA HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

2.1 Radna hipoteza

Predpostavka ovog istraživanja je da kod obolelih od AFS postoji pojačan Th17 odgovor i da su citokini IL-6, TGF β , IL-17, IL-23 i transkripcioni faktori ROR γ t i Foxp3 uključeni u inicijaciju ili održavanje Th17 odgovora.

Prisustvo polimorfnih varijanti u genima za IL-17, IL-23, TGF i IL-6, transkripcione faktore ROR γ t i Foxp3, može biti povezano sa nastankom antifosfolipidnog sindroma ili sa nekim kliničkim simptomima bolesti.

Ovakvim ispitivanjem je moguće otkrivanje novih gena udruženih sa AFS i sa autoimunskim i inflamatornim odgovorom, a stižu se nova saznanja o etiologiji i patogenezi AFS, dok bi dobijeni rezultati mogli da omoguće novi pristup prevenciji i lečenju ove bolesti.

2.2 *Ciljevi istraživanja*

Predmet istraživanja ove doktorske disertacije je analiza polimorfizama gena značajnih za diferencijaciju Th17 i T regulatornih ćelija kod bolesnika sa antifosfolipidnim sindromom. U skladu sa tim, definisali smo sledeće ciljeve istraživanja:

1. Da se ispita da li je koncentracija citokina IL-17, IL-23, TGF β i IL-6 povećana kod obolelih od AFS
2. Da se utvrdi učestalosti genotipova i alela odabranih polimorfizama gena za IL-17, IL-23, TGF β , IL-6, ROR γ t i Foxp3 u grupi ispitanika sa primarnim, sekundarnim AFS i u kontrolnoj grupi ispitanika.
3. Da se analizira da li postoji povezanost genotipa u polimorfnim lokusima gena za IL-17, IL-23, TGF β i IL-6 sa koncentracijom odgovarajućih citokina
4. Da se analizira da li postoji povezanost genotipa u ispitivanim polimorfnim lokusima sa imunološkim i kliničkim simptomima bolesti

3.0 METODOLOGIJA

3.1 Ispitanici

Ovim ispitivanjem je obuhvaćeno 100 bolesnika bele rase, obolelih od antifosfolipidnog sindroma, koji su selektovani u dve grupe: primarni AFS, grupa PAFS i sekundarni AFS, najčešće udružen sa SLE, grupa SAFS. Obe grupe broje po 50 pacijenata, a kontrolnu grupu čini 50 zdravih osoba odgovarajućih po polu i uzrastu.

Laboratorijska dijagnostika je obuhvatala imunološka i genitička ispitivanja. Imunološka ispitivanja su rađena u Imunološkoj laboratoriji KBC „Bežanijska kosa“ i u Institutu za imunologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu. U KBC „Bežanijska kosa“ vršena je detekcija antinuklearnih antitela - ANA, indirektnom imunofluorescencom - IIF, detekcija anti dsDNK, anti KL i anti β_2 GP-I antitela primenom ELISA metode, kitom „Bindingsite“. Anti Ro i anti La antitela, SS-A i SS-B, su određivana ImmunoCAP metodom. Koncentracija IL-6 je merena elektro-hemi-luminescencijom - ECL na aparatu „Elecsys 2010“. U Institutu za imunologiju Medicinskog fakulteta je merena koncentracija IL-17, IL-23 i TGF β , ELISA metodom, kitom „eBioscience“.

Tabela 1. Ispitivani polimorfizmi i njihove pozicije

<i>Polimorfizam</i>	<i>Citokin</i>	<i>Hromozom</i>	<i>Pozicija</i>
<i>rs2275913</i>	IL-17A	6	52051033
<i>rs763780</i>	IL-17F	6	52100739
<i>rs11209026</i>	IL-23	1	67705958
<i>rs1800795</i>	IL-6	7	22766645
<i>rs1800471</i>	TGF β	19	41858876
<i>rs9826</i>	ROR γ t	1	151778899
<i>rs3761548</i>	Foxp3	X	49118241

Molekularno-genetička ispitivanja su vršena u Institutu za humanu genetiku Medicinskog fakulteta i Institutu za neurologiju Kliničkog centra Srbije (*Tabela 1.*). DNK je izolovana iz zamrznute krvi ispitanika putem Wizard Genomic DNA Extraction Kit Promega i klasičnom metodom iseljavanja. U molekularno-genetičkoj laboratoriji Instituta za humanu genetiku je metodom alel-specifičnog PCR analiziran genski polimorfizam u genima za IL-6 i TGF β , a u laboratoriji za genetičku i molekularnu dijagnostiku Instituta za neurologiju su detektovani polimorfizmi u genima za IL-17A, IL-17F, IL-23, ROR γ t i Foxp3 putem Real time PCR tj. Q-PCR metode na aparatu ABI Prism 7500 Real-Time PCR System, Applied Biosystems, U.S.A.

3.2 *Izolacija genomske DNK iz nuklearnih ćelija*

Limfociti periferne krvi su najpristupačniji za izolaciju genomske DNK. Uzima se 10ml venske krvi sa antikoagulansom (Na-citrat, EDTA) i inkubira 10-15min na ledu sa istim volumenom pufera za lizu (0,32M saharoza, 10mM Tris, 1% Triton100, 5mM MgCl₂).

Smeša se centrifugira 10-15min na 2.000-3.000 rpm, supernatant se odbaci, a pelet se resuspenduje u 5-10ml pufera (0,075M NaCl, 0,025M EDTA pH 8,0) nekoliko puta, dok pelet ne pobeli. Posle svakog ispiranja se vrši centrifugiranje 15min na 2.000-3.000rpm. Višestrukim ispiranjima se odstranjuju membrane liziranih ćelija.

Nakon poslednjeg ispiranja odlije se supernatant, a talogu se doda 3ml pufera A (10mM Tris HCl, 400mM NaCl, 2mM EDTA pH 8,0), 200μl 10% SDS i 50μl rastvora proteinaze K (10mg/ml). Uzorak se dobro resuspenduje i ostavi preko noći na 37⁰C.

Sledećeg dana se doda 1ml 6M NaCl i snažno mućka dok rastvor ne pobeli. NaCl povećava rastvorljivost DNK. Rastvor se zatim centrifugira 15min na 3.000rpm, da se proteini istalože, a supernatant se prenese u čistu epruvetu od 10ml. Ovaj proces precipitacije proteina se ponovi još dva puta.

Posle poslednjeg centrifugiranja supernatant se odvoji u čistu graduisanu epruvetu, doda se isti volumen izopropanola i pažljivim mućkanjem DNK precipitira u vidu beličastog končića koji se namota na zakrivljenu Pasterovu pipetu i potopi 30sec. u 70% ledeni etanol. DNK se osuši na vazduhu tridesetak sekundi, i postupak se ponovi nekoliko puta, a zatim se DNK rastvori u 500μl TE pufera (10mM Tris HCl, 1mM EDTA pH 8,0).

Koncentracija DNK u rastvoru se određuje preko apsorbancije na $\lambda=260\text{nm}$ za DNK i $\lambda=280\text{nm}$ za rezidualne proteine. Absorbanciju od 1OD daje 50μg/ml dvolančane DNK. Formula za dobijanje koncentracije DNK je:

$$\text{DNK}_{\text{conc}} = A_{260\text{nm}} \times 50\mu\text{g/ml} \times \text{razblaženje}$$

Odnos absorbancija na $\lambda=260\text{nm}$ i $\lambda=280\text{nm}$ ($A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$) daje informaciju o čistoći dobijenog uzorka. Ukoliko je odnos absorbancija 1,8-2,0 uzorak je visoke čistoće, a ukoliko je taj odnos manji od 1,8 u uzorku postoji kontaminacija proteinima.

Reakciona smeša (25 μl) imala je sastav:

10x PCR pufer	2,5 μl
dNTP (2,5mM svaki)	0,5 μl
R prajmer (300ng/ μl)	0,5 μl
F prajmer (300ng/ μl)	0,5 μl
MgCl ₂ (50mM)	2,0 μl
DNK (100ng/ μl)	10,0 μl
reH ₂ O	do 25,0 μl
vodeni rastvor Taq (10mM) 6,8 μl dH ₂ O+0,2 μl Taq)	7,0 μl

3.3 Alel specifični PCR

IL-6 i TGF β genotip kod ispitanika određivan je primenom metode alel-specifični PCR (Slika 17.). U ovoj metodi jedan prajmer je univerzalan, bez obzira na genotip, a drugi je konstruisan u dva oblika, koji odgovaraju različitim alelnim formama. U ispitivanju polimorfizma u genu za IL6 nukleotid na 3' kraju Fw prajmera je bio C odnosno G, što omogućava komplementarno vezivanje za G odnosno C alel na ispitivanoj poziciji. Sa svakim uzorkom DNK rađene su po dve PCR reakcije: sa parom prajmera Fw(C) i Rv i sa parom prajmera Fw(G) i Rv. Amplifikacija u samo jednoj reakciji ukazuje na homozigotan genotip za dati alel (CC ili GG), dok amplifikacija u obe reakcije govori o heterozigotnom genotipu (CG). U analizi polimorfizma u genu za TGF β Fw prajmer je bio stalan, a Rv prajmer je bio alel-specifičan, sa istim genotipskim kombinacijama kao i kod IL6 polimorfizma. Za umnožavanje regiona u okviru kojih se nalaze tačkasti polimorfizmi korišćeni su sledeći prajmeri:

IL-6

Fw(C): 5' CCCTAGTTGTGTCTTGCC 3'

Fw(G): 5' CCCTAGTTGTGTCTTGCG 3'

Rv: 5' GAGCTTCTCTTTCGTTCC 3'

TGF β

Fw: 5' GGC.TCC.GGT.TCT.GCA.CTC 3'

Rv(C): 5' GTG.CTG.ACG.CCT.GGC.CC 3'

Rv(G): 5' GTG.CTG.ACG.CCT.GGC.CG 3'

Reakciona smeša za PCR volumena 25ml imala je sastav:

10x PCR pufer

2,5 μ l

10mM dNTPs	0,5 µl
R prajmer (300ng/µl)	0,5 µl
F prajmer (300ng/µl)	0,5 µl
MgCl ₂ (25mM)	1,5 µl
Taq polimeraza (5U/ µl)	0,2 µl
DNK (300ng/µl)	1,0 µl
reH ₂ O	do 25,0 µl

PCR reakcija izvođena je u aparatu ABI Thermal Cycler, a uslovi PCR reakcije bili su: početna denaturacija na 95⁰C u trajanju od 5 min, zatim 40 ciklusa sa tri koraka: denaturacija na 94⁰C u trajanju od 45 sek, hibridizacija prajmera na 59,50⁰C u trajanju od 45 sek, ekstenzija na 72⁰C u trajanju od 1 min, i na kraju završna ekstenzija na 72⁰C u trajanju od 7 min. Produkt PCR reakcije imao je dužinu od 190 bp za IL6 odnosno 233bp za TGFβ lokus.

```

Y00081 -219 TCAATGACGACCTAAGCTGCACTTTTCCCCCTAGTTGTGTCTTTGGGATGCTAAAGGACGT
Consensus TCAATGACGACCTAAGCTGCACTTTTCCCCCTAGTTGTGTCTTTGGGATGCTAAAGGACGT -174G ->C
Y00081 -159 CACATTGCACAATCTTAATAAGGTTTCCAATCAGCCCCACCCGCTCTGGCCCCACCCTCA
Consensus CACATTGCACAATCTTAATAAGGTTTCCAATCAGCCCCACCCGCTCTGGCCCCACCCTCA
Y00081 -99 CCCTCCAACAAAGATTTATCAAATGTGGGATTTTCCCATGAGTCTCAATATTAGAGTCTC
Consensus CCCTCCAACAAAGATTTATCAAATGTGGGATTTTCCCATGAGTCTCAATATTAGAGTCTC

```

Slika 16. Deo sekvence promotorskog regiona gena IL-6 sa polimorfizmom -174G/C (obeležen crvenom bojom)

3.4 Poliakrilamidna gel elektroforeza

Uspešnost PCR reakcije i produkti umnožavanja DNK proveravani su gel elektroforezom na 8% PAA gelu u puferu 1xTBE, pH 8.0, pri naponu od 230 V u trajanju oko dvadeset minuta. Elektroforeza se zasniva na činjenici da su makromolekuli različitog hemijskog sastava, a time se razlikuju po veličini, konformaciji, tipu i količini naelektrisanja koje nose. Sve ovo rezultira u njihovoj različitoj pokretljivosti, što je iskorišćeno za razdvajanje aminokiselinskih i polinukleotidnih fragmenata na gelu pri delovanju električne struje. Suština gel elektroforeze je u tome što se negativno naelektrisane čestice fosfatne grupe sa spoljašnje strane molekula DNK kreću ka anodi u električnom polju. Sastav gela bio je sledeći:

40% Acrylamide, 2 ml (8%)

5xTBE (Tris, borna kiselina i EDTA) koji deluje kao pufer, 2 ml

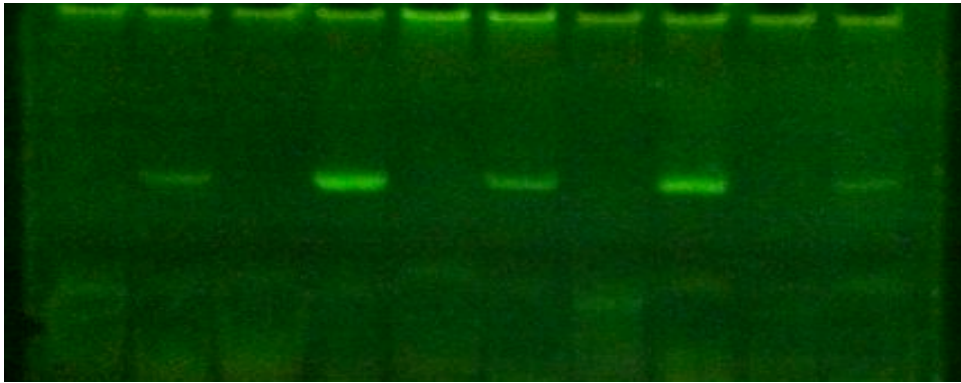
H₂O, 6 ml

APS (amonijum persulfat) koji je katalizator, 70 µl

TEMED (tercijarni amin) koji inicira polimerizaciju, 13 µl
Ksilen cianol/ Bromfenol plavo za vizualizaciju uzorka

Gelovi su pripremani tako što su svi sastojci dodavani navedenim redosledom i ta smeša sipana je u kalupe za gel i ostavljena da polimerizuje na sobnoj temperaturi. Pripremljeni amplifikati su bojeni bojama ksilen cianol i bromtilen plavo radi lakše vizuelizacije razdvajanja prilikom elektroforeze i sipani u bunarčiće na gelu. Elektroforeza se vršila u sistemu za elektroforezu pod konstantnim naponom od 230 V.

Po završetku elektroforeze za bojenje gela korišćena je fluorescentna boja EtBr - etidijum bromid, a produkti PCR reakcije vizualizovani su prosvetljavanjem gelova na UV transiluminatoru ($\lambda=254\text{nm}$). Prisustvo diskretne trake određene dužine ukazivalo je na uspešnu amplifikaciju promotorskog regiona gena. U slučaju da je došlo do amplifikacije samo u jednoj reakciji (za svaki uzorak rađene su po dve reakcije), radilo se o homozigotnom genotipu, GG ili CC, međutim ako se amplifikacija mogla vizualizovati za oba prajmera, radilo se o heterozigotnom genotipu G/C (*Slika 18.*).



Slika 17. Elektroforetski akrilamidni gel koji je služio za proveru PCR reakcije i genotipizaciju kod alel-specifičnog PCR-a

3.5 *Real-time PCR (Q-PCR)*

Real-time PCR (PCR u „realnom“ vremenu) je postupak koji se temelji na standardnom PCR-u, ali se analiza produkata vrši kontinuirano, što omogućava pouzdanu kvantifikaciju. Rezultati dobijeni detekcijom PCR produkata nakon gel-elektroforeze, tradicionalnom PCR metodom, nisu dovoljno pouzdani zbog toga što se detekcija vrši u završnoj fazi, nakon platoa, kada je već istrošen veliki deo reakcionih komponentata sistema i kada je veliki deo nastalih PCR produkata zahvaćen degradacionim procesima. RQ-PCR metodom detekcija PCR amplifikacije vrši se u eksponencijalnoj fazi, u kojoj se amplifikacija najbrže dešava, a reakcija je u ovoj fazi visoko specifična i precizna. Takođe, RQ-PCR pouzdaniji je od tradicionalnog PCR-a, jer omogućava detekciju razlike u amplifikaciji ispitivanih uzoraka od samo 2x, dok običan PCR detektuje razliku u amplifikaciji tek ako je ona 50x ili veća. Detekcija putem RQ-PCR-a se vrši na nekom od ciklusa, koji su sastavni deo eksponencijalne faze, a podrazumeva detekciju fluorescencije, emitovane od strane fluorescentne probe, koja se koristi kao sistem za detekciju.

TaqMan proba na svojim krajevima ima prikačenu reportersku (R) i prigušivačku (Q) boju. Kada je TaqMan proba slobodna ili vezana za DNK molekul, prigušivačka boja blokira emisiju fluorescencije sa reporterske boje. Reporterska boja vezana je za 5' kraj TaqMan probe, dok je prigušivačka boja vezana za 3' kraj. Nakon denaturacije DNK u fazi hlađenja kada se za DNK matricu aniluju prajmeri, dolazi do vezivanja i TaqMan probe za specifičan region na DNK (jedna TaqMan proba po jednom molekulu DNK matrice).

Nakon toga u fazi u kojoj Taq polimeraza 5'-3' polimeraznom aktivnošću dodaje nukleotide, istovremeno dolazi i do uklanjanja TaqMan probe sa DNK matrice 5'-3' egzonukleaznom aktivnošću. Ovim procesom udaljava se prigušivač od reportera i emituje se fluorescencija od strane reporterske boje, pošto se prigušivačka boja više ne nalazi na odgovarajućoj udaljenosti od reportera, te nema blokade emisije.

Polimorfizam koji potiče od razlike u jednom jedinom nukleotidu, između dve alelne forme može se dektovati korišćenjem Q-PCR metode. U tu svrhu obično se koriste 2 TaqMan probe koje se razlikuju u jednoj bazi od interesa i obeležene su različitim

bojama, te emituju različitu fluorescenciju. Ukoliko aparat detektuje jednu boju – prisutan je jedan alel; ukoliko detektuje drugu boju – prisutan je drugi alel; dok detekcija obe boje označava prisustvo heterozigota. Ovaj RQ-PCR urađen je na uređaju ABI Prism 7500 Real-Time PCR System, Applied Biosystems, U.S.A. Korišćeni su TaqMan SNP Genotyping Assays sa dve TaqMan probe obeležene „VIC®“ i „FAM®“ fluorescentnom bojom. Dobijeni rezultati su obrađeni primenom programa 7500 Software, Applied Biosystems, U.S.A. (Slika 20. i 21.).

Za izvođenje PCR reakcije korišćeni su oligonukleotidi na osnovu rezultata analiza koji se nalaze u bazi podataka National Center for Biotechnology Information. Na osnovu ovih podataka sintetisane su specifične oligonukleotidne probe i setovi prajmera za IL-17A, IL-17F, IL-23, ROR γ t i Foxp3, koji su komercijalno dostupni. U reakciji amplifikacije upotrebljena je reakciona smeša 2x za PCR.

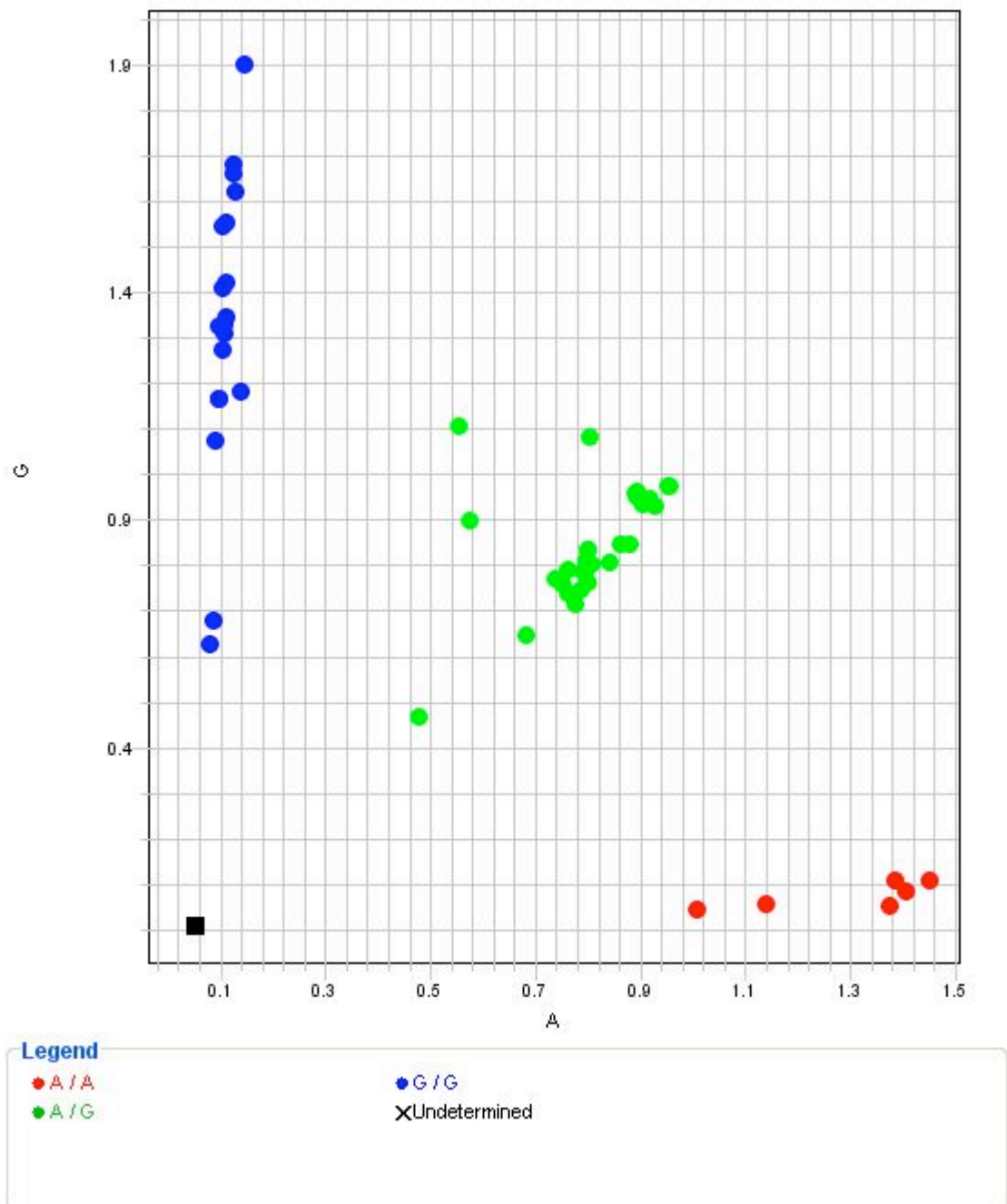
Reakciona smeša:

TaqMan RT-PCR master mix 2x	7,50 μ l
primer and probe mix 20x	0,75 μ l
DNK	2,25 μ l
reH2O	do 15,00 μ l

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	K1 rs2275913	K2 rs2275913	K3 rs2275913	K4 rs2275913	K5 rs2275913	K6 rs2275913	K7 rs2275913	K8 rs2275913	K9 rs2275913	K10 rs2275913	K11 rs2275913	K12 rs2275913
B	K13 rs2275913	K14 rs2275913	K15 rs2275913	K16 rs2275913	K17 rs2275913	K18 rs2275913	K19 rs2275913	K20 rs2275913	K21 rs2275913	K22 rs2275913	K23 rs2275913	K24 rs2275913
C	K25 rs2275913	K26 rs2275913	K27 rs2275913	K28 rs2275913	K29 rs2275913	K30 rs2275913	K31 rs2275913	K32 rs2275913	K33 rs2275913	K34 rs2275913	K35 rs2275913	K36 rs2275913
D	K37 rs2275913	K38 rs2275913	K39 rs2275913	K40 rs2275913	K41 rs2275913	K42 rs2275913	K43 rs2275913	K44 rs2275913	K45 rs2275913	K46 rs2275913	K47 rs2275913	K48 rs2275913
E	K49 rs2275913	K50 rs2275913	S9 rs2275913	S21 rs2275913	S23 rs2275913	S26 rs2275913	S30 rs2275913	S41 rs2275913	F45 rs2275913			
F												
G												
H												K5 rs2275913

Slika 18. Tabela prikaz rezultata Q-PCR reakcije za rs2275913

Allelic Discrimination Plot



3.6 *Statistička obrada podataka*

U obradi podataka korišćene su metode deskriptivne i analitičke statistike.

U okviru deskriptivne statistike, za ispitivane varijable određivani su relativni odnosi (procenti), srednja vrednost, minimalna i maksimalna vrednost i standardna greska.

Provera normalnosti raspodele izvršena je primenom Kolmogorov-Smirnovljevog testa.

U okviru analitičke statistike, za procenu značajnosti razlike između grupa korišćeni su Studentov t test, odnosno analiza varijanse (ANOVA) u slučaju više grupa. U slučajevima kada su podaci odstupali od pretpostavki za primenu parametarskih testova, primenjeni su analogni neparametarski, Man-Vitnijev U test (Mann-Whitney) i Kruskal-Valisova (Kruskal-Wallis) neparametarska analiza varijanse.

Učestalosti alela i genotipova su određivane metodom prebrojavanja. Za procenu značajnosti razlike u učestalostima korišćeni su χ^2 test i Fišerov egzaktni test.

Povezanost analiziranih obeležja ispitivana je na osnovu Pirsonovog koeficijenta korelacije (Pearson, r) i Spirmanovog koeficijenta korelacije rangova (Spearman, ρ).

Dobijeni rezultati imunoloških i genetičkih analiza i kliničkih parametara obe grupe bolesnika, kao i kontrolne grupe, su statistički obrađeni korišćenjem softverskih paketa IBM SPSS v.19 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) i Statistica v.7 (Statsoft Inc., Tulsa, USA). Analiza haplotipova urađena je pomoću programa SNPStats (260). Rezultati su predstavljeni tabelarno i grafikonima.

4.0 REZULTATI

4.1 Demografske karakteristike ispitanika

Analizirano je ukupno 100 ispitanika obolelih od Antifosfolipidnog sindroma i 50 zdravih ispitanika kontrolne grupe (K). Ispitanici oboleli od AFS su selektovani u dve grupe: 50 ispitanika sa primarnim AFS - PAFS i 50 ispitanika sa sekundarnim AFS - SAFS, udruženim sa SEL.

Prosečne vrednosti životne dobi obolelih ispitanika i ispitanika kontrolne grupe značajno se ne razlikuju (Tabela 2.). U sve tri grupe preovlađuju osobe ženskog pola, jer je poznato da je veća prevalencija AFS kod žena.

Tabela 2. Starosna i polna struktura obolelih od primarnog AFS, obolelih od sekundarnog AFS i ispitanika kontrolne grupe

<i>Grupe pacijenata</i>	<i>Starost (srednja vrednost ± standardna greška)</i>	<i>Pol (Ž/M)</i>
<i>Primarni AFS (n=50)</i>	45.3 ± 1.8 god.	37/13
<i>Sekundarni AFS (n=50)</i>	46.0 ± 1.9 god.	44/6
<i>Kontrolna grupa (n=50)</i>	44.8 ± 1.8 god.	34/16

4.2 Imunološke karakteristike ispitanika

Jedan od kriterijuma za potvrdu dijagnoze Antifosfolipidnog sindroma je i prisustvo anti kardiolipinskih antitela i antitela na $\beta 2$ glikoprotein I, IgG i IgM klase i lupus antikoagulansa.

Anti kardiolipinska antitela i antitela na $\beta 2$ glikoprotein I obe klase se sa približno istom učestalošću javljaju i kod primarnog i kod sekundarnog AFS (oko 50%), za razliku od kontrolne grupe, gde se ta antitela javljaju retko, u najviše tri (6%) ispitanika (*Tabela 3.*).

Povišen lupus antikoagulans se tri puta češće javlja kod obolelih sa primarnim AFS (72%) u odnosu na obolele sa sekundarnim AFS (20%), dok je prisustvo ANA gotovo šest puta češće kod obolelih sa sekundarnim AFS (54%) u odnosu na obolele sa primarnim AFS (8%). Lupus antikoagulans nije meren kod ispitanika kontrolne grupe. Nijedan ispitanik kontrolne grupe nije imao pozitivna antinuklearna antitela.

Tabela 3. Prikaz prisutva antitela kod obolelih od primarnog AFS, sekundarnog AFS i kod ispitanika kontrolne grupe

ANTITELA	PAFS (n=50)	SAFS (n=50)	KONTROLA (n=50)
aCL IgG	25 (50%)	22 (44%)	2 (4%)
aCL IgM	33 (66%)	32 (64%)	3 (6%)
aβ2GPI IgG	22 (44%)	26 (52%)	1 (2%)
aβ2GPI IgM	27 (54%)	30 (60%)	0
LA	36 (72%)	10 (20%)	-
ANA	4 (8%)	27 (54%)	0

Postoji visoka značajnost razlike učestalosti prisutva antitela aCL IgG, i IgM i a β 2GP I IgG i IgM kod obolelih i od primarnog i od sekundarnog AFS u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0.001$), ali ne postoji značajnost razlike između grupa PAFS i SAFS za ta antitela (*Tabela 4.*). Nema varijabilnosti (-) za LA i ANA u kontrolnoj grupi, te nije bilo moguće izračunati značajnost razlike učestalosti za te parametre. U poređenju primarnog

i sekundarnog AFS, visoka značajnost razlike učestalosti prisustva ($p < 0.001$) postoji baš kod ta dva parametra: LA i ANA. Značajno su češća ANA kod sekundarnog AFS, a LA kod primarnog AFS.

Tabela 4. Prikaz značajnosti razlike u prisustvu antitela po grupama (χ^2 test)

<i>ANTITELA</i>	<i>p (PAFS/K)</i>	<i>p (SAFS/K)</i>	<i>p (PAFS/SAFS)</i>
<i>aCL IgG</i>	p<0.001	p<0.001	p=0.396
<i>aCL IgM</i>	p<0.001	p<0.001	p=0.765
<i>aβ2GPI IgG</i>	p<0.001	p<0.001	p=0.254
<i>aβ2GPI IgM</i>	p<0.001	p<0.001	p=0.386
<i>LA</i>	-	-	p<0.001
<i>ANA</i>	-	-	p<0.001

U *Tabeli 5.* je prikazana prosečna koncentracija citokina IL-17, IL-23 i TGF β kod ispitanika sve tri grupe. Sumarno, prosečna koncentracija sva tri citokina je veća kod pacijenata sa primarnim AFS (8.4pg/ml; 14.3pg/ml; 411.3pg/ml) nego u kontrolnoj grupi (4.3pg/ml; 7.8pg/ml; 158.7pg/ml). Koncentracija IL-17 je veća kod pacijenata sa sekundarnim AFS nego u kontrolnoj grupi. Koncentracija IL-23 je veća kod obolelih sa primarnim AFS u odnosu na obolele sa sekundarnim AFS i u odnosu na kontrolnu grupu.

Tabela 5. Prosečne vrednosti koncentracija interleukina (\pm standardna greška) kod obolelih od primarnog AFS, sekundarnog AFS i kod ispitanika kontrolne grupe

<i>KONCENTRACIJA CITOKINA (pg/mL)</i>	<i>PAFS (n=50)</i>	<i>SAFS (n=50)</i>	<i>KONTROLA (n=50)</i>
<i>IL-17</i>	8.4 \pm 1.1	7.6 \pm 0.9	4.3 \pm 0.5
<i>IL-23</i>	14.3 \pm 2.3	8.5 \pm 1.4	7.8 \pm 2.2
<i>TGFβ</i>	411.3 \pm 79.6	288.3 \pm 69.5	158.7 \pm 39.8

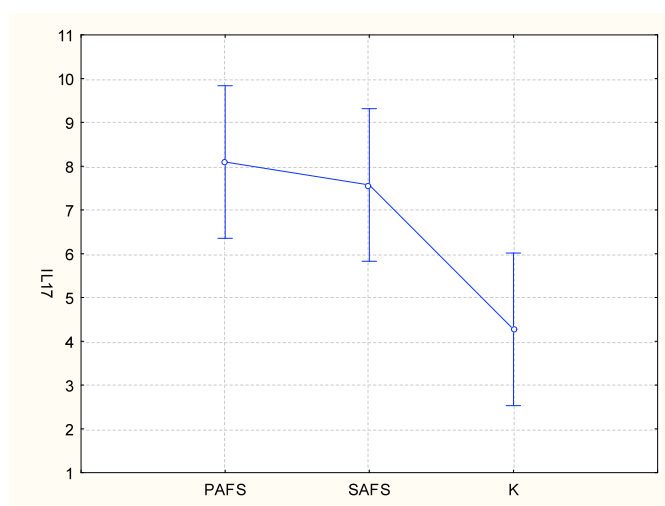
Fiziološka koncentracija IL-6 je do 7.0pg/mL. Koncentracija IL-6 je bila nemerljiva (≤ 1.5 pg/ml) kod svih ispitanika kontrolne grupe. U grupi ispitanika sa sekundarnim AFS

je bilo tri puta više pacijenata sa koncentracijom IL-6 preko fiziološke granice u odnosu na ispitanike sa primarnim AFS (Tabela 6.).

Tabela 6. Koncentracija IL-6 kod obolelih od primarnog AFS, sekundarnog AFS i kod ispitanika kontrolne grupe

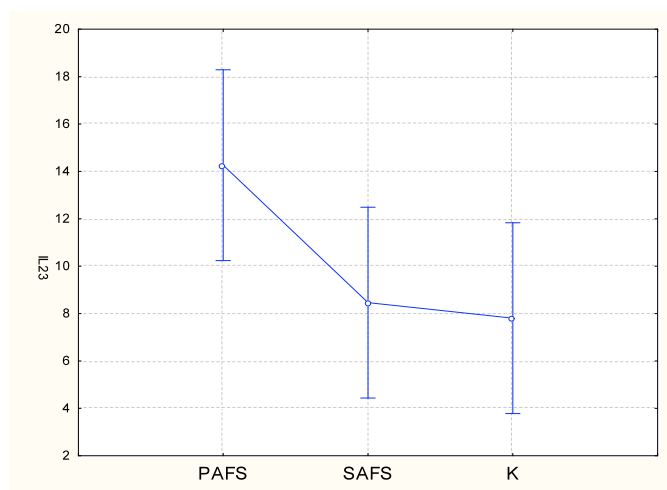
KONCENTRACIJA IL-6 (pg/mL)	PAFS (n=50)	SAFS (n=50)	KONTROLA (n=50)
≤ 1.5	41(82%)	23 (46%)	50 (100%)
1.5-7	6 (12%)	17(34%)	0
≥ 7.0	3 (6%)	10 (20%)	0

Kad smo uporedili koncentraciju IL-17 kod sve tri ispitivane grupe, bilo je evidentno da su razlike statistički značajne (Kruskal-Wallis test $H=11.915$, $p=0.0026$), i to da je značajno veća koncentracija kod obolelih sa primarnim AFS (8.4 pg/ml) i obolelih sa sekundarnim AFS (7.6 pg/ml), u odnosu na ispitanike kontrolne grupe (4.3 pg/ml) (Kruskal-Wallis test multipna poređenja $p=0.008$ i $p=0.010$)



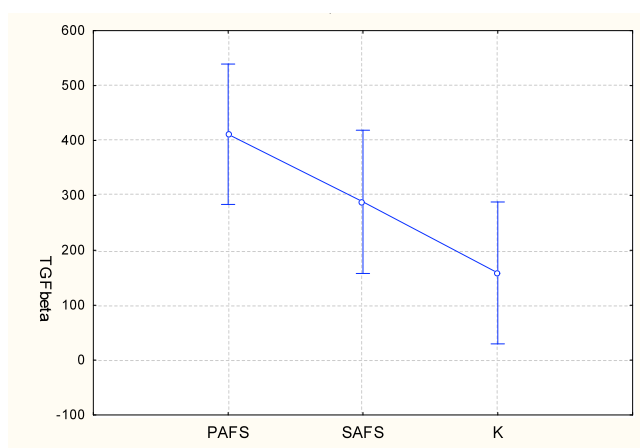
Grafikon 1. Prikaz koncentracija IL-17 po grupama (Kruskal-Wallis test $H=11.915$ $p=0.0026$)

Postoji visoka značajnost razlike koncentracije interleukina IL-23 između analiziranih grupa (Kruskal-Wallis test $H = 21.482$ $p = 0.0000$). Pri tome je koncentracija značajno veća kod obolelih sa primarnim AFS (14.3pg/ml) u odnosu na obolele sa sekundarnim AFS (8.5pg/ml) i na kontrolnu grupu (7.8pg/ml) (Kruskal-Wallis test multipna poređenja $p = 0.0007$ i $p = 0.0001$).



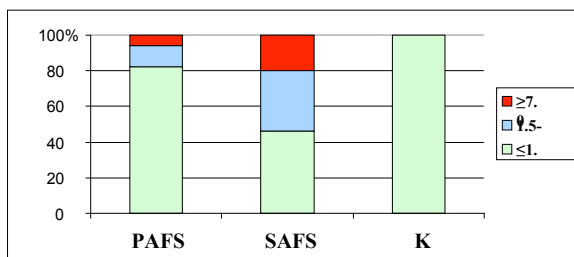
Grafikon 2. Prikaz koncentracija IL-23 po grupama (Kruskal-Wallis test $H (2, N = 150) = 21.48204$ $p = 0.0000$)

Razlika koja postoji u koncentracijama TGF β između obolelih od primarnog i sekundarnog AFS i ispitanika kontrolne grupe nije bila statistički značajna (Kruskal-Wallis test $H = 4.974$ $p = 0.083$); međutim, poređenje vrednosti kod dve grupe – oboleli od PAFS u odnosu na kontrolnu grupu – pokazalo je značajnu razliku ($p = 0.042$).



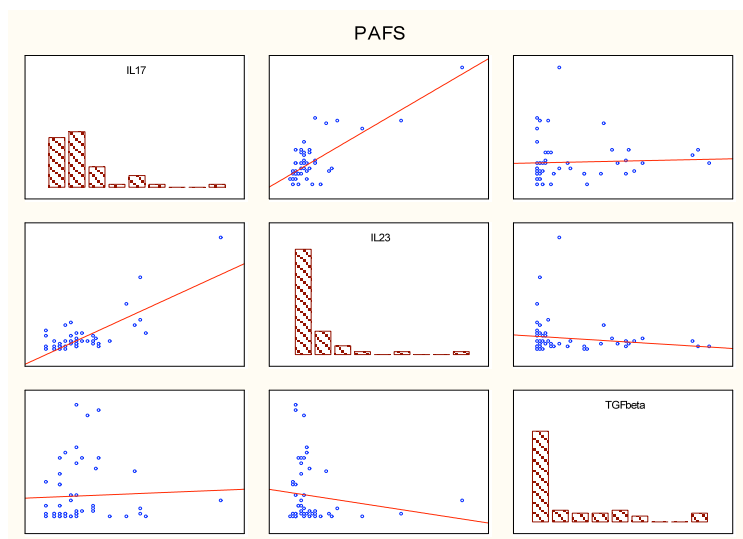
Grafikon 3. Prikaz koncentracija TGF β po grupama (Kruskal-Wallis test $H (2, N = 147) = 4.974435$ $p = 0.0831$; Mann Withney test $p = 0.042$)

Razlika u koncentracijama IL-6 analizirana je na osnovu zastupljenosti po kategorijama (*Grafikon 4.*) Hi-kvadrat testom i Fišerovim egzaktnim testom. Svi ispitanici kontrolne grupe su imali koncentraciju IL-6 manju od 1.5pg/mL, što je donja granica merljivosti tog citokina. Značajnost razlike postoji u poređenju koncentracija IL-6 kod ispitanika sa primarnim i sekundarnim AFS ($p=0.0008$). Značajno češće oboleli od sekundarnog AFS imaju povećanu koncentraciju IL-6, iznad fiziološke granice.



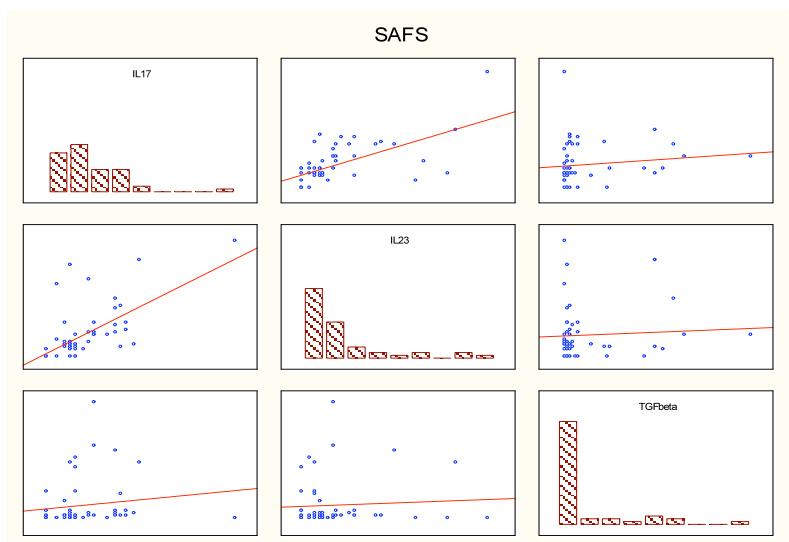
Grafikon 4. Prikaz koncentracija IL-6 po grupama

Analizirali smo odnos koncentracija IL-17, IL-23 i TGFβ u sve tri grupe ispitanika. Kod pacijenata sa primarnim AFS postoji visoko značajna pozitivna korelacija između koncentracija IL-17 i IL-23 (Spearman $\rho=0.5403$ $p<0.01$), a nema značajne korelacije između IL-17 i TGFβ, kao ni između IL-23 i TGFβ (*Grafikon 5.*).



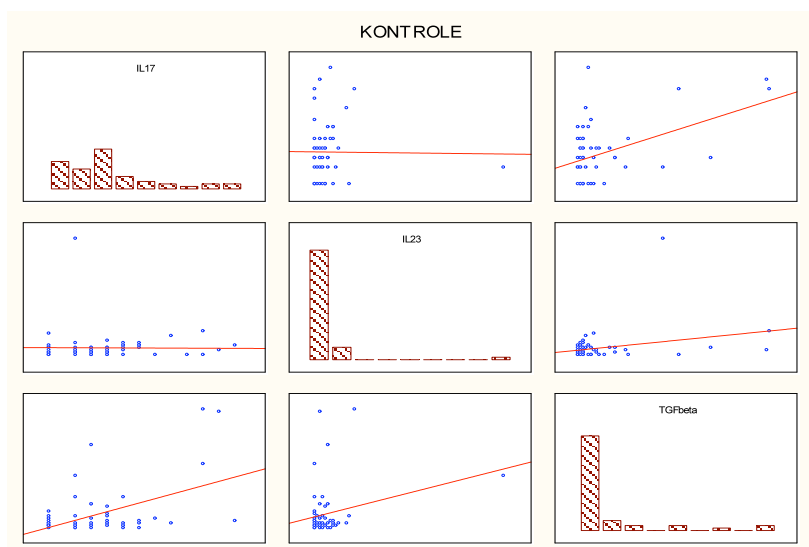
Grafikon 5. Korelacija koncentracija IL-17A, IL-23 i TGFβ kod ispitanika sa primarnim AFS

U grupi pacijenata sa sekundarnim AFS postoji visoko značajna pozitivna korelacija između koncentracija IL-17 i IL-23 i značajna pozitivna korelacija između IL-17 i TGFβ (Spearman $\rho=0.5971$ $p<0.01$ i $\rho=0.3288$ $p<0.05$ redom). Korelacija između IL-23 i TGFβ nije značajna (*Grafikon 6.*).



Grafikon 6. Korelacija koncentracija IL-17A, IL-23 i TGFβ kod ispitanika sa sekundarnim AFS

U grupi kontrola, nijedna od analiziranih korelacija nije bila statistički značajna ($p>0.05$ u svim slučajevima).



Grafikon 7. Korelacija koncentracija IL-17A, IL-23 i TGFβ kod ispitanika kontrolne grupe

4.3 Kliničke karakteristike ispitanika

Klinički simptomi koji se javljaju kod obolelih od AFS su gubitak ploda kod žena i prisustvo arterijskih i venskih tromboza, dok je trombocitopenija potencijalan klinički kriterijum i stoga posebno interesantan za ispitivanje (Tabela 7.). Znatno je veća učestalost svih kliničkih simptoma kod obolelih u odnosu na ispitanike kontrolne grupe. Sumarno, češće je prisustvo gubitka ploda i venskih tromboza kod pacijenata sa primarnim AFS (73% i 38% kod PAFS u odnosu na 43% i 20% kod SAFS), dok se arterijske tromboze i trombocitopenija češće javljaju kod pacijenata sa sekundarnim AFS (68% i 48% kod SAFS u odnosu na 52% i 28% kod PAFS).

Tabela 7. Prisustvo kliničkih simptoma u grupi obolelih od primarnog AFS, sekundarnog AFS i kod ispitanika kontrolne grupe

KLINIČKI SIMPTOMI	PAFS (n=50)	SAFS (n=50)	KONTROLA (n=50)
Gubitak ploda	27 (73%)	19 (43%)	3 (8.57%)
Venska tromboza	19 (38%)	10 (20%)	0
Arterijska tromboza	26 (52%)	34 (68%)	0
Trombocitopenija	14 (28%)	24 (48%)	0

U kontrolnoj grupi nijedan ispitanik nije imao arterijsku ili vensku trombozu, kao ni trombocitopeniju (-), te stoga nije bilo moguće izračunati značajnost razlike učestalosti ovih kliničkih simptoma kod obolelih sa primarnim, odnosno, sekundarnim AFS i kontrolne grupe. Iz Tabele 8. se vidi da visoka značajnost razlike učestalosti postoji za gubitak ploda i kod primarnog i kod sekundarnog AFS u odnosu na kontrolnu grupu (Mann Whitney test $p < 0.001$). U poređenju grupe obolelih sa primarnim u odnosu na obolele sa sekundarnim AFS, značajno su češći svi klinički simptomi kod obolelih sa primarnim AFS (Mann Whitney test $p = 0.00044$ za gubitak ploda, $p = 0.0015$ za venske tromboze, $p = 0.015$, za arterijske tromboze i $p = 0.005$ za trombocitopeniju).

Tabela 8. Prikaz značajnosti razlike u učestalosti prisustva kliničkih simptoma AFS po grupama (Mann Whitney test)

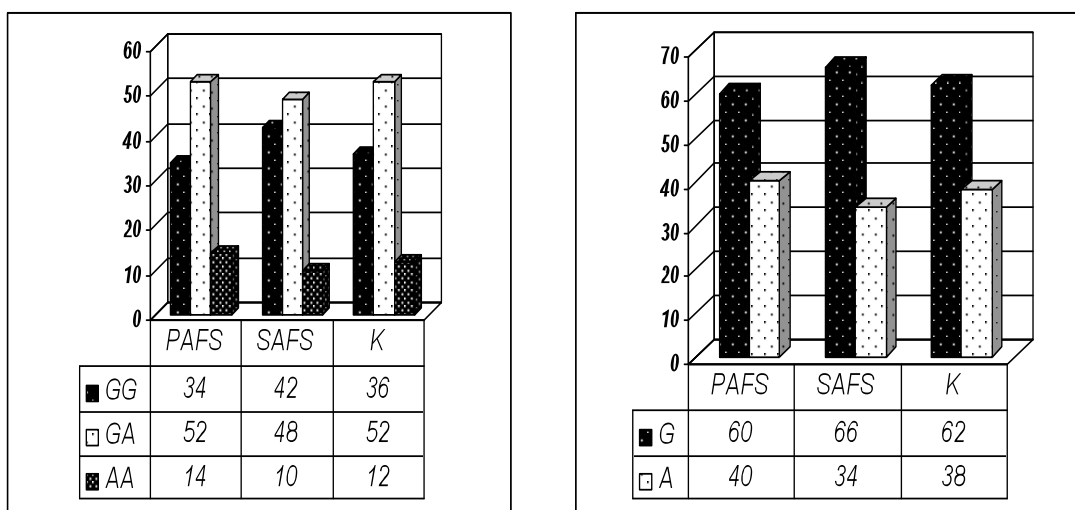
<i>KLINIČKI SIMPTOMI</i>	<i>p (PAFS/K)</i>	<i>p (SAFS/K)</i>	<i>p (PAFS/SAFS)</i>
<i>Gubitak ploda</i>	<i>p<0.001</i>	<i>p<0.001</i>	<i>p=0.00044</i>
<i>Venska tromboza</i>	<i>-</i>	<i>-</i>	<i>p=0.0015</i>
<i>Arterijska tromboza</i>	<i>-</i>	<i>-</i>	<i>p=0.015</i>
<i>Trombocitopenija</i>	<i>-</i>	<i>-</i>	<i>p=0.005</i>

4.4 Genetičke karakteristike ispittivanih grupa

Odredili smo učestalost genotipova i alela za polimorfizme u genima za: IL-17A (rs2275913), IL-17F (rs763780), IL-23 (rs11209026), TGF β (rs1800471), IL-6 (rs1800795), ROR γ t (rs9826) i Foxp3 (rs3761548) u sve tri grupe ispitanika.

U analizi polimorfizama gena za IL-17A rs2275913 u grupi obolelih od primarnog AFS, prikazanoj u *Grafikonu 8*, utvrđeno je da od ukupno 50 ispitanika, 17 ispitanika ima GG genotip (34%), GA genotip ima 26 ispitanika (52%) i AA genotip ima 7 ispitanika (14%). U grupi od 50 obolelih od sekundarnog AFS, 21 ispitanik ima GG genotip (42%), 24 ispitanika ima GA genotip (48) i 5 ispitanika ima AA genotip (10%). U kontrolnoj grupi, od 50 zdravih osoba, 18 ispitanika ima GG genotip (36%), 26 ispitanika (52%) ima GA genotip i 6 ispitanika (10%) ima AA genotip.

Iz učestalosti genotipova slede učestalosti alela. Alel G je zastupljen sa 60% kod ispitanika sa primarnim AFS, sa 66% kod ispitanika sa sekundarnim AFS i sa 62% kod ispitanika kontrolne grupe. Alel A je ređi alel zastupljen u sve tri grupe ispitanika, sa učestalošću od 40% , 34% i 38% redom.



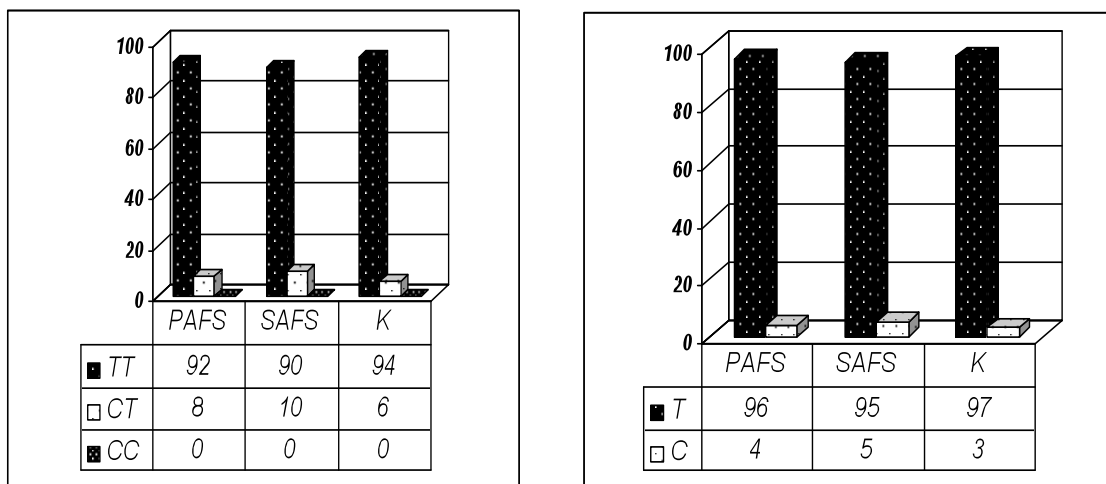
Grafikon 8. Učestalost (u %) genotipova GG, GA i AA i alela G i A za IL-17A (rs2275913) u grupi obolelih od primarnog AFS, sekundarnog AFS i kod ispitanika kontrolne grupe

Nema statistički značajnih razlika ($p > 0.05$) u učestalosti ispitivanih genotipova i alela za IL-17A (rs2275913) u sve tri grupe ispitanika. Analiza OR pokazala je da nema značajne asocijacije genotipova sa pojavom AFS (Tabela 9.).

Tabela 9. Polimorfizam rs2275913 u genu za IL-17A i unakrsni odnos šansi (OR) za nastanak AFS

IL-17A/rs2275913	Genotip	PAFS/K	SAFS/K	SAFS/PAFS
OR (95%CI)	GG	1.00	1.00	1.00
	GA	0.98(0.40-2.39)	0.68(0.28-1.66)	0.73(0.31-1.73)
	AA	1.10(0.28-4.34)	0.55(0.14-2.23)	0.5(0.13-1.92)
p		0.98	0.6	0.56

Na Grafikonu 9. su prikazane učestalosti genotipova i alela za polimorfizam rs 763780 u genu za IL-17F. Analiza učestalosti genotipova je pokazala da je u sve tri grupe ispitanika najzastupljeniji TT genotip, dok se homozigot CC ne javlja ni u jednoj grupi ispitanika. Sledstveno je i alel T najzastupljeniji kod ispitanika sve tri grupe.



Grafikon 9. Učestalost (u %) genotipova TT, CT i CC i alela T i C kod IL-17F (rs763780) u grupi obolelih od primarnog AFS, sekundarnog AFS i kod ispitanika kontrolne grupe

Razlike u učestalosti genotipova i alela između grupa ispitanika nisu statistički značajne, a ispitivani genotipovi nisu udruženi sa povećanim rizikom nastanka bolesti (Tabela 10.).

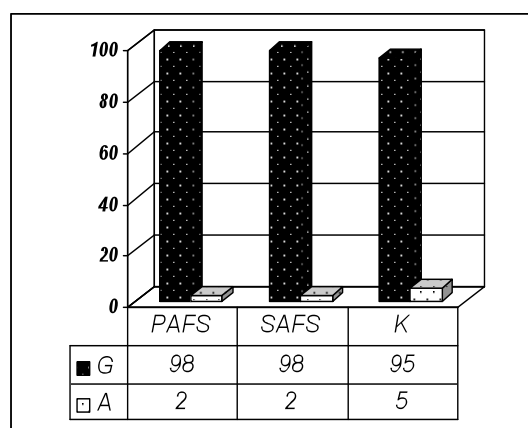
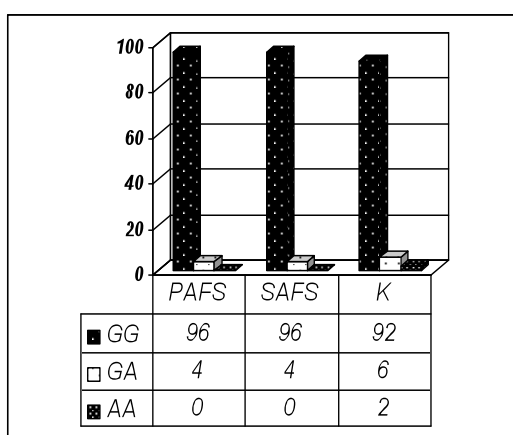
Tabela 10. Polimorfizam rs763780 u genu za IL-17F i unakrsni odnos šansi (OR) za nastanak AFS

<i>IL-17F/rs763780</i>	<i>Genotip</i>	<i>PAFS/K</i>	<i>SAFS/K</i>	<i>SAFS/PAFS</i>
OR (95%CI)	TT	1.00	1.00	1.00
	CT	1.40(0.29-6.76)	1.91(0.40-9.03)	1.06(0.76-4.26)
	CC	--	--	--
p		0.67	0.41	0.94

Budući da su geni IL-17A i IL-17F blisko vezani (region 6p21), urađena je analiza haplotipova za lokuse rs2275913 i rs763780. Utvrđeno je da je i u grupi bolesnika i u kontrolnoj grupi najčešći haplotip GT (57.5% odnosno 60%), mada razlika u učestalosti u odnosu na ostala dva detektovana haplotipa (AT i GC) nije bila statistički značajna.

Analizom polimorfizma rs11209026 gena za IL-23 dobijene su distribucije učestalosti genotipova i alela pokazane na *Grafikonu 10*. Najzastupljeniji genotip u sve tri grupe ispitanika je homozigot GG sa 96% zastupljenosti i kod bolesnika sa primarnim i kod bolesnika sa sekundarnim AFS, dok je ta za stupljenost bila 92% kod ispitanika kontrolne grupe.

Izračunate su učestalosti alela u sve tri analizirane grupe ispitanika. Alel G je zastupljen sa 98% kod PAFS i SAFS i sa 95% kod ispitanika kontrolne grupe.



Grafikon 10. Učestalost (u %) genotipova GG, GA i AA i alela G i A kod IL-23 (rs11209026) u grupi obolelih od primarnog AFS, sekundarnog AFS i u kontrolnoj grupi

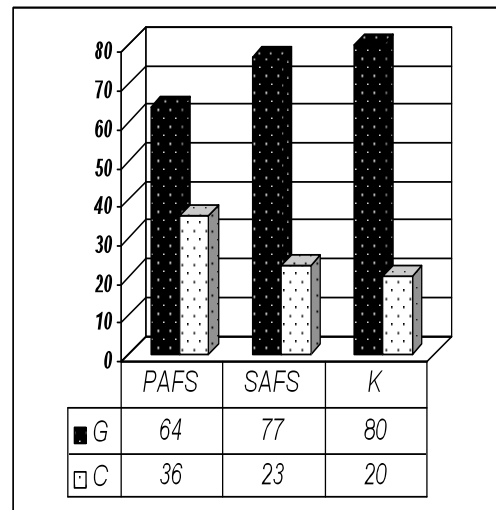
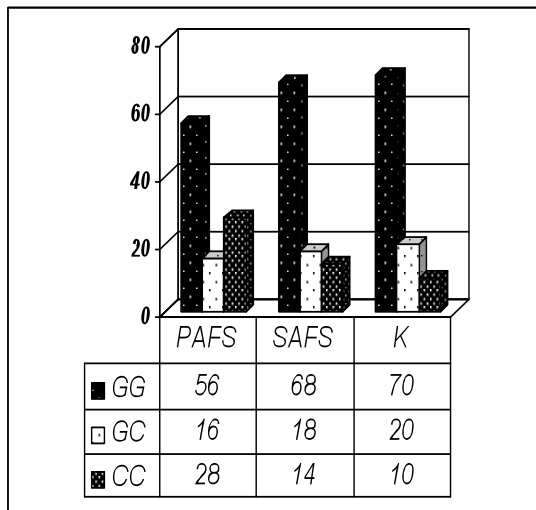
Pokazalo se da nema značajnih razlika u učestalosti genotipova i alela između obolelih i ispitanika kontrolne grupe i ovaj lokus nije udružen sa povećanim rizikom za nastanak AFS (Tabela 11.).

Tabela 11. Polimorfizam rs11209026 u genu za IL-23 i unakrsni odnos šansi (OR) za nastanak AFS

<i>IL-23/rs11209026</i>	<i>Genotip</i>	<i>PAFS/K</i>	<i>SAFS/K</i>	<i>SAFS/PAFS</i>
OR (95%CI)	GG	1.00	1.00	1.00
	GA	0.62(0.10-3.93)	0.48(0.07-3.21)	1.06(0.14-8.17)
	AA	0.00	0.00	0.00
p		0.42	0.33	0.95

Raspodela genotipova, data na *Grafikonu 11*, po analiziranim grupama za polimorfizam rs1800471 u genu za TGF β je sledeća: u grupi obolelih od primarnog AFS od ukupno 50 ispitanika 14 ima CC genotip (28%), GC genotip ima 8 ispitanika (16%) i GG genotip ima 28 ispitanika (56%). U grupi ispitanika sa sekundarnim AFS, koja takođe broji 50 ispitanika, 7 ispitanika ima genotip CC (14%), 9 ispitanika ima GC genotip (18%) i 34 ispitanika ima GG genotip (68%). Od 50 ispitanika kontrolne grupe, 5 ispitanika ima CC genotip (10%), 10 ima GC genotip (20%) a 35 ispitanika ima GG genotip (70%).

Na osnovu učestalosti genotipova izračunate su i učestalosti alela C i G i njihove vrednosti su: za alel C 36% kod ispitanika sa primarnim AFS, 23% sa sekundarnim AFS i 20% kod ispitanika kontrolne grupe. Shodno tome, alel G je najčešće bio zastupljen kod ispitanika kontrolne grupe 80%, dok je ta zastupljenost bila 77% kod ispitanika sa sekundarnim AFS i 64% kod ispitanika sa primarnim AFS.



Grafikon 11. Učestalost (u %) genotipova CC, CG i GG i alela G i C kod $TGF\beta$ (*rs1800471*) u grupi obolelih od primarnog AFS, sekundarnog AFS i kod ispitanika kontrolne grupe

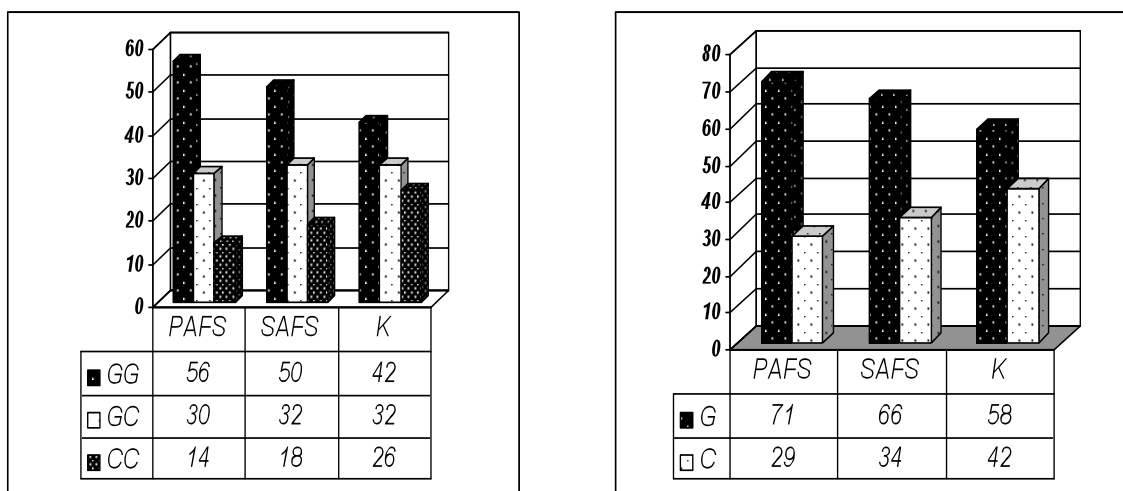
Hi-kvadrat testom je pokazano da ne postoji statistički značajna razlika učestalosti genotipova CC, CG i GG kod ispitanika sa primarnim AFS u odnosu na ispitanike kontrolne grupe i u odnosu na ispitanike sa sekundarnim AFS. Isti test je pokazao da je značajno češći alel C kod ispitanika sa primarnim AFS u odnosu na ispitanike kontrolne grupe (χ^2 test $p=0.012$) i u odnosu na ispitanike sa sekundarnim AFS (χ^2 test $p=0.04$). Analiza unakrsnog odnosa šanse između grupa PAFS i kontrola je pokazala značajnu vrednost $OR=3.4$ (CI 1.11-10.46, $p=0.02$) za CC genotip kod PAFS, i to prema recesivnom modelu (Tabela 12.).

Tabela 12. Polimorfizam *rs1800471* u genu za $TGF\beta$ i rizik za nastanak AFS

$TGF\beta/rs1800471$	Genotip	PAFS/K	SAFS/K	SAFS/PAFS
OR (95%CI)	GG	1.00	1.00	1.00
	CG	1.01(0.35-2.94)	0.9(0.4-2.74)	0.91(0.3-2.71)
	CC	3.4(1.11-10.46)	1.23(0.34-4.37)	0.4(0.14-1.14)
p		0.024	0.94	0.21

Rezultati učestalosti genotipova i alela kod polimorfizma u genu za IL-6 (rs1800795), prikazani na *Grafikonu 12*, pokazuju da je genotip GG najzastupljeniji genotip u sve tri grupe ispitanika. Ovaj genotip je u grupi obolelih od primarnog AFS zastupljen kod 28 ispitanika (56%) u odnosu na 25 ispitanika (50%) sa sekundarnim AFS i 21 ispitanikom (42%) kontrolne grupe. Nasuprot tome, genotip CC je zastupljen kod 7 ispitanika sa primarnim AFS (14%), kod 9 ispitanika sa sekundarnim AFS (18%) i kod 13 ispitanika kontrolne grupe (26%).

Zastupljenost G alela je takođe veća od C alela u sve tri grupe ispitanika. Ona iznosi 71% za ispitanike sa primarnim AFS, 66% za one sa sekundarnim AFS i 58% za ispitanike kontrolne grupe.



Grafikon 12. Učestalost (u %) genotipova CC, CG i GG i alela G i C kod IL-6 (rs1800795) u grupi obolelih od primarnog AFS, sekundarnog AFS i kod ispitanika kontrolne grupe

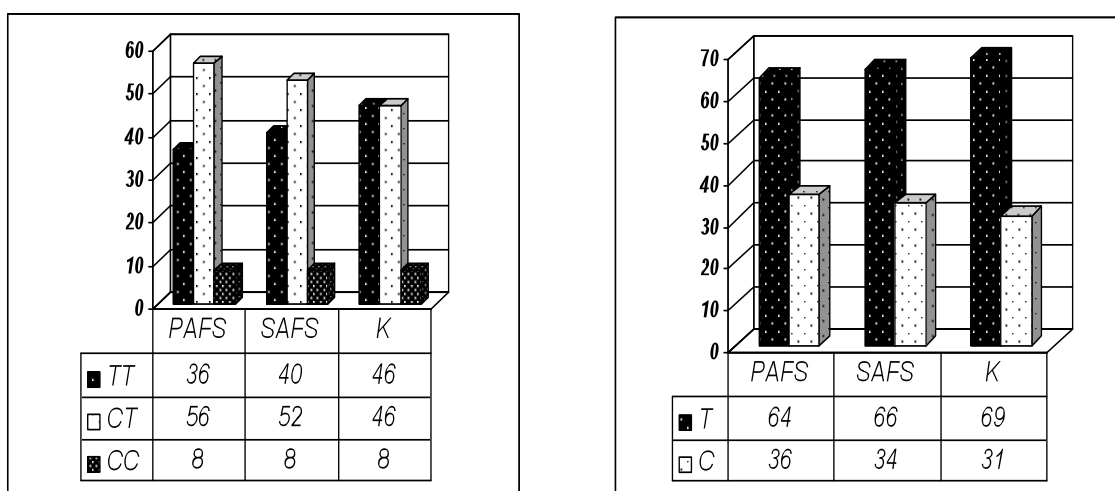
Iako je učestalost genotipa GG je veća kod obolelih sa primarnim i sekundarnim AFS nego kod ispitanika kontrolne grupe, nema statistički značajne razlike (χ^2 test $p > 0.05$). Statistički je granično češći alel G kod obolelih sa PAFS u odnosu na ispitanike kontrolne grupe (χ^2 test $p = 0.055$). Analiza OR (*Tabela 13.*) pokazala je da nema značajne asocijacije datih genotipova sa pojavom bolesti ni u grupi PAFS ($p = 0.22$) niti u grupi SAFS ($p = 0.37$).

Tabela 13. Polimorfizam rs1800795 u genu za IL-6 i rizik za nastanak AFS

<i>IL-6/rs1800795</i>	<i>Genotip</i>	<i>PAFS/K</i>	<i>SAFS/K</i>	<i>SAFS/PAFS</i>
OR (95%CI)	GG	1.00	1.00	1.00
	GC	0.74(0.30-1.87)	1.1(0.41-2.92)	1.22(0.5-3.02)
	CC	0.39(0.13-1.15)	0.51(0.18-1.47)	1.27(0.41-3.98)
p		0.22	0.37	0.87

U analizi polimorfizma rs9826 gena za ROR γ t (*Grafikon 13.*), kod ispitanika sve tri analizirane grupe najzastupljeniji je bio heterozigot CT, 28 ispitanika sa primarnim AFS (56%), 26 ispitanika sa sekundarnim AFS (52%) i 23 ispitanika kontrolne grupe (46%). Homozigot TT je bio zastupljen kod 18 ispitanika sa primarnim (36%), 20 sa sekundarnim (52%) i kod 23 ispitanika kontrolne grupe (46%), dok je homozigot CC bio zastupljen znatno manje kod po 4 ispitanika svake grupe (8%).

Iz učestalosti genotipova proizilaze i učestalosti alela. Alel T je zastupljen sa 64% kod obolelih sa primarnim AFS, 66% sa sekundarnim AFS i sa 69% kod ispitanika kontrolne grupe. Alel C je zastupljen s 36% kod primarnog AFS, sa 34% kod sekundarnog i sa 31% kod ispitanika kontrolne grupe.



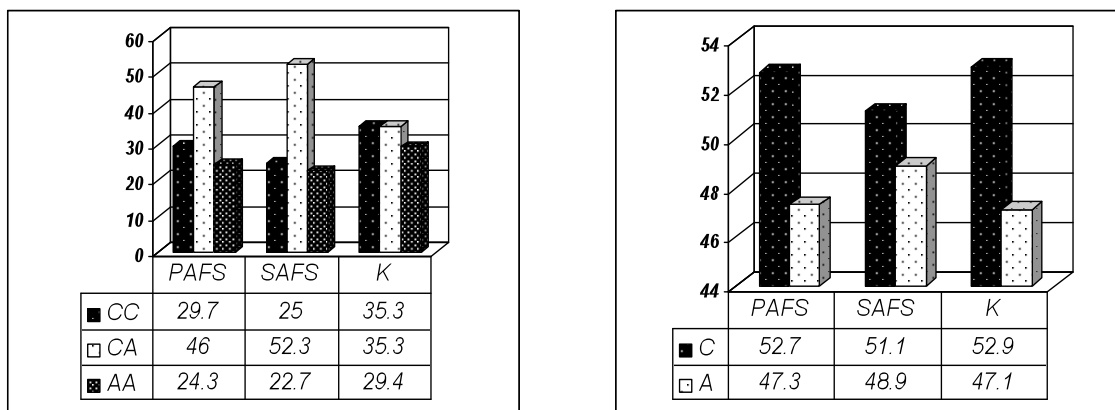
Grafikon 13. Učestalost (u %) genotipova TT, CT i CC i alela T i C kod ROR γ t (rs9826) u grupi obolelih od primarnog AFS, sekundarnog AFS i kod ispitanika kontrolne grupe

Hi-kvadrat testom je potvrđeno da ne postoji statistički značajna razlika u distribuciji učestalosti ispitivanih genotipova i alela između sve tri ispitivane grupe (*Tabela 14.*).

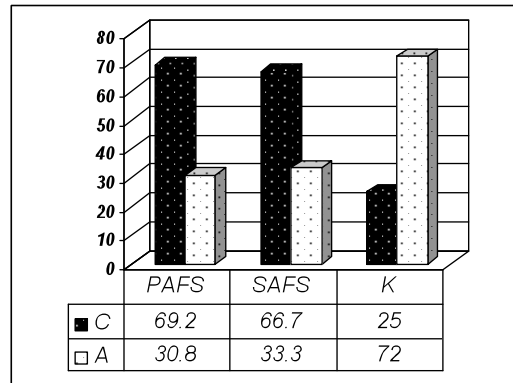
Tabela 14. Polimorfizam rs9826 u genu za ROR γ t i rizik za nastanak AFS

ROR γ t/rs9826	Genotip	PAFS/K	SAFS/K	SAFS/PAFS
OR (95%CI)	TT	1.00	1.00	1.00
	CT	1.54(0.67-3.57)	1.1(0.47-2.6)	0.9(0.38-2.1)
	CC	1.21(0.26-5.59)	0.94(0.2-4.45)	0.78(0.17-3.61)
p		0.59	0.97	0.94

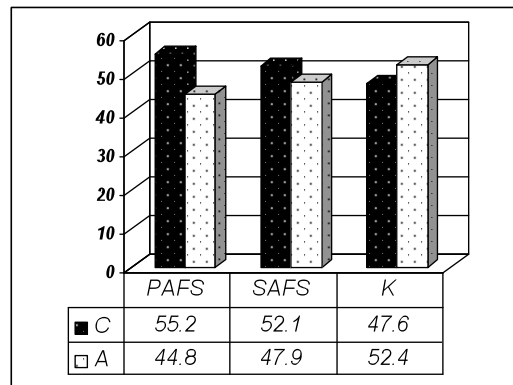
Rezultati analize polimorfizma rs3761548 u genu za Foxp3 prikazani su odvojeno za osobe ženskog i osobe muškog pola, jer muškarci imaju jedan X hromozom i jedan Foxp3 alel, a žene imaju dva X hromozoma i dva Foxp3 alela. Rezultati analize su dati na *Grafikonu 14., 15. i 16.*



Grafikon 14. Učestalost (u %) genotipova CC, CA i AA i alela C i A kod Foxp3 (*rs3761548*) kod žena obolelih od primarnog AFS, sekundarnog AFS i kontrolna



Grafikon 15. Učestalost (u%) genotipova (ujedno i alela) C i A kod *Foxp3* (rs3761548) kod muškaraca obolelih od primarnog AFS, sekundarnog AFS i kontrola



Grafikon 16. Učestalost (u %) alela C i A kod *Foxp3* (rs3761548) kod ispitanika oba pola obolelih od primarnog AFS, sekundarnog AFS i kod kontrolne grupe

Nije bilo statistički značajnih razlika u učestalostima ispitivanih genotipova i alela u genu za *Foxp3* između sve tri grupe ispitanica, kao ni značajnih vrednosti OR (Tabela 15.). Upadljiva je razlika u učestalostima alela kod muškaraca kontrolne grupe u odnosu na ostale grupe ispitanika, ali to može biti i posledica veličine uzorka.

Tabela 15. Polimorfizam rs3761548 u genu za *Foxp3* i rizik za nastanak AFS

<i>Foxp3/rs3761548</i>	Genotip	PAFS/K	SAFS/K	SAFS/PAFS
OR (95%CI)	CC	1.00	1.00	1.00
	AC	1.61(0.53-4.89)	2.08(0.71-6.11)	1.53(0.48-3.85)
	AA	1.02(0.3-3.48)	1.07(0.32-3.62)	1.11(0.33-3.8)
p		0.64	0.32	0.84

4.5 Povezanost ispitivanih kliničkih i imunoloških parametara u PAFS

Ne postoji značajna korelacija između koncentracije interleukina IL-17, IL-23 i TGFβ i prisustva, odnosno, odsustva antitela aCL i β₂GP I IgG i IgM klase, LA i ANA u grupi obolelih od primarnog AFS (Tabela 16.).

Tabela 16. Prikaz prosečnih vrednosti koncentracija citokina IL-17, IL-23 i TGFβ (± standardna greška i mediana u zagradi) u funkciji prisustva i odusustva pojedinih antitela u grupi obolelih od primarnog AFS (Mann Withney test)

ANTITELA		IL-17 (pg/ml)	IL-23 (pg/ml)	TGFβ (pg/ml)
aCL-IgG	+	16.7 ± 2.7 (14.4)	13.5 ± 2.5(10.4)	432.5 ± 121.7 (136.4)
	-	15.7 ± 3.4 (11.8)	15.0 ±4.0 (8.4)	390.2 ± 105.0 (125.6)
		<i>p=0.429</i>	<i>p=0.317</i>	<i>p=0.854</i>
aCL-IgM	+	18.0 ± 3.0 (14.4)	16.6 ± 3.4 (10.4)	440.9 ± 109.1 (125.6)
	-	12.6 ± 2.4 (11.8)	9.8 ±1.4 (8.4)	353.9 ± 103.0 (109.4)
		<i>p=0.381</i>	<i>p=0.189</i>	<i>p=0.774</i>
aβ₂GPI-IgG	+	14.5 ± 3.1 (6.8)	12.7 ± 2.1 (9.4)	296.5 ± 100.7 (60.2)
	-	17.5 ± 3.0 (14.4)	15.5 ± 3.9 (9.9)	501.6 ± 116.8 (174.1)
		<i>p=0.166</i>	<i>p=0.837</i>	<i>p=0.241</i>
aβ₂GPI-IgM	+	14.9 ± 2.8 (9.2)	14.5 ± 2.7 (9.4)	511.3 ±98.4 (44.5)
	-	17.7 ± 3.4 (14.4)	13.9 ± 4.0 (9.4)	607.1 ± 126.6 (293.2)
		<i>p=0.156</i>	<i>p=0.946</i>	<i>p=0.096</i>
LA	+	17.3 ± 2.7 (14.4)	13.2 ±2.7 (8.4)	387.6 ±92.1 (125.6)
	-	13.3 ± 3.6 (9.2)	16.9 ± 4.6 (10.5)	472.5 ± 161.9 (130.5)
		<i>p=0.245</i>	<i>p=0.265</i>	<i>p=0.923</i>
ANA	+	20.1 ± 8.4 (14.4)	14.4 ± 5.4 (10.5)	399.9 ± 305.6 (122.9)
	-	15.9 ± 2.2 (11.8)	14.3 ± 2.5 (9.40)	412.3 ± 83.3 (125.6)
		<i>p=0.494</i>	<i>p=0.591</i>	<i>p=0.668</i>

Ne postoji značajna korelacija u grupi obolelih sa primarnim AFS između koncentracije interleukina IL-17, IL-23 i TGFβ i prisustva, odnosno, odsustva kliničkih simptoma gubitka ploda, venskih i arterijskih tromboza (*Tabela 17.*). Značajna korelacija postoji između povišene koncentracije IL-17 i trombocitopenije ($p=0.011$). Rezultati ukazuju da oboleli sa primarnim AFS i povišenom koncentracijom IL-17 značajno češće imaju trombocitopeniju.

Tabela 17. Prosečne vrednosti koncentracija IL-17, IL-23 i TGFβ (\pm standardna greška i mediana u zagradi) u funkciji prisustva i odsustva glavnih kliničkih simptoma bolesti u grupi obolelih od primarnog AFS (Mann Withney test)

KLINIČKI SIMPTOMI		IL-17 (pg/ml)	IL-23 (pg/ml)	TGFβ (pg/ml)
Gubitak ploda	+	7.5±1.7 (4.6)	15.0±4.0 (10.4)	334.3±95.0 (75.1)
	-	7.2 ±2.0 (6.5)	11.6±2.6 (8.4)	280.1±132.0 (85.1)
		<i>p=0.843</i>	<i>p=0.987</i>	<i>p=0.906</i>
Venska tromboza	+	10.8±2.3 (7.2)	16.5±4.9 (10.4)	395.3±126.6(136.4)
	-	6.9±0.9 (5.9)	12.9±2.3 (8.4)	421.2±103.9(125.6)
		<i>p=0.192</i>	<i>p=0.575</i>	<i>p=0.772</i>
Arterijska tromboza	+	7.9±1.1 (7.2)	12.8±2.7 (8.4)	518.8±125.4(149.7)
	-	9.0±2.0 (6.5)	15.9±3.9 (10.5)	294.9±92.1 (117.5)
		<i>p=0.892</i>	<i>p=0.189</i>	<i>p=0.515</i>
Trombocitopenija	+	11.8±1.9 (9.1)	15.6±3.1 (10.4)	326.5±160.3 (90.4)
	-	7.0±1.3 (5.2)	13.8±3.0 (8.9)	430.3±3.0(144.3)
		<i>p=0.011</i>	<i>p=0.225</i>	<i>p=0.482</i>

4.6 Povezanost ispitivanih kliničkih i imunoloških parametara u SAFS

Ne postoji značajna korelacija između koncentracije interleukina IL-17, IL-23 i TGFβ i prisustva, odnosno, odsustva antitela aCL i β₂GP I IgG i IgM klase, LA i ANA u grupi obolelih od primarnog AFS (Tabela 18.).

Tabela 18. Prikaz značajnosti razlike između koncentracija citokina IL-17, IL-23 i TGFβ (± standardna greška i mediana u zagradi) u funkciji prisustva i odsustva pojedinih antitela u grupi obolelih od sekundarnog AFS (Mann Withney test)

ANTITELA		IL-17 (pg/ml)	IL-23 (pg/ml)	TGFβ (pg/ml)
aCL-IgG	+	17.7 ± 3.4 (11.8)	10.8 ± 2.6 (5.3)	316.3 ± 122.5 (60.7)
	-	13.1 ± 2.0 (11.8)	6.6 ± 1.5 (4.3)	266.5 ± 80.6 (82.4)
		<i>p=0.403</i>	<i>p=0.293</i>	<i>p=0.596</i>
aCL-IgM	+	17.1 ± 2.7 (11.8)	10.0 ± 2.1 (5.3)	256.9 ± 71.7 (71.5)
	-	11.7 ± 1.9 (10.5)	5.8 ± 1.4 (4.3)	345.6 ± 148.8 (71.5)
		<i>p=0.295</i>	<i>p=0.371</i>	<i>p=0.974</i>
aβ₂GPI-IgG	+	15.7 ± 3.1 (11.8)	9.9 ± 2.3 (5.3)	285.8 ± 87.7 (71.5)
	-	14.5 ± 2.1 (11.8)	6.9 ± 1.6 (4.3)	291.0 ± 111.3 (71.5)
		<i>p=0.938</i>	<i>p=0.715</i>	<i>p=0.959</i>
aβ₂GPI-IgM	+	18.4 ± 2.8 (11.8)	10.1 ± 2.2 (5.8)	262.9 ± 75.1 (71.5)
	-	10.3 ± 1.5 (9.2)	6.0 ± 1.4 (4.3)	330.7 ± 139.2 (76.9)
		<i>p=0.083</i>	<i>p=0.397</i>	<i>p=0.941</i>
LA	+	13.7 ± 3.7 (10.5)	5.8 ± 2.5 (3.2)	513.7 ± 161.4 (322.9)
	-	15.5 ± 2.2 (11.8)	9.1 ± 1.7 (5.3)	228.9 ± 74.9 (63.4)
		<i>p=0.784</i>	<i>p=0.127</i>	<i>p=0.839</i>
ANA	+	16.1 ± 2.2 (11.8)	10.1 ± 2.1 (5.3)	301.1 ± 107.1 (76.9)
	-	14.0 ± 3.3 (9.2)	6.5 ± 1.9 (4.3)	273.2 ± 86.1 (68.8)
		<i>p=0.248</i>	<i>p=0.236</i>	<i>p=0.82</i>

Ne postoji značajna korelacija u grupi obolelih sa primarnim AFS između povišene koncentracije interleukina IL-17, IL-23 i TGFβ i prisustva, odnosno, odsustva kliničkih simptoma gubitka ploda, venskih i arterijskih tromboza i trombocitopenije (*Tabela 19.*).

Tabela 19. Prosečne vrednosti koncentracija citokina (\pm standardna greška i mediana u zagradi) u funkciji prisustva i odsustva glavnih kliničkih simptoma bolsti u grupi obolelih od sekundarnog AFS (Mann Withney test)

KLINIČKI SIMPTOMI		IL-17 (pg/ml)	IL-23 (pg/ml)	TGFβ (pg/ml)
Gubitak ploda	+	7.7 \pm 1.9 (4.6)	11.4 \pm 2.9 (5.3)	306.5 \pm 107.4 (60.7)
	-	7.8 \pm 1.1 (5.9)	6.2 \pm 1.5 (4.3)	283.0 \pm 110.1 (87.8)
		<i>p</i> =0.704	<i>p</i> =0.255	<i>p</i> =0.661
Venska tromboza	+	5.0 \pm 1.8 (4.0)	7.1 \pm 3.5 (2.7)	499.6 \pm 240.4 (68.8)
	-	8.2 \pm 1.4 (5.9)	8.8 \pm 1.6 (5.3)	232.7 \pm 60.4 (76.9)
		<i>p</i> =0.092	<i>p</i> =0.296	<i>p</i> =0.387
Arterijska tromboza	+	6.9 \pm 0.9 (5.9)	6.5 \pm 1.2 (4.3)	288.4 \pm 86.6 (71.5)
	-	9.0 \pm 2.3 (5.2)	12.7 \pm 3.6 (6.8)	288.1 \pm 120.0 (74.2)
		<i>p</i> =0.754	<i>p</i> =0.158	<i>p</i> =0.835
Trombocitopenija	+	7.3 \pm 1.0 (5.9)	7.9 \pm 1.9 (5.3)	340.1 \pm 118.8 (66.1)
	-	7.8 \pm 1.6 (4.6)	9.0 \pm 2.1 (4.3)	240.6 \pm 77.7 (82.4)
		<i>p</i> =0.558	<i>p</i> =0.565	<i>p</i> =0.91

4.7. Povezanost ispitivanih genskih polimorfizama sa kliničkim i imunološkim parametrima u PAFS

Nema značajne korelacije koncentracija IL-17, IL-23, TGF β i IL-6 i pojedinih genotipova polimorfizma za te interleukine u grupi obolelih sa primarnim AFS (Tabela 20. i 21.).

Tabela 20. Prikaz koncentracija IL-17 i IL-23 (srednja vrednost \pm standardna greška) u funkciji genotipova u grupi obolelih od primarnog AFS; značajnost razlike: Kruskal-Wallis i Mann-Whitney test

<i>rs2275913 (IL-17A)</i>	<i>IL-17 (pg/ml)</i>	<i>IL-23 (pg/ml)</i>
<i>rs11209026 (IL-23)</i>		
GG	9.25 \pm 1.87	13.28 \pm 2.30
GA	7.78 \pm 1.51	37.90 \pm 11.29
AA	6.46 \pm 2.92	-
	H=1.72 p=0.42	z=1.26 p=0.21

Tabela 21. Prikaz koncentracija TGF β (srednja vrednost \pm standardna greška) i IL-6 (medijana) u funkciji genotipova u grupi obolelih od primarnog AFS; značajnost razlike: Kruskal-Wallis i Mann-Whitney test

<i>rs1800471 (TGFβ1)</i>	<i>TGFβ (pg/ml)</i>	<i>IL-6 (pg/ml)</i>
<i>rs1800795 (IL-6)</i>		
CC	389.69 \pm 153.39	2.37
GC	478.3 \pm 202.9	2.94
GG	403.03 \pm 108.46	3.67
	H=0.14 p=0.93	p>0.05

Postoji značajna korelacija između gubitka ploda i genotipa polimorfizma gena za IL-17A ($p=0.02$) i gena za IL-17F ($p=0.033$), koja se izgubila kada su analizirane samo žene u PAFS grupi. Značajna korelacija postoji između pojave venskih tromboza i genotipa polimorfizma gena za IL-6 ($p=0.03$), između pojave arterijskih tromboza i genotipa polimorfizma gena za IL-17F ($p=0.05$) i gena za Foxp3 ($p=0.03$), kao i između trombocitopenije i genotipa polimorfizma gena za Foxp3 ($p=0.01$) kod obolelih sa primarnim AFS (Tabela 22.)

Tabela 22. Korelacija glavnih kliničkih simptoma AFS i genotipova polimorfizama gena za interleukine u grupi obolelih od primarnog AFS (Spearman ρ)

POLIMORFIZMI	GUBITAK PLODA	VENSKATROMBOZA	ARTERIJSKA TROMBOZA	TROMBOCITOPENIJA
rs 227591 (IL-17A)	$\rho=0.293$ $p=0.020$	$\rho=0.132$ $p=0.302$	$\rho=0.048$ $p=0.706$	$\rho=0.150$ $p=0.241$
rs 763780 (IL-17F)	$\rho=0.269$ $p=0.033$	$\rho=0.191$ $p=0.134$	$\rho=0.248$ $p=0.050$	$\rho=0.171$ $p=0.180$
rs 11209026 (IL-23)	$\rho=0.082$ $p=0.522$	$\rho=-0.149$ $p=0.244$	$\rho=-0.235$ $p=0.064$	$\rho=0.147$ $p=0.250$
rs 1800471 (TGFβ1)	$\rho=0.062$ $p=0.628$	$\rho=-0.122$ $p=0.343$	$\rho=-0.015$ $p=0.909$	$\rho=-0.167$ $p=0.191$
rs 1800795 (IL-6)	$\rho=0.216$ $p=0.089$	$\rho=-0.273$ $p=0.030$	$\rho=-0.040$ $p=0.753$	$\rho=-0.169$ $p=0.187$
rs 9826 (RORγt)	$\rho=-0.076$ $p=0.554$	$\rho=-0.229$ $p=0.071$	$\rho=-0.141$ $p=0.271$	$\rho=-0.053$ $p=0.680$
rs 3761548 (Foxp3)	$\rho=-0.223$ $p=0.079$	$\rho=-0.120$ $p=0.348$	$\rho=-0.365$ $p=0.03$	$\rho=0.321$ $p=0.010$

4.8. Povezanost ispitivanih genskih polimorfizama sa kliničkim i imunološkim parametrima u SAFS

Nema značajne razlike u korelaciji koncentracija IL-17, IL-23, TGFβ i IL-6 i pojedinih genotipova polimorfizma za te interleukine u grupi obolelih sa sekundarnim AFS (Tabela 23. i Tabela 24.)

Tabela 23. Prikaz koncentracija IL-17 i IL-23 (srednja vrednost ± standardna greška) u funkciji genotipova u grupi obolelih od sekundarnog AFS; značajnost razlike: Kruskal-Wallis i Mann-Whitney test

<i>rs2275913 (IL-17A)</i>	<i>IL-17 (pg/ml)</i>	<i>IL-23 (pg/ml)</i>
<i>rs11209026 (IL-23)</i>		
GG	8.31 ± 1.47	8.43 ± 1.47
GA	6.69 ± 1.37	9.40 ± 7.21
AA	8.68 ± 3.01	-
	H=0.33 p=0.85	z=0.10 p=0.92

Tabela 24. Prikaz koncentracija TGFβ (srednja vrednost ± standardna greška) i IL-6 (medijana) u funkciji genotipova u grupi obolelih od sekundarnog AFS; značajnost razlike: Kruskal-Wallis i Mann-Whitney test

<i>rs1800471 (TGFβ1)</i>	<i>TGFβ (pg/ml)</i>	<i>IL-6 (pg/ml)</i>
<i>rs1800795 (IL-6)</i>		
CC	439.9 ± 180.6	7.4
GC	453.5 ± 159.3	31.25
GG	208.69 ± 84.48	38.28
	H=0.51 p=0.77	p>0.05

Postoji značajna korelacija ($p=0.029$) između prisustva gubitka ploda kod žena i genotipa polimorfizma gena za ROR γ t, kao i između prisustva arterijskih tromboza i genotipa polimorfizma gena za IL-23 ($p=0.037$) i IL-6 ($p=0.012$), kao i kod trombocitopenije i polimorfizma gena za Foxp3 ($p=0.025$) kod obolelih sa sekundarnim AFS (Tabela 25.).

Tabela 25. Korelacija glavnih kliničkih simptoma AFS i genotipova polimorfizama gena za interleukine u grupi obolelih od sekundarnog AFS (Spearman ρ)

POLIMORFIZMI	GUBITAK PLODA	VENSKA TROMBOZA	ARTERIJSKA TROMBOZA	TROMBOCITO PENIJA
rs 227591 (IL-17A)	$\rho=0.231$ $p=0.087$	$\rho=0.163$ $p=0.230$	$\rho=-0.102$ $p=0.453$	$\rho=0.248$ $p=0.065$
rs 763780 (IL-17F)	$\rho=-0.234$ $p=0.082$	$\rho=-0.260$ $p=0.053$	$\rho=0.187$ $p=0.168$	$\rho=0.085$ $p=0.532$
rs 11209026 (IL-23)	$\rho=0.120$ $p=0.378$	$\rho=0.073$ $p=0.594$	$\rho=0.280$ $p=0.037$	$\rho=-0.179$ $p=0.186$
rs 1800471 (TGFβ1)	$\rho=-0.206$ $p=0.128$	$\rho=0.073$ $p=0.593$	$\rho=0.095$ $p=0.487$	$\rho=-0.145$ $p=0.286$
rs 1800795 (IL-6)	$\rho=0.128$ $p=0.348$	$\rho=0.037$ $p=0.789$	$\rho=-0.332$ $p=0.012$	$\rho=-0.119$ $p=0.382$
rs 9826 (RORγt)	$\rho=0.293$ $p=0.029$	$\rho=0.214$ $p=0.113$	$\rho=-0.015$ $p=0.915$	$\rho=-0.179$ $p=0.186$
rs 3761548 (Foxp3)	$\rho=0.054$ $p=0.690$	$\rho=-0.054$ $p=0.695$	$\rho=-0.135$ $p=0.320$	$\rho=0.299$ $p=0.025$

5.0 DISKUSIJA

Ispitivanje izneto u ovom radu sprovedeno je sa ciljem da se sagleda uloga citokina i transkripcionih faktora u nastanku AFS, kao i moguća povezanost nastanka AFS sa određenim genotipovima na sedam polimorfnih mesta u genima za te citokine i transkripcione faktore. Svi ovi citokini i transkripcioni faktori su uključeni u neku od faza diferencijacije Th17 ili Treg ćelija. Prema dostupnim podacima iz literature, istraživanja povezanosti ovih citokina i udruženosti njihovih genskih polimorfizama sa antifosfolipidnim sindromom su retka, a takvi podaci ne postoje za srpsku populaciju (24).

Otkriće Th17 i T regulatornih ćelija je proširilo i znatno promenilo dosadašnji način razmišljanja u imunologiji. Brojna istraživanja su pokazala da Th17 ćelije imaju relevantnu, a ponekad i centralnu ulogu u nastanku autoimunskih oboljenja dok T regulatorne ćelije potencijalno čine jednu od najznačajnijih linija odbrane od autoimunskih bolesti. Novi pristup razumevanju patohistologije AFS uključuje i moguću ulogu Th17 u nastanku bolesti i doprinos IL-17 u indukciji i/ ili razvoju AFS, kao i moguću protektivnu ulogu Treg ćelija (199,200).

Danas je poznat veliki broj polimorfnih gena, među kojima su i geni za citokine, za koje je pokazana povezanost sa različitim bolestima kod čoveka. Rezultati najnovijih istraživanja pokazali su da pojedini polimorfizmi utiču na nivo ekspresije gena za citokine i na nivo citokina u telesnim tečnostima i tkivima. U analizi SNP-ova gena za citokine, prednost se daje upravo analizi funkcionalnih SNP-ova u regulatornim regionima gena koji mogu da se dovedu u vezu sa genskom ekspresijom i sklonošću ka različitim autoimunskim oboljenjima (201,202).

5.1 IL-17 i polimorfizmi u genima za IL-17A i IL-17F

Do otkrića Th17 ćelija 2005. godine, bio je uvrežen stav da su autoimunske bolesti posledica neravnoteže Th1 i Th2 ćelija, odnosno da su autoimunske bolesti posledica autoreaktivnosti Th1 ćelija. Otkriće Th17 i T regulatornih ćelija ukazalo je na mogućnost učešća ovih ćelijskih linija u patogenezu mnogih autoimunskih bolesti, uključujući i AFS. Th17 ćelije imaju ulogu u indukciji autoimunosti, a Treg inhibiraju autoimunost, a njihov balans je neophodan za održavanje homeostaze. Th17 ćelije proizvode IL-17 koji ima moćnu pro-inflamatornu aktivnost ali ima i brojne imuno-regulatorne funkcije, od kojih je najznačajnije učešće u podsticanju i posredovanju imunskog odgovora. Th17 ćelije su bile ispitivane u različitim autoimunskim bolestima ali nema publikovanih podataka o njihovoj povezanosti sa AFS.

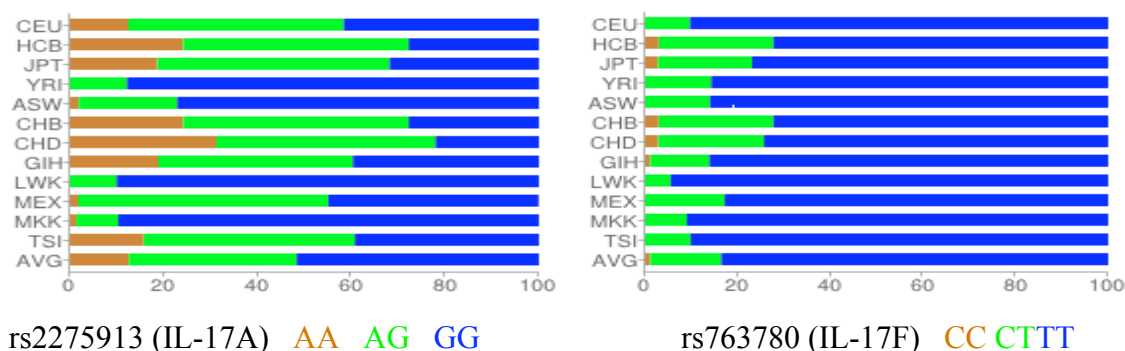
Zhao i saradnici su 2009. godine objavili da je produkcija IL-17 povećana kod pacijenata sa SEL (203), a kasnije su to potvrdili i drugi autori (204,205), naročito kod lupus nefritisa (206). Koncentracija IL-17 korelira sa aktivnošću bolesti, sa prisustvom imunskih kompleksa, aktivnošću komplementa i prisustvom anti DNK antitela kod ovih bolesnika. Ovi podaci su interesantni, jer je u našem istraživanju, kod svih pacijenata sa sekundarnim AFS, antifosfolipidni sindrom bio udružena sa SEL.

Rezultati dobijeni u našem istraživanju pokazuju da je koncentracija IL-17 značajno veća kod obolelih sa primarnim i sekundarnim AFS u odnosu na kontrolnu grupu (8.4; 7.6; 4.3 pg/ml; $p=0.0026$) i to je jedan od prvih takvih rezultata objavljenih u literaturi (207). Takođe smo utvrdili pozitivnu korelaciju između koncentracija IL-17 i IL-23 ($p<0.01$) u primarnom AFS, a u sekundarnom AFS značajna pozitivna korelacija postoji između IL-17 i IL-23 ($p<0.01$) i između IL-17 i TGF β ($p<0.05$), što ukazuje na moguću ulogu Th17 u razvoju AFS.

Jing Xiao i saradnici su 2012. godine objavili rezultate svojih istraživanja o proceni uloge Th1, Th2, Th17 i Treg u nastanku antifosfolipidnog sindroma i o njihovoj povezanosti sa prisustvom antifosfolipidnih antitela. Ti rezultati su takođe pokazali da kod obolelih od antifosfolipidnog sindroma postoji disbalans između Th1 i Th2 i između Th17 i T regulatornih ćelija. Antifosfolipidna antitela u većim koncentracijama mogla su značajno

da povećaju nivo Th2 i Th17 ćelija i smanje nivo Th1 i Treg ćelija kao i odnos Th1/Th2 u kulturi perifernih mononuklearnih ćelija kod pacijenata sa AFS (24).

U našoj studiji ispitivali smo učestalost pojedinih genotipova polimorfizama gena za IL-17A, rs2275913 i gena za IL-17F, rs763780, u sve tri grupe ispitanika. Prema podacima iz literature, učestalost tih genotipova u različitim delovima sveta – geografskim područjima je sledeća (*Grafikon 17.*):



Grafikon 17. Učestalost genotipova polimorfizama rs2275913 u genu za IL-17A i rs763780 u genu za IL-17F u različitim delovima sveta

(preuzeto: <http://www.snpedia.com/index.php/Rs2275913/Rs763780>)

Populaciona istraživanja su pokazala veliku raznolikost u distribuciji genotipova AA, AG i GG za rs2275913 u IL-17A kod opšte populacije u različitim delovima sveta. Zastupljenost genotipa GG se kreće od oko 20% u Kini (CHB) i Japanu (JPT), do oko 90% u Keniji (LWK) i Nigeriji (YRI). U centralnoj Evropi (CEU) je ta zastupljenost oko 49%. Sa druge strane, kod afričke populacije gotovo da uopšte nije zabeleženo prisustvo homozigotnih osoba AA genotipa, dok kod Azijata ta zastupljenost ide do 30%, u centralnoj Evropi oko 15%. Distribucija heterozigota AG genotipa u centralnoj Evropi je oko 34%.

Ispitivanja su takođe pokazala da 70-90% opšte populacije u različitim regionima ima TT genotip za IL-17F, a da su ostali heterozigotne osobe CT genotipa. Homozigoti CC su izuzetno retki u ovom polimorfizmu i javljaju se u par postotaka samo kod Japanaca i Kineza.

U našoj studiji u grupi obolelih sa primarnim AFS u genu za IL-17A, učestalost genotipa GG bila je 34%, genotipa GA 52% i genotipa AA 14%. Kod obolelih sa sekundarnim

AFS, 42% obolelih je bilo sa GG genotipom, 48% sa GA i 10% sa AA genotipom. Slična raspodela je bila i u kontrolnoj grupi: 36% ispitanika je bilo sa GG genotipom, 52% su bili GA heterozigoti i 12% ispitanika su bili homozigoti AA. Naši rezultati nisu ukazali na postojanje značajne razlike među ispitivanim grupama za ovaj polimorfizam, niti su nosioci bilo kog genotipa imali povećan rizik za nastanak bolesti. U literaturi nema podataka o mogućoj povezanosti polimorfizma rs2275913 sa antifosfolipidnim sindromom ali je distribucija učestalosti genotipova u našim grupama ispitanika, bilo da su oboleli ili ne, različita u odnosu na stanovnike centralne Evrope kod kojih postoji veća učestalost genotipa GG i manja učestalost heterozigota GA nego u srpskoj populaciji (GG genotip 49%, GA genotip 34%).

Drugi ispitivani polimorfizam je bio rs763780 u genu za IL-17F. Poznato je da IL-17F ima pro-inflamatornu ulogu u astmi, da je jasno izražen u disajnim putevima astmatičara i dobro korelira sa težinom bolesti. Polimorfizam rs763780 je ispitivan u japanskoj kontrolisanoj studiji, Kawguchija i saradnika, i prvi put je pokazano da homozigotni nosioci supstitucije T u C, koja dovodi do zamene histidina argininom na poziciji 161 u polipeptidnom lancu IL-17F, imaju funkcionalno manji rizik za nastanak astme (208). U drugoj studiji iz Japana, Arisawa i saradnici, su istraživali povezanost ulceroznog kolitisa i polimorfizama -197G/A, rs2275913, u genu za IL-17A i 7488T/C, rs763780, u genu za IL-17F. Njihovi rezultati su pokazali da je frekvencija IL-17A -197A/A i IL-17F 7488T/T genotipova značajno veća kod obolelih nego u kontrolnoj grupi i da IL-17A -197A i IL-17F 7488T aleli mogu nezavisno da utiču na podložnost i na patofiziološke karakteristike ulceroznog kolitisa (209). Sa druge strane, Seiderer i saradnici, nisu našli povezanost IL-17F His161Arg sa podložnošću za inflamacionu bolest creva (210). Jedna druga studija iz Poljske je pokazala da IL-17F His161Arg varijanta može biti povezana sa povećanom aktivacijom reumatoidnog artritisa (211), a u studiji iz Koreje, Janga i saradnika, je pokazano da genotipovi AG i GG imaju pozitivnu asocijaciju sa Behcetovom bolešću (212). Saitoh i saradnici su nedavno otkrili udruženost IL-17F 7488T alela sa razvojem hronične idiopatske trombocitopenije (213).

U našem istraživanju za lokus rs763780, IL-17F, nije zabeleženo prisustvo osoba sa CC genotipom, a distribucija ostala dva genotipa, TT i CT, je slična kod osoba sa primarnim, sekundarnim AFS i kod kontrolne grupe ispitanika (TT: 92%, 90%, 94% i CT:8%, 10% i 6% redom). Iako našom studijom nije uvrđena značajna udruženost ovog polimorfizma sa nastankom antifosfolipidnog sindroma, a nema ni takvih podataka u literaturi, treba

napomenuti da je distribucija dva genotipa, TT i CT, kod naših ispitanika slična njihovoj raspodeli kod ispitanika u centralnoj Evropi (TT: 91%, CT: 7%).

Nismo našli značajnu korelaciju koncentracije IL-17 i pojedinih genotipova oba polimorfizma za te interleukine u grupi obolelih sa primarnim i sekundarnim AFS.

U toku istraživanja smo vršili korelaciju između koncentracija IL-17 i prisustva kliničkih simptoma: gubitak ploda, venske i arterijske tromboze i trombocitopenije. Značajno se češće javlja trombocitopenija kod obolelih sa primarnim AFS koji imaju povišenu koncentraciju IL-17 ($p=0.011$), dok te korelacije nema kod obolelih sa sekundarnim AFS, niti kod kontrolne grupe ispitanika. Ova korelacija upućuje na mogućnost da IL-17 može doprineti nastanku vaskularnih manifestacija AFS.

U primarnom AFS je postojala korelacija između gubitka ploda i polimorfizma gena za IL-17A ($p=0.02$) i IL-17F ($p=0.033$) Međutim, kada su analizirane samo žene, nije nađena korelacija koja je postojala kada je analizirana cela grupa.

Utvdili smo da kod PAFS postoji korelacija između pojave arterijskih tromboza i TT genotipa polimorfizma gena za IL-17F ($p=0.05$).

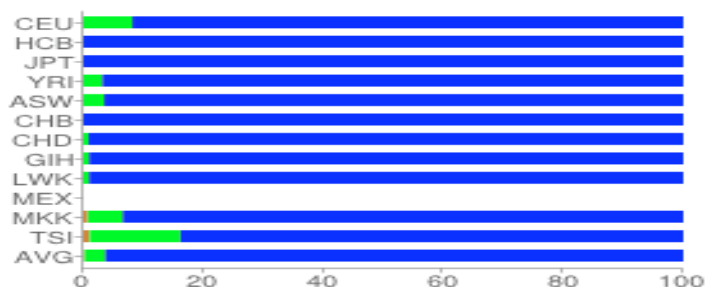
Pored toga, u grupi SAFS našli smo granično značajnu korelaciju ($p=0.053$) između pojave venske tromboze i GA genotipa za IL-17F, dok je značajnost korelacije između trombocitopenije i GG genotipa za IL-17A bila $p=0.065$.

5.2 IL-23 i polimorfizam u genu za IL-23

Uključenost IL-12p40 u patogenezu autoimunskih bolesti dugo je pogrešno tumačena, da bi 2000. godine Oppmann i saradnici dokazali da je IL-23, a ne IL-12, ključni faktor u razvoju autoimunskih bolesti (55). IL-23 ima jedinstvenu ulogu u održavanju već diferenciranih Th17 ćelija, a njegova povećana koncentracija je detektovana kod SEL pacijenata sa inflamatornim kožnim promjenama uključujući i serozitis (214). Th17 ćelije su pokretači oštećenja tkiva kod pacijenata sa SEL, gde IL-17 može biti prognostički marker za nastanak bolesti, a IL-23 potencijalni marker za terapiju bolesti (215-217).

U ovoj studiji smo merili koncentraciju IL-23 u serumu naših ispitanika. Naši rezultati pokazuju da je koncentracija IL-23 značajno veća kod obolelih sa primarnim AFS u odnosu na sekundarni AFS i kontrolnu grupu (14.3; 8.5; 7.8 pg/ml redom; $p=0.00006$) i korelira sa IL-17 u obe grupe obolelih ispitanika ($p<0.01$). Značajno povećana koncentracija IL-23 i njegova povezanost sa IL-17 ukazuje na moguću uključenost ovog citokina u održavanju Th17 odgovora.

Analizirali smo polimorfizam rs11209026 u genu za IL-23R, a njegova distribucija u svetu je prikazana na *Grafikonu 18*. Učestalost genotipa GG je preko 80% u različitim delovima sveta, a u našoj studiji je taj genotip bio zastupljen u preko 90% ispitanika sa približno istom učestalošću u sve tri grupe.



rs11209026 (IL-23) AA AG GG

Grafikon 18. Učestalost genotipova polimorfizama rs11209026 u genu za IL-23 u različitim delovima sveta

(preuzeto: <http://www.snpedia.com/index.php/Rs11209026>)

Ovaj polimorfizam je najviše ispitan u Chron-ovoj bolesti, ulceroznom kolitisu, psorijazi, reumatoidnom artritisu, ali ne i u antifosfolipidnom sindromu. Retki alel A ima protektivnu ulogu kod Chron-ove bolesti i kod psorijaze, a u reumatoidnom artritisu je ovaj polimorfizam udružen sa povećanom produkcijom IL-17A, što za posledicu ima pojačanu razgradnju kostiju(218,219).

Kod naših ispitanika nismo našli značajnu razliku učestalosti za ovaj polimorfizam u ispitivanim grupama, niti povećan rizik za nastanak antifosfolipidnog sindroma udružen sa ovim lokusom.

Takođe nismo našli značajnu korelaciju između povećane koncentracije IL-23 i prisustva nekog od kliničkih simptoma kod obolelih sa primarnim i sa sekundarnim AFS.

Nema značajne razlike ni u prosečnoj koncentraciji IL-23 kod genotipova GG, GA i AA ovog polimorfizma u grupi obolelih sa primarnim i sekundarnim AFS.

Sa druge strane, u našem ispitivanju smo utvrdili da postoji značajna korelacija između prisustva arterijskih tromboza i GG genotipa polimorfizma gena za IL-23 ($p=0.037$) kod obolelih sa sekundarnim AFS.

Našli smo značajnost korelacije između pojave arterijske tromboze i GA genotipa za IL-23 $p=0.064$, kod PAFS.

5.3 *TGFβ i polimorfizam u genu za TGFβ1*

TGFβ ima paradoksalnu sposobnost da na istom putu diferencijacije deluje sa dva suprotna efekta. Ova dualistična priroda TGFβ se ogleda u njegovoj sposobnosti da se u prisustvu IL-6 diferencijacija naivnih CD4+ ćelija odvija u pravcu Th17 ćelija, u prisustvu IL-2 u pravcu regulatornih T ćelija, a posebno u prisustvu IL-4 u pravcu Th9 ćelija. Lokalni citokinski milje, kao i prisustvo RORγt ili Foxp3, transkripcionih faktora za Th17 i Treg ćelije, zajedno sa TGFβ održavaju sistem u dinamičkoj ravnoteži koja je u autoimunskim bolestima narušena (220). Uspešna terapija bi trebalo da blokira diferencijaciju Th17 ćelija i istovremeno da poveća broj i funkciju regulatornih T ćelija (221).

Saxena i saradnici su u svojim istraživanjima pokazali da TGFβ inhibira imunološke reakcije kod SLE sprečavajući aktivaciju T ćelija, a sa druge strane dovodi do fibroze i oštećenja bolešću zahvaćenih organa (222). Ovi suprotni efekti ukazuju na dvostruku funkciju TGFβ u okviru iste bolesti na sistemskom nivou, što i u kliničkom smislu potvrđuje dualističku prirodu ovog citokina.

U našoj studiji postoji povećana koncentracija TGFβ kod pacijenata sa primarnim AFS u odnosu na one sa sekundarnim AFS i u odnosu na kontrolnu grupu ali nije statistički značajna (411.3; 288.3; 158.7 pg/ml redom). Utvrđena je značajna razlika u koncentraciji TGFβ između PAFS i kontrolne grupe ($p=0.042$). Povećana koncentracija TGFβ korelira sa IL-17 u sekundarnom, ali ne i u primarnom AFS i ne korelira sa IL-23. Ovo može da bude u saglasnosti sa kompleksnom ulogom TGFβ koja u mnogome zavisi od prisustva drugih citokina. Ne postojanje povezanosti sa IL-23, niti u primarnom niti u sekundarnom AFS ukazuje na to da je povećana koncentracija IL-17 pre regulisana sa IL-23 nego sa TGFβ.

Polimorfizam rs1800471 u genu za TGFβ, smešten na poziciji 915 u prvom egzonu, dovodi do supstitucije arginina prolinom na 25. poziciji u polipeptidu, što dovodi do smanjene produkcije TGFβ. Prema našim saznanjima, u literaturi nema podataka o povezanosti ovog polimorfizma sa AFS, dok postoje oprečni podaci o povezanosti ovog polimorfizma sa SLE. Lu i saradnici su u studiji kod 134 bolesnika sa SLE i 182 zdravih osoba pokazali da ovaj polimorfizam ne predstavlja genetsku predispoziciju za nastanak

SLE kod stanovnika Tajvana (223). U drugoj studiji, Schotte i saradnici, nisu našli nikakvu vezu između G915C kod nemačkog stanovništva (224). Za razliku od ovih podataka, Guarnizo-Zuccardi i saradnici su pronašli snažnu povezanost SLE sa smanjenom produkcijom TGF β i veću frekvenciju heterozigotnog genotipa ovog polimorfnog markera kod pacijenata u Kolumbiji (225).

Kod naših ispitanika sa primarnim i sekundarnim AFS, nismo našli korelaciju ispitivanih genotipova i alela polimorfizma rs1800471 sa koncentracijom TGF β .

Takođe nismo našli povezanost polimorfizma G915C sa bilo kojim od ispitivanih kliničkih znakova u obe grupe obolelih.

U našem ispitivanju je bio značajno češći alel C kod ispitanika sa primarnim AFS u odnosu na ispitanike sa sekundarnim AFS (χ^2 test, $p=0.012$) i u odnosu na ispitanike kontrolne grupe (χ^2 test, $p=0.04$). Analiza unakrsnog odnosa šanse između grupa PAFS i kontrola je pokazala vrednost OR=3.4 (1.11-10.46) za CC genotip (u grupi PAFS), i to prema recesivnom modelu. Ova vrednost OR ukazuje na predisponirajuću ulogu CC genotipa kod PAFS. S obzirom na to da, kao što je napred navedeno, u našem ispitivanju ovaj polimorizam ne utiče na nivo TGF β , prirodu utvrđene asocijacije tek treba ispitati.

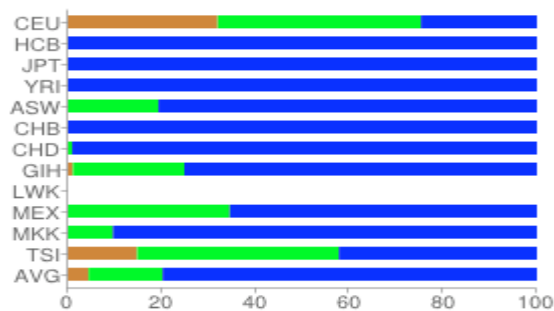
5.4 *IL-6 i polimorfizam u genu za IL-6*

IL-6 je plejotropni citokin sa širokim spektrom bioloških funkcija u imuno regulaciji, hematopoezi, inflamaciji i onkogenezi. On indukuje stvaranje Th17 ćelija, inhibira T regularnu ćelijsku diferencijaciju i važan je faktor u održavanju Th17/Treg ravnoteže. Disregulacija IL-6 može dovesti do narušavanja balansa Th17/Treg i potom do nastanka inflamatornih i autoimunskih bolesti. Njegova serumska koncentracija je povećana u autoimunskim bolestima, a ciljana blokada IL-6 je novi pristup njihovom lečenju (132).

Pacijenti sa sistemskim eritemskim lupusom imaju povišen nivo IL-6 u serumu koji je u nekim studijama u korelaciji sa aktivnošću bolesti i nivoom anti DNK antitela (226). Pacijenti sa sekundarnim AFS u našoj studiji imaju viši nivo IL-6 u odnosu na pacijente sa primarnim AFS i u odnosu na kontrolnu grupu, u kojoj su svi ispitanici imali nedektabilan nivo IL-6. Kod pacijenata sa sekundarnim AFS postoji pozitivna korelacija između IL-17 i TGF β što uz prisustvo IL-6 može da usmeri diferencijaciju u pravcu Th17 ćelija.

Polimorfizam rs1800795 (G-174C) se nalazi u promotorskom regionu gena za IL-6 na 7. hromozomu (7p21). On utiče na nivo ovog citokina i to tako što je genotip G/G povezan sa povećanom produkcijom IL-6 u odnosu na C/C genotip. Prema jednoj studiji, kod obolelih od juvenilnog artritisa C alel je udružen sa sniženim vrednostima IL-6, a CC genotip ima protektivnu ulogu (227). Takođe postoji podatak da je povišen nivo IL-6 povezan sa arterijskim i venskim trombozama ali nije uvek uočena udruženost ovog polimorfizma sa rizikom od tromboza, cerebrovaskularnih oboljenja i bolesti koronarnih krvnih sudova (228). Udruženost polimorfizma rs1800795 (G-174C) je opisana kod Graves-ove bolesti u turskoj populaciji (229) i u sistemskoj sklerozi u rumunskoj populaciji (230). Međutim, u različitim studijama su rezultati kotradiktorni i SNP frekvencija upadljivo varira među različitim geografskim i etničkim grupama (231).

Regulacija ekspresije IL-6 je jako kompleksna i zavisi i od drugih polimorfizama u promotoru gena, a pored toga na nju utiču i drugi citokini, te međusobna interakcija njihovih polimorfizama kodeterminiše eventualnu udruženost sa AFS. Kod belaca je ovaj lokus prilično polimorfan, a kod Azijata i Afrikanaca je gotovo monomorfan (*Grafikon 20.*).



rs1800795(IL-6) CC CG GG

Grafikon 19. Učestalost genotipova polimorfizama rs1800795 u genu za IL-6 u različitim delovima sveta

(preuzeto:<http://www.snpedia.com/index.php/Rs1800795>)

U našem ispitivanju, kod obolelih iz obe grupe je češći GG genotip u odnosu na kontrolnu grupu ali nismo našli statističku značajnost razlike. Alel G je kod obolelih sa primarnim AFS češći u odnosu na kontrolu grupu ali je i tu značajnost bila granična ($p=0.055$).

Postoji značajna korelacija između venske tromboze i GG + GC genotipa polimorfizma gena za IL-6 kod primarnog AFS ($p=0.03$) i arterijske tromboze i GG genotipa kod sekundarnog AFS ($p=0.012$).

5.5 *ROR γ t* i polimorfizam u genu za *ROR γ t*

ROR γ t je nuklearni receptor iz familije transkripcionih faktora koji ima važnu ulogu u regulaciji razvoja Th17 ćelija i ekspresiji gena za IL-17, a kodiran je genom RORC na prvom hromozomu (1q21.3). Na tom genu je locirano 694 polimorfizama u različitim regionima, a polimorfizam rs9826, koji smo ispitivali, lociran je na poziciji 2714 u regionu UTR3' (232).

Distribucija alela ovog polimorfizma u populaciji stanovništva centralne Evrope je za redi alel C 37%, a za alel T 63%. Distribucija genotipova za ovaj polimorfizam u evropskoj populaciji je: TT 40%, CT 46% i CC 14%.

U našoj studiji u kontrolnoj grupi učestalost alela T iznosi 69%, a alela C 31%. U grupi ispitanika sa primarnim AFS je alel A zastupljen u 64% ispitanika, odnosno 66% u grupi sa sekundarnim AFS. Distribucija genotipova je slična u sve tri naše ispitivane grupe, a u odnosu na distribuciju genotipova u evropskoj populaciji, u našoj populaciji, je manje zastupljen genotip CC.

U literaturi nema studija asocijacije polimorfizma rs9826 sa AFS. U metacentričnoj studiji je ispitivan, između ostalih i ovaj polimorfizam u asocijaciji sa infarktom miokarda i koronarnom bolešću i utvrđen je mogući rizik (233).

U našoj studiji je utvrđena značajna korelacija između gubitka ploda kod žena i prisustva T alela polimorfizma gena za ROR γ t kod sekundarnog AFS ($p=0.029$).

5.6 *Foxp3* i polimorfizam u genu za *Foxp3*

Otkriće *Foxp3* kao ključnog faktora transkripcije regulatornih T ćelija predstavlja važan događaj u razumevanju nastanka i razvoja ovih ćelija. Indukcija *Foxp3* gena u normalnim T ćelijama dovodi do njihovog preobraćanja u regulatorne T ćelije sa in vitro i in vivo dokazanom supresivnom funkcijom. U autoimunskim bolestima postoji nizak nivo Treg ćelija koje u malom broju ne mogu da zaštite čoveka od njegovih sopstvenih odbrambenih mehanizama.

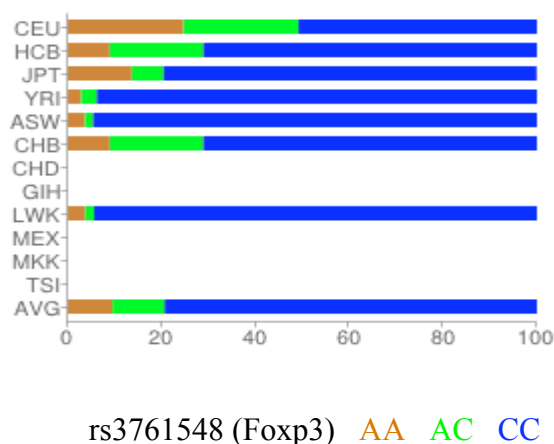
U nekoliko studija je objavljeno da je broj regulatornih T ćelija smanjen kod bolesnika sa SLE, RA, Sjogrenovim sindromom i multiplom sklerozom (234-237). Fu i saradnici su na životinjskom modelu pokazali da je kod pacova sa AFS snižen i broj i funkcija CD4⁺CD25⁺*Foxp3*⁺ T reg ćelija (238).

Polimorfizmi su opisani u različitim regionima *Foxp3* gena, ali kako je promotorski region važan zbog transkripcije i ekspresije gena, polimorfizmi u ovom regionu mogu da promene funkciju *Foxp3* gena i da dovedu do nastanka autoimunskih bolesti. Postoji pet polimorfizama u promotorskom regionu *Foxp3* gena: -924A/G (rs2232365), -1383C/T (rs2232364), -2382C/T (rs3761549), -3279C/T (rs3761548) i -3499A7G (rs3761547) (239). Genotip AA polimorfizma rs3761548 dovodi do neispravne transkripcije *Foxp3* i do povećanog rizika za nastanak psorijaze u istraživanjima Shen i saradnika (240). Sa druge strane, Song i saradnici su objavili da nisu našli udruženost ovog polimorfizma sa psorijazom u kineskoj populaciji (241). Ovaj polimorfizam je najviše ispitan u alergijskom rinitisu i prema studiji Zhang i saradnici, kod žena homozigota, genotip AA ima protektivnu ulogu (242). Ovaj polimorfizam je takođe povezan sa razvojem Graves-ove bolesti kod žena sa SLE sa nižim titrom anti DNK antitela (243), a udružen je i sa neobjašnjivim spontanim pobačajima u kineskoj populaciji (244).

Nedavno je kineska grupa autora objavila rezultate svojih istraživanja kod pacijenata sa vitiligom. Oni su našli udruženost polimorfizma rs3761548 sa vitiligom putem disregulacije T regulatornih ćelija. Rizik je bio veći kod pacijenata muškog pola, starijih od 20 godina, sa pridruženim nekim drugim autoimunskim bolestima (245). Udruženost ovog polimorfizma postoji i kod akutnog koronarnog sindroma u kineskoj populaciji

(246), a u indijskoj populaciji alel A ima zaštitnu, a alel C predisponirajuću ulogu u pre-eklampsiji (247).

Kada uporedimo dobijene učestalosti genotipova sa učestalostima iz različitih studija u Evropi i u svetu, možemo da konstatujemo da su one prilično neusaglašene. Naime, učestalost genotipova polimorfizma rs3761548 je drugačija u Evropi u odnosu na druge populacije u svetu (*Grafikon 21.*). Genotipovi AA i AC su zastupljeni sa po 25% učestalosti u Evropi, dok je ta učestalost u drugim populacijama 5-15%. U našoj studiji u kontrolnoj grupi AA genotip je zastupljen sa 44%, a AC sa 24%. U primarnom AFS kod žena je zastupljenost AA genotipa 24%, a AC 46%, a u sekundarnom AA 23%, a AC 52%. Kod muškaraca je ta zastupljenost u PAFS za A 31%, a za C 69%, odnosno za A 33% i za C 67% u SAFS, dok je u kontrolnoj grupi za A 72%, a za C 25%. Moguće objašnjenje ove inverzije u kontrolnoj grupi je mali broj ispitanika muškog pola.



Grafikon 20. Učestalost genotipova polimorfizama rs3761548 u genu za Foxp3 u različitim delovima sveta

(preuzeto: <http://www.snpedia.com/index.php/Rs3761548>)

Postoji značajna korelacija između prisustva trombocitopenije i postojanja C alela (u homozigotnoj ili hemizigotnoj formi) polimorfizma gena za Foxp3 kod primarnog AFS ($p=0.01$), kao i kod sekundarnog AFS ($p=0.025$). Takođe postoji korelacija između prisustva arterijske tromboze i A alela (u homozigotnoj ili hemizigotnoj formi) polimorfizma gena za Foxp3 kod primarnog AFS ($p=0.03$).

5.7 Završna diskusija

Prema našim saznanjima, ovo je prva studija koja je pokazala da su koncentracije IL-17, IL-23 i TGF β povećane u krvi pacijenata sa primarnim antifosfolipidnim sindromom (207). To ukazuje na pojačan Th17 odgovor kod ovih pacijenata. Takođe smo kod tih pacijenata pokazali pozitivnu korelaciju između IL-17 i IL-23, što je u skladu sa poznatom ulogom IL-23 u podsticanju sekrecije IL-17 kod T limfocita (248,249). Sa druge strane, nismo pronašli vezu IL-17 i IL-23 sa TGF β . Povećana koncentracija TGF β može biti povezana sa bolešću na neki drugi način, jer TGF β , za koga se zna da je moćni anti inflamatorni molekul, može imati protektivnu ulogu u PAFS. To je u skladu sa složenom ulogom TGF β u diferencijaciji kako Th17 tako i Treg ćelija. U prisustvu visoke koncentracije TGF β i IL-2 i odsustvu IL-6, podstiče se razvoj regulatornih T ćelija, a u niskim koncentracijama TGF β i uz sinergističko dejstvo IL-6 diferencijacija se odvija u pravcu Th17 ćelija (154,130). Iako je u više studija potvrđen povišen nivo IL-6 (250,251) u AFS, u našim rezultatima to povećanje nije bilo statistički značajno, te i dalje ostaje da se istraži da li TGF β u PAFS podržava Th17 ili Treg ćelijsku diferencijaciju. U zavisnosti od koncentracije, TGF β može da održava ravnotežu između Th17 i Treg, a kao posledica tog balansa, bolest će biti u remisiji ili recidivu. On kao regulatorni prekidač u kombinaciji sa drugim citokinima programira diferencijaciju CD4⁺ ćelija u različitim pravcima. Ipak, ova studija ukazuje da povećan nivo IL-17 kod obolelih sa primarnim AFS pre može biti zbog povećane regulacije sa IL-23 nego zbog TGF β .

U grupi sa sekundarnim AFS, značajno veći broj naših ispitanika je imao povećanu koncentraciju IL-17 i IL-6 u odnosu na kontrolnu grupu i pozitivnu korelaciju između IL-17 i IL-23 i između IL-17 i TGF β . Kod ovih bolesnika su i IL-23 i TGF β zajedno sa IL-6 uključeni u iniciranje i/ili održavanje Th17 odgovora. Nejasan je mehanizam kojim TGF β udružen sa IL-6 generiše inflamatorne, a ne imunosupresivne T ćelije. IL-6 inhibira aktivnost Foxp3 i time zajedni sa TGF β igra osnovnu ulogu u održavanju ravnoteže između Th17 i Treg ćelija. Moguć odgovor leži u činjenici da sam TGF β u većoj koncentraciji podstiče diferencijaciju regulatornih T ćelija koje imaju sposobnost da suprimiraju imuni odgovor i održavaju ravnotežu. Pored toga, u nekoliko skorašnjih studija se podržava protektivno delovanje TGF β kod pacijenata sa SLE (252,253), od kojih je polovina dijagnostikovana sa sekundarnim AFS. Takođe je u nekoliko skorašnjih

izveštaja pokazano da je u krvi bolesnika sa SLE povećana koncentracija IL-17 i da su intenzitet i aktivnost bolesti povezani sa jačinom Th17 odgovora (254,255). Ovi efekti izgleda da su barem delom vezani za sposobnost IL-17 da promoviše opstanak i proliferaciju B ćelija, kao i njihovu diferencijaciju u plazmocite (256). Mi u ovom istraživanju nismo našli dokaze da postoji veza između povećane koncentracije IL-17 i povećane proizvodnje antifosfolipidnih antitela. Iako je prisustvo antifosfolipidnih antitela jedan od kriterijuma AFS, moguće je da povećana koncentracija IL-17 doprinosi kliničkoj manifestaciji bolesti kao dodatni faktor, okidač ili “second hit” za nastanak tromboze. I zaista, naši rezultati su pokazali tendenciju ka većim koncentracijama IL-17 kod pacijenata sa venskim trombozama kod sekundarnog AFS.

Zanimljivo je da su pacijenti sa primarnim AFS i trombocitopenijom imali znatno veću produkciju IL-17. Iako mehanizam koji dovodi do smanjenja broja trombocita u AFS još nije definisan, izgleda da pacijenti sa teškim trombocitopenijama imaju manje trombotične epizode (257), što navodi na intrigantna razmišljanja da IL-17 doprinosi i pokretanju i zaštiti od tromboembolijskih komplikacija u AFS. Tačna uloga IL-17 u trombozi i trombocitopeniji u AFS tek treba da se utvrdi.

Da bi istražili moguće razloge povećane proizvodnje IL-17 u AFS, analizirali smo dva najčešća polimorfizma: rs2275913 koji se nalazi u promotorskom regionu IL-17A gena i rs763780 u IL17F genu. Međutim, povećana proizvodnja IL-17 nije bila u korelaciji sa nijednim alelom ispitivanih polimorfizama. Espinoza i saradnici su pokazali da je alel 197A udružen sa visokim rizikom od odbacivanja kalema protiv domaćina, odnosno da u in vitro uslovima stimulisane T ćelije zdravih donora koji poseduju 197A alel proizvode znatno više IL-17 u odnosu na one koji nemaju ovaj alel (258). Iako našom studijom nije utvrđena značajna povezanost ispitivanih polimorfizama IL-17A i IL-17F gena sa nastankom AFS, alelska frekvenca u svim grupama naših ispitanika je bila slična sa ranije objavljenim rezultatima kod Norvežana (259). Postoji disekvilibrijum između ova dva polimorfizma ali nema značajne asocijacije haplotipova sa AFS, te tu povezanost haplotipova tek treba ispitati.

Nismo našli ni povezanost koncentracija drugih citokina sa učestalošću pojedinih genotipova i alela njihovih polimorfizama, te smo mišljenja da ispitivani polimorfizmi ne mogu uticati na rizik obolevanja od AFS. U literaturi nema studija asocijacija ispitivanih polimorfizama u genima IL-17A, IL-17F, IL-23, TGF β i IL-6 sa antifosfolipidnim

sindromom ali postoje podaci i potvrde o asocijacijama sa drugim autoimunskim bolestima, što je uticalo na naš izbor polimorfizama. U literaturi takođe postoji puno podataka o odsustvu asocijacije polimorfizama sa autoimunskim bolestima, tako da naša studija nije izuzetak.

Ne postojanje korelacije između proizvodnje citokina i polimorfizama u njihovim genima u našoj studiji može biti zbog činjenice da ove citokine mogu lučiti različite ćelije, a ne samo T ćelije, kao i činjenica da drugi polimorfizmi, kao i drugi faktori mogu da utiču na ekspresiju gena za IL-17, IL-23, TGF β i IL-6. Iako precizan uticaj ovih polimorfizama na ekspresiju njihovih gena zahteva nova, dodatna istraživanja, naši rezultati ukazuju na to da je malo verovatno da su ovi SNP uključeni u patogenezu AFS.

Naša studija je pokazala da je kod ispitanika sa primarnim AFS značajno češći C alel kod polimorfizma rs1800471 u TGF β genu i G alel kod polimorfizma rs1800795 u IL-6 genu ali kako ovi polimorfizmi ne utiču na nivo TGF β i IL-6, prirodu utvrđene asocijacije tek treba ispitati.

Ispitali smo i utvrdili povezanost određenih genotipova i alela sa pojavom kliničkih simptoma AFS. Postoji značajna korelacija između prisustva trombocitopenije i postojanja C alela, u homozigotnoj ili hemizigotnoj formi, polimorfizma gena za Foxp3 kod primarnog kao i kod sekundarnog AFS. Arterijska tromboza je kod primarnog AFS povezana sa TT genotipom polimorfizma gena IL-17F i sa alelom A polimorfizma gena za Foxp3, a sa GG genotipom polimorfizama gena IL-23 i IL-6 u sekundarnom AFS. Venska tromboza je u korelaciji sa GG+GC genotipom polimorfizma gena za IL-6 kod primarnog AFS. Samo kod polimorfizma za ROR γ t je T alel bio povezan sa gubitkom ploda i to kod sekundarnog AFS.

Asocijacije ispitivanih polimorfizama su vezane za vaskularne manifestacije antifosfolipidnog sindroma, bilo da su to arterijske ili venske tromboze ili trombocitopenija kao jedini klinički simptom čija je pojava povezana sa povećanom produkcijom IL-17 u primarnom AFS.

Imajući u vidu sve napred navedeno i da različiti genotipovi inter-reaguju između sebe i sa mnogim faktorima spoljašnje sredine i domaćina, neophodna su dodatna funkcionalna i genetska istraživanja da bi se pravilno procenio doprinos pojedinih genotipova na sklonost ka nastanku antifosfolipidnog sindroma. Istraživanja većeg broja SNP u ovim

genima bi dala bolji uvid i više podataka o njihovoj mogućoj povezanosti sa rizikom od oboljevanja. Iako naši rezultati ukazuju na povezanost povećane sekrecije IL-17 i tromboze u antifosfolipidnim sindromu, dalja istraživanja treba da istraže umešanost Th17 ćelija u vaskularne i druge kliničke manifestacije ovog autoimunskog poremećaja.

6.0 ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata ove doktorske disertacije, doneti su sledeći zaključci:

1a Po prvi put je pokazano da su koncentracije IL-17, IL-23 i TGF β povećane u krvi pacijenata sa primarnim antifosfolipidnim sindromom, što ukazuje na pojačan Th17 odgovor kod ovih pacijenata.

1b Postoji značajna pozitivna korelacija između nivoa IL-17 i IL-23 u primarnom AFS i između nivoa IL-17 i IL-23 odnosno IL-17 i TGF β u sekundarnom AFS, pa se može smatrati da povećan nivo IL-17 kod PAFS može biti posledica njegove direktne regulacije sa IL-23, a kod SAFS mogu biti i IL-23 i TGF β uključeni u Th17 odgovor.

1c Ne postoji značajna korelacija između koncentracije interleukina IL-17, IL-23 i TGF β i prisustva, odnosno, odsustva antitela aCL i β_2 GP I IgG i IgM klase, LA i ANA kod obolelih od AFS.

1d Uočeno je da oboleli sa primarnim AFS i povišenom koncentracijom IL-17 značajno češće imaju trombocitopeniju, što ukazuje da povećana aktivnost IL-17 može biti povezana sa vaskularnim manifestacijama u primarnom AFS.

2 Utvrđena je učestalost genotipova i alela ispitivanih polimorfizama gena za IL-17, IL-23, TGF β , IL-6, ROR γ t i Foxp3 i nije bilo značajne razlike među ispitivanim grupama, a njiova distribucija nije značajno odstupala od njihove raspodele u centralnoj Evropi

3a Nismo našli povezanost koncentracija IL-17, IL-23, TGF β i IL-6 sa učestalošću pojedinih genotipova i alela ispitivanih polimorfizama.

3b Analiza polimorfizama rs1800471 gena za TGF β i rs1800795 i gena za IL-6 je pokazala statistički značajno veću učestalost C alela rs1800471 i G alela rs1800795, ali kako ovi polimorfizmi ne utiču na nivo TGF β , odnosno IL-6, prirodu utvrđene asocijacije tek treba ispitati.

4a Utvrđena je povezanost između pojave arterijskih tromboza i TT genotipa na lokusu rs763780 gena za IL-17F i A alela na lokusu rs3761548 gena za Foxp3 kod primarnog AFS.

4b Postoji povezanost između pojave venskih tromboza i prisustva G alela na lokusu rs1800795 gena za IL-6 kod primarnog AFS.

4c Utvrđena je povezanost između gubitka ploda kod žena i prisustva T alela polimorfizma gena za ROR γ t kod sekundarnog AFS.

4d Postoji povezanost između pojave arterijskih tromboza i GG genotipa na lokusu rs11209026 gena za IL-23 i GG genotipa na lokusu rs1800795 gena za IL-6 kod sekundarnog AFS.

4e Utvrđena je povezanost između prisustva trombocitopenije i C alela na lokusu rs3761548 gena za Foxp3 i kod primarnog i kod sekundarnog AFS

7.0 POPIS SKRAĆENICA

aFL - antifosfolipidna antitela (antiphospholipid antibodies)

AFS - antifosfolipidni sindrom (antiphospholipid syndrome)

AhR - aril monovalentni aromatični radikal ugljovodonika receptor (aryle hydrocarboné receptor)

aKL - antikardiolipinska antitela (anticardiolipn antibodies)

Akt3/PKB/PI3K - serin/treonin kinaza/protein kinaza B/ fosfoinozitol3 kinaza (akt/protein kinase B/phosphoinositide3 kinase)

ANA - antinuklearna antitela (antinuclear antibodies)

AP-1 - transkripcioni faktor (activator protein 1)

ATRA - tretinoin (all-trans retinoic acid)

β₂GP-I - anti β₂ glikoprotein I antitela (anti β₂ glikoprotein I antibodies)

BCL-2 - protoonkogen (B cell leukemia 2)

BCL-6 - protoonkogen (lymphoma 6 protein)

BSF-2 - B ćelijski stimulišući faktor (B cell stimulating factor)

Caspase 3 - kaspaza 3 (cystein-aspartic-acid-protease)

CCR6 - hemokinski receptora tip 6 (chemokine C-C motif receptor 6)

CDF - citotoksični T faktor diferencijacije (cytotoxic T cell differentiation factor)

CI - interval pouzdanosti (confidence interval)

CLC - kardiotrofinu sličan citokin (cardiotrophin like cytokine)

CNP - polimorfizam broja kopija (copy number polymorphism)

CNS2 - konzervirana nekodirajuća sekvenca 2 (conserved noncoding sequence 2)

CNTF - cilijarni neutrofilni faktor (ciliary neutrophilic factor)

CT-1 - kardiotrofin1 (cardiotrophin 1)

CTLA8 - citotoksični T limfocitni asocirani antigen 8 (cytotoxic T lymphocyte associated antigen 8)

CTLA4 - citotoksični T limfocitni antigen 4 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4)

CXCR5 - hemokinski receptor tip5 (chemokine receptor 5)

DAXX - protein kodiran DAXX genom (death associated protein 6)

DNK - dezoksi-ribonukleinska kiselina (deoxyribonucleic acid)

EAE - eksperimentalni autoimuni encefalomijelitis (experimental autoimmune encephalomyelitis)

ECL - elektro-hemi-luminiscencija (electro chemi luminescencia)

ELISA - enzim vezujući imunosorbent test (enzyme linked immunosorbent assay)

ELK1 - transkripcioni faktor E (E twenty six like transcription factor)

Foxp3 - transkripcioni faktor T regulatornih ćelija (forkhead box protein 3)

GATA3 - transkripcionih faktora Th2 ćelija, ima sposobnost da se veže za DNK sekvencu „GATA“

GHK - glavni histokompatibilni kompleks

GITR - glikokortikoid indukovan faktor nekroze tumora receptor (glucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor)

HPGF/HGF - hibridoma/plazmocitni faktor rasta (hybridoma/plasmocytoma growth factor)

HSF - hepatocitni stimulišući faktor (hepatocyte stimulating factor)

ICOS - inducibilni T ćelijski kostimulator (inducible T cell costimulator)

ID - inserciono-delecioni polimorfizam (insertion/deletion polymorphism)

IBD - inflamatorna boleest creva (inflammatory bowel disease)

IFN γ - interferon gama (interferon gamma)

IIF - indirektna imuno fluorescenca (indirect immunofluorescence)

IL - interleukin (interleukin)

IL-HP1 - interleukin hemoprotein 1 (interleukin chemoprotein 1)

IL-R - interleukin receptor (interleukin receptor)

INF1 - hipoksija-inducibilni faktor 1 (hypoxia inducible factor 1)

INF β 2 - interferon beta 2 (interferon beta 2)

INR - internacinalni normalizovan odnos (international normalized ratio)

IPEX - imunodisregulativna poliendokrinopatija vezana za X hromozom (immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome)

IRF4 - regulatorni faktor interleukina 4 (interleukin regulatory factor 4)

iTreg - indukovane T regulatorne ćelije (induced T regulatory cells)

JAK - Janus kinaza (Janus kinase)

JIA - juvenilni idiopatski artritis (juvenile idiopathic arthritis)

JNK - c-Jun-N-terminalna kinaza (c-JUN-N terminal kinase)

KSHV - Kaposi sarkom asocirani herpesvirus (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus)

LA - lupus antikoagulant (lupus anticoagulant)

LIF - inhibicioni faktor leukemije (leukemia inhibitory factor)

MAP - mitogenom aktivirana protein kinaza (mitogen activated protein kinase)

MCPI - monocitni hemotaktični protein 1 (monocyte chemoattractant protein 1)

MGI-2 - monocitno/granulocitni induktor tip2 (monocyte/granulocyte inducer type2)

MS - multipla skleroza (multiple sclerosis)

MTHFR - metilen-tetra-hidro-folat reduktaza

NFAT - nuklearni faktor T aktivisanih ćelija (nuclear factor of activated T cells)

NF-IL-6 - transkripcioni faktor (nuclear factor of IL-6 gene)

NF-kB - nukleusni faktor kapa B (nuclear factor kappa B)

NKT - prirodne T ćelije ubice (natural killer T cells)

Nrp1 - neuropilin 1 koreceptor tirozin kinaze receptora (neuropilin 1)

nTreg - prirodne T regulatorne ćelije (natural T regulatory cells)

OR - odnos šansi (odds ratio)

OSM - onkostatin M (oncostatin M)

PAFS - primarni antifosfolipidni sindrom (primary antiphospholipid syndrome)

PCR - polimeraza lančana reakcija (polymerase chain reaction)

PCR-SSCP - pojedinačni lančani konformacioni polimorfizam (single strand conformational polymorphism)

PGE2 - prostaglandin E2 (prostaglandin E2)

RA - reumatoidni arteritis (rheumatoid arthritis)

RANK-L - ligand za receptor aktivacije NF-kB (receptor activator of NF-kB ligand)

Ras - ras protein (rat sarcoma protein)

RFLP - polimorfizam dužine restrikcionih fragmenata (restriction fragment length polymorphism)

ROR - orphan receptor retinoične kiseline, transkripcioni faktor Th17 ćelija (retinoid-related orphan receptor)

Q-PCR - PCR u realnom vremenu (real time PCR)

RUNX1 - runx 1 vezujući transkriptivni faktor (runx-related transcription factor 1)

RXR - retinoid X receptor (retinoid X receptor)

S1P1 - receptor za tip 1 sfingozin1 fosfat (sphingosine-1-phosphate1 receptor)

SAFS - sekundarni antifosfolipidni sindrom (secondary antiphospholipid syndrome)

SEL - sistemski lupus eritematodus (systemic lupus erythematosus)

SMAD - transkripcioni faktor (Sma and Mad related family)

SNP - polimorfizam pojedinačnih nukleotida (single nucleotide polymorphism)

SOCS - supresor citokinskog prenosa signala (suppressor of cytokine signaling)

SRF - transkripcioni faktor (serum response factor)

SSA/Ro - ekstraktibilni nuklearni antigen (Sjogren syndrome type A antigen)

SSB/La - ekstraktibilni nuklearni antigen (Sjogren syndrome type B antigen)

STAT - signalni transduktor i aktivator transkripcije (signal transducer and activator of transcription)

Tbet - transkripcioni faktor Th1 ćelija (T box expressed in Th1 cells)

TCR - T ćelijski receptor (T cell receptor)

Tfh - T folikularne pomoćničke ćelije (follicular T helper cells)

TGFβ - faktor transformacije rasta β (transforming growth factor β)

Th1 - T pomoćničke ćelije podskup1 (T helper cells subset1)

Th17 - T pomoćničke ćelije podskup17 (T helper cells subset 17)

Th2 - T pomoćničke ćelije podskup2 (T helper cells subset2)

Th3 - T pomoćničke ćelije tipa3 (T helper cells subset3)

Th9 - T pomoćničke ćelije tipa9 (T helper cells subset 9)

TNF α - faktor nekroze tumora α (tumor necrosis factor α)

Tr1 - T regulatorne ćelije tip1 (type 1 regulatory T cells)

Treg - regulatorne T ćelija (regulatory T cell)

VNTR - polimorfizam broja uzastopnih ponovaka (various number of tandem repeats)

8.0 LITERATURA

1. Hughes G. Connective tissue disease and the skin. *Clin Exp Dermatol.* 1984;9:535-44
2. Harris N, Chan J, Asherson R, et al. Thrombosis, recurrent fetal loss and thrombocytopenia predictive value of the anticardiolipin antibody test. *Arch Inter Med.* 1986;146:2153-6
3. Gharavi E, Harris N, Asherson R. et al. Anticardiolipin antibodies: isotype distribution and phospholipid specificity. *Ann Rheum Dis.* 1987;46:1-6
4. Cervera R, Piette C, Font J. et al. Antiphospholipid syndrome: clinical and immunological manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1000 patients. *Arthritis Rheum.* 2002;46:1019-27
5. Stojanović Lj, Elezović I. "Antifosfolipidni sindrom" u monografiji "Klinička hematologija. Urednici: Marisavljević D i sar., Beograd: Zavod za udžbenike, 2012. ISBN 978-86-17-17742-1. COBISS.SR-ID 195133708
6. Stojanovich Lj, Kontic M, Marisavljevic D et al. Association between Systemic Non-criteria APS Manifestations and Antibody Type and Level: Results from the Serbian National Cohort Study. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 2013;31:756-60
7. Rand J, Wu X, Andree H. et al. Antiphospholipid antibodies accelerate plasma coagulation by inhibiting annexin-V binding to phospholipids: a "lupus procoagulant" phenomenon. *Blood.* 1998;92:1652-60
8. Shoenfeld Y, Krause I, Kyapil F. et al. Prevalence and clinical correlations of antibodies against six beta2-glycoprotein-I-related peptides in the antiphospholipid syndrome. *J Clin Immunol.* 2003;23:377-83
9. Wilson W, Gharavi A, Koike T. et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum.* 1999;42:1309-11
10. Miyakis S, Lockshin M, Atsumi T. et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thr Haemostasis.* 2006;4:295-306

11. Pierangeli S, Groot P, Dlott J. et al. Criteria' aPL tests: Report of a Task Force and preconference workshop at the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies, Galveston, Texas, April 2010. *Lupus*. 2011;20:182-90
12. Bertolaccini M, Roch B, Amengual O. et al. Multiple antiphospholipid tests do not increase the diagnostic yield in antiphospholipid syndrome. *Rheumatology*. 1998;37:1229-32
13. Tebo A, Jaskowski T, Phansalkar A. et al. Diagnostic performance of phospholipid-specific assays for the evaluation of antiphospholipid syndrome. *Am J Clin Pathol*. 2008;129:870-5
14. Devreese K, Hoylaerts M. Challenges in the diagnosis of the antiphospholipid syndrome. *Clin Chem*. 2010;56:930-40
15. Hughes G, Shoenfeld Y. Antiphospholipid antibody testing-slow progress? *Int J Clin Pract*. 2012;66:533-5
16. Asherson R, Cervera R. Antiphospholipid syndrome and infection. *Ann Rheum Dis*. 2003;62:388-93
17. Meroni P, Borghi M, Raschi E. et al. Pathogenesis of antiphospholipid syndrome: understanding the antibodies. *Nat Rev Rheumatol*. 2011;7:330-9
18. De Angelis V, Scurati S, Raschi E. et al. Pro-inflammatory genotype as a risk factor for aPL-associated thrombosis: Report of a family multiple anti-phospholipid positive members. *J Autoimmun*. 2009;32:60-3
19. Uthman I, Gharavi A. Viral infections and antiphospholipid antibodies. *Arthritis Rheum*. 2002;31:256-63
20. M, Cervera R, Font J, Meroni P. et al. Infectious origin of the antiphospholipid syndrome *Ann Rheum Dis*. 2006; 65:2–6.
21. Shoenfeld Y, Blank M, Cervera R. et al. Infectious origin of the antiphospholipid syndrome *Ann Rheum Dis*. 2006; 65:2–6

22. Colaco C, Male D. Anti-phospholipid antibodies in syphilis and a thrombotic subset of SLE: distinct profiles of epitope specificity. *Clin Exp Immunol.* 1985;59: 449-56
23. Seif A, Hwang Y, Pierangeli S. Management of the antiphospholipid syndrome: new approaches. *Int J Clin Rheumatol.* 2009;4:533-49
24. Xiao J, Zhu F, Liu X. et al. Th1/Th2/Th17/Treg expression in cultured PBMCs with antiphospholipid antibodies. *Mol Med Report.* 2012;6:1035-9
25. Graffen S. An overview of IL-17 function and signaling. *Cytokine* 2008; 43:402-407
26. Afzali B, Lombardi G, Lechler R. et al. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clin Exp Immunol.* 2007;148:32-46
27. Szumiles M. Explaining Odds Ratio. *J Can Acad Child Adolesc Psychiatry.*2010;19: 227–9.
28. Popovic-Kuzmanovic D, Novakovic I, Stojanovich L. et al. MTHFR C677T and A1298C polymorphisms in patients with antiphospholipid syndrome. 6th Balcan Meeting on human Genetics (BMHG 2004) Thessaloniki Greece, 2004: 40
29. Di Marco P, D’Uva M, Strina I. et al. The role of d-dimer as first marker of thrombophilia in women affected by sterility: implications in pathophysiology and diagnosis of thrombophilia induced sterility. *J Transl Med.* 2004;2:38
30. Yasuda S, Atsumi T, Matsuura E. et al. Significance of valine/leucine 247 polymorphism of beta2-glycoprotein I in antiphospholipid syndrome: increased reactivity of anti-beta2-glycoprotein I autoantibodies to the valine 247 beta2-glycoprotein I variant. *Arthritis Rheum.* 2005;52:212-8
31. Lee Y, Choi S, Ji J. et al. Association between the valine/leucine247 polymorphism of β 2-glycoprotein I and susceptibility to anti-phospholipid syndrome: a meta-analysis. *Lupus.* 2012;21:865-71

32. Chamorro A, Marcos M, Miron-Canelo J. et al. Val247Leu β 2-glycoprotein-I allelic variant is associated with antiphospholipid syndrome: systematic review and meta-analysis. *Autoimmun Rev.* 2012;11:705-12
33. Menachem A, Chapman J, Katzav A. Significant changes in the levels of secreted cytokines in brain of experimental antiphospholipid syndrome mice. *Autoimmune Dis.* 2012;404815
34. Swadzba J, Iwaniec T, Musial J. Increased level of tumor necrosis factor- α in patients with antiphospholipid syndrome: marker not only of inflammation but also of the prothrombotic state. *Rheumatol Int.* 2011;31:307-13
35. Hurst J, Prinz N, Lorenz M. et al. TLR7 and TLR8 ligands and antiphospholipid antibodies show synergistic effects on the induction of IL-1beta and caspase-1 in monocytes and dendritic cells. *Immunobiology.* 2009;214:683-91
36. Bertolaccini M, Atsumi T, Lanchbury J. et al. Plasma tumor necrosis factor alpha levels and the-238A promoter polymorphism in patients with antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost.* 2001;85:198-203
37. Hayashi R, Tahara T, Shiroeda H et al. Influence of IL-17A polymorphisms (rs2275913 and rs3748067) on the susceptibility to ulcerative colitis. *Clin Exp Med.* 2012; doi:10.1007/s10238-012-0206-5
38. Paradowska A, Wojtecka E, Trefler J et al. Association between IL-17F polymorphisms and susceptibility to and severity of rheumatoid arthritis (RF). *Scand J Immunol.* 2010;72:134-41
39. Ali Rashid N, Cyrus A, Kamran A. et al. TGF- β codon 25 polymorphism and risk of graft versus host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* 2010;9:1-6
40. Marieke E, Meike H, Jannine H et al. Polymorphism in genes controlling inflammation and tissue repair in rheumatoid arthritis: a case control study. *BMC Medical genetics.* 2011; doi:10.1186/1471-2350-12-36

41. Hazlett J, Stamp L, Merriman T et al. IL-23 rs11209026 polymorphism modulates IL-17A expression in patients with rheumatoid arthritis. *Genes and immunity*. 2011; 13:282-7
42. Ximung C, Ting G, Zhuqiong L et al. Foxp3 (-/ATT) polymorphism contributes to the susceptibility of preeclampsia. 2013; doi:10.1371/0059696
43. Mosmann T, Coffman R. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 1989;7:145-73
44. Romagnani S. Th1/Th2 cells. *Inflamm. Bowel Dis.* 1999;5:285-94
45. Kaplan M, Sun Y, Hoey T. et al. Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature*. 1996;382:174-7
46. Meraz M, White J, Sheehan K. Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell*. 1996;84:431-2
47. Kaplan M, Schindler U, Smiley S. et al. Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity*. 1996;4:313-9
48. Szabo S, Kim S, Costa G. et al. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*. 2000;100:655-69
49. Zheng W, Flavell R. The transcription factor GATA3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell*. 1997;89:587-96
50. O'Garra A, Arai N. The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. *Trends Cell Biol.* 2000; 10:542-50
51. Liew F. Th1 and Th2 cells: a historical perspective. *Nature Rev Immunol.* 2002; 2:55-60
52. Ouyang W, Ranganath S, Weindel K. Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism. *Immunity*. 1998; 9:745-55

53. Athie-Morales V, Smits H, Cantrell D. et al. Sustained IL-12 signaling is required for Th1 development. *J Immunol.* 2004;172:61-9
54. Macatonia S, Hosken N, Litton M. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naïve CD4⁺ T cells. *J Immunol.* 1995; 154: 5071-9
55. Rogge L, D'Ambrosio D, Biffi M. The role of Stat4 in species-specific regulation of Th cell development by type I IFNs. *J Immunol.* 1998; 161: 6567-74
56. Rogge L, Barberis L, Passini N. Selective expression of an interleukin 12 receptor component by human T helper 1 cells. *J Exp Med.* 1997; 185: 825-32
57. Krakovski M, Owens T. Interferon-gamma confers resistance to experimental allergic encephalomyelitis. *Eur J Immunol.* 1996;26:1641-6
58. Cua D, Sherlock J, Chen Y. et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature.* 2003;421:744-8
59. Thran E, Prince E, Owens T. IFN-gamma shapes immune invasion of the central nervous system via regulation of chemokines. *J Immunol.* 2000;164:2759-68
60. Harrington L, Hatton R, Mangan P. et al. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol.* 2005;6:1123-32
61. Park H, Li Z, Yang X. et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol.* 2005;6:1133-41
62. Oppmann B, Lesley R, Blom B. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity.* 2000;13:715-25
63. Ghilardi N, Ouyang W. Targeting the development and effector functions of TH17 cells. *Semin Immunol.* 2007;19:383-93
64. Dong C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:337-48

65. Mostarica-Stojković M. The role of interleukin 17 in rheumatic disease. *Acta Rheum Belgrad.* 2007;37:15-21
66. Zhou L, Ivanov I, Spolski R. et al. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiations by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol.* 2007; 20:doi:10.1038/ni1488
67. Hirota K, Martin B, Valdehøen M. et al. Development, regulation and functional capacities of Th17 cells. *Semin Immunopathol.* 2010;32:3-16
68. Bettelli E, Oukka M, Kuchroo V. et al. Th17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol.* 2007;8:345-50
69. Korn T, Bettelli E, Gao W. et al. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature.* 2007;448:484-7
70. O'Garra A, Stockinger M, Veldhøen M. et al. Differentiation of human Th17 cells does require TGFβ. *Nature immunol.* 2008;9:588-90
71. Coquet J., Chakravarti S, Smyth M. et al. IL-21 is not essential for Th17 differentiation or experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2008;180:7097-101
72. Romagnani S. Human Th17 cells. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(2):206-14
73. Ivanov I, McKenzie B, Zhou L. et al. The Orphan nuclear receptor RORγt directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell.* 2006;126:1121-33
74. Mucida D. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science.* 2007;317:256-60
75. Acosta-Rodriguez E, Napolitani G, Lanzavecchia A. et al. Interleukins 1β and 6 but not transforming growth factor-β is essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat. Immunol.* 2007;8:942-9
76. Hirahara K, Ghoreschi K, Laurence A. et al. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in Th17 cell differentiation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010;21:425-34

77. Wilson N, Boniface K, Chan J. et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol.* 2007; 8:950-7
78. Evans H, Suddason T, Jackson I. et al. Optimal induction of T helper 17 cells in humans requires T cell receptor ligation in the context of Toll-like receptor-activated monocytes. *Proc Natl Acad. Sci.* 2007; 104: 17034-39
79. Qin H, Wang I, Feng T. et al. TGF-beta promotes Th17 cell development through inhibitions of SOCS3. *J. Immunol.* 2009;183:97-105
80. Zhou L, Lopes J, Chong M. et al. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function. *Nature.* 2008;453:236-40
81. Waite J, Skokos D. Th17 response and inflammatory autoimmune diseases. *Int J Inflammat.* 2012; ID 819467, doi:10.1155/2012/819467
82. Harris J, Grosso F, Yen R. et al. Cutting edge: An in vivo requirement for STAT3 signaling in TH17 development and TH17-dependent autoimmunity. *J Immunol.* 2007;179:4313-7
83. Wei L, Laurence A, Elias M. et al. IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner. *J Biol Chem.* 2007;282:34605-10
84. Cretnez E, Xin A, Shi W. et al. The transcription factors Blimp-1 and IRF4 jointly control the differentiation and function of effector regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2011;12:304-11
85. Kimura A, Naka T, Nohara K. et al. Aryl hydrocarbon receptor regulates STAT1 activation and participates in the development of Th17 cells. *Proc Nat Acad Sci.* 2008;105:9721-6
86. Cosmi L, De Palma R, Santarlasci V. et al. Humann interleukine 17 – producing celles originate from a CD161 + CD4 + T celles precursor. *Exp Med.* 2008;205:1903-16
87. Annunziato F, Romagnani S. Do studies in humans better depict Th17 cells? *Blood.* 2009;114:2213-9
88. Dang E, Barbi J, Yang Y. et al. Control of Th17/T_{reg} balance by Hypoxia-Inducible Factor 1. *Cell.* 2011;146:772-84

89. Batten M, Li J, Yi S. et al. Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. *Nat. Immunol.* 2006;7:929-36
90. Cruz A, Khader A, Torrado E. et al. Cutting edge: IFN-gamma regulates the induction and expansion of IL-17-producing CD4 T cells during mycobacterial infection. *J Immunol.* 2006;177:1416-20
91. Stumhofer S, Laurence A, Wilson H. et al. Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat Immunol.* 2006;7:937-45
92. Laurence A, Tato M, Davidson S. et al. Interleukin 2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity.* 2007;26:371-81
93. Zhu J, Yamane H, Paul E et al. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu Rev Immunol.* 2010;28:445-89
94. O'Connor W, Zenewicz L, Flavell A. et al. The dual nature of T(H)17 cells: shifting the focus to function. *Nat Immunol.* 2010;11:471-6
95. Kurschus F, Croxford A, Heinen A. et al. Genetic proof for the transient nature of the Th17 phenotype. *Eur J Immunol.* 2010;40:3336-46
96. Lexberg MH, Taubner A, Albrecht I. et al. IFN- γ and IL-12 synergize to convert in vivo-generated Th17 into Th1/17 cells. *Eur J Immunol.* 2010;40:3017-27
97. Genovese M, Van den Bosch F, Roberson S. et al. LY2439821, a humanized anti-interleukin-17 monoclonal antibody, in the treatment of patients with rheumatoid arthritis: a phase I randomized, double-blind, placebo-controlled, proof-of-concept study. *Arthritis Rheum.* 2010;62:929-39
98. Gottlieb A, Menter A, Mendelsohn A. et al. Ustekinumab, a human interleukin 12/23 monoclonal antibody, for psoriatic arthritis: randomized, double-blind, placebo controlled, crossover trial. *Lancet.* 2009;373:633-40

99. Hueber W, Patel D, Dryja T. et al. Effects of AIN457, a fully human antibody to interleukin-17A, on psoriasis, rheumatoid arthritis, and uveitis. *Sci Transl Med.* 2010;2:52ra72
100. Stassen M, Schmitt E, Bopp T. From interleukin-9 to T helper 9 cells. *Ann NY Acad Sci.* 2012;1247:56-68
101. Beriou G, Bradshaw E, Lozano E. et al. TGF-beta induces IL-9 production from human Th17 cells. *J Immunol.* 2010;185:46-54
102. Wong M, Ye Y, Alonso M. et al. Regulation of human Th9 differentiation by type I interferons and IL-21. *Immunol Cell Biol.* 2010;88:624
103. Rasheed A, Rahn H, Sallusto F. et al. Follicular B helper T cell activity is confined to CXCR5 (hi)ICOS(hi) CD4 T cells and is independent of CD57 expression. *Eur J Immunol.* 2006;36:1892-3
104. Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol.* 2011;29:621-3
105. Ma C, Deenick E, Batten M. et al. The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. *J Exp Med.* 2012;209:1241-53
106. Tian T, Yu S, Ma D. Th22 and related cytokines in inflammatory and autoimmune diseases. *Expert Opin Ther Targets.* 2013;17:113-25
107. Zhuang Y, Peng L, Zhao Y. et al. Increased intratumoral IL-22-producing CD4 (+) T cells and Th22 cells correlate with gastric cancer progression and predict poor patient survival. *Cancer immunol Immunother.* 2012;61:1965-75
108. Weaver C, Harrington L, Mangan P. et al. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity.* 2006;24:677-88
109. Fontenot J, Rasmussen J, Gavin M. et al. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2005;6:1142-51
110. Chen W, Jin W, Hardegen N. et al. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med.* 2003;198:1875-86

111. Fantini M, Becker C, Monteleone G. et al. Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol.* 2004;172:5149-53
112. Yang X, Nurieva R, Martinez G, Kang H, Chung Y. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity.* 2008; 29:44-56
113. Constantino C, Becher-Allan C, Hafler D. Human regulatory T cells and autoimmunity. *Eur J Immunol.* 2008;38:921-4
114. Leavy O. Regulatory T cells in autoimmunity. *Nature.* 2007;7:322-5
115. Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T. Stimulation of CD25+CD4+ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol.* 2002;3:135-42
116. Guangwei L, Kai Y, Samir B. et al. The S1P1-mTOR axis direct the reciprocal differentiation of Th1 and Treg cells. *Nat Immunol.* 2010;11:1047-56
117. Naganari O, Shimon S. A novel modifier of regulatory T cells. *Nature Immunol.* 2009;10:685-6
118. Maggi E, Cosmi L, Lioffa F. et al. Thymic regulatory T cells. *Autoimmun Rev.* 2005;4:579-86
119. Floess S, Freyer J, Siewert C. et al. Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biol.* 2007;5:e38
120. Toker A, Huehn J. To be or not to be a Treg cell: lineage decisions controlled by epigenetic mechanisms. *Sci Signal.* 2011;4:pe4
121. Schmitt E, Williams C. Generation and function of induced regulatory T cells. *Front Immunol.* 2013;4:152.doi 10.3389/fimmu
122. Gottschalk R, Corse E, Allison J. Expression of Helios in peripherally induced Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol.* 2012;188:976-80
123. Bruder D, Probst-Kepper M, Wastendorf A. et al. Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *Eur J Immunol.* 2004;34:623-30

124. Sehgal P, Wang L, Rayanade R. et al. Interleukin-6-type cytokines. *Ann NY Acad Sci.* 1995;762:1-14
125. Heinrich P, Behrmann I, Muller-Newen G. et al. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/STAT pathway. *Biochem J.* 1998;334:297-314
126. Hirano T, Ishikara K, Hibi M. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene.* 2000;19:2548-56
127. Ichiba M, Nakajima K, Yamanaka Y. et al. Auto regulation of the STAT-3 gene through cooperating with a cAMP-responsive element-binding protein. *J Biol Chem.* 1998;278:6132-8
128. Chan D. Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science.* 1997;278:1803-5
129. Harrington H, Ho K, Ghosh S. et al. Construction and analysis of a modular model of caspase activation in apoptosis. *Theor Biol Med Mode.* 2008;5:26, doi: 10.1186/1742-4682-5-26
130. Kimura A, Kishimoto T. IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol.* 2010;40:1830-5
131. Nishimoto N, Yoshizaki K, Miyasaki N. et al. Treatment of rheumatoid arthritis with humanized anti-interleukin-6 receptor antibody: a multicenter, double blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.* 2004;50:1761-9
132. Ito H, Takazoe M, Fukuda Y. et al. A pilot randomized trial of a human anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in active Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2004;126:989-96
133. Illei G, Shirota Y, Yarboro H. et al. Tocilizumab in systemic lupus erythematosus: Data on safety, preliminary efficacy, and impact on circulating plasma cells frogman open-label phase I dosage-escalation study. *Arthritis Rheum.* 2010;62:542-52

134. Cook W, Thompson B, Kurup B. et al. Structural basis for a functional antagonist in the transforming growth factor beta superfamily. *J Biol Chem.* 2005;280:40177-86
135. Daopin S, Piez K, Ogawa Y. et al. Crystal structure of transforming growth factor beta: unusual fold for the superfamily. *Science.* 1992;257:369-73
136. Sebestyen A, Barna G, Nagy K. et al. Smad signal and TGF beta induced apoptosis in human lymphoma cells. *Cytokine.* 2005;30:228-35
137. Wrana L, Attisano L, Carcamo J. TGF-beta signals through a heterodimeric protein kinase receptor complex. *Cell.* 1992;71:1003-14
138. Massague J, Chen G. Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev.* 2000;14:627-44
139. Salomoni P, Khelifi A. Daxx: death or survival protein? *Trends in Cell Biology.* 2005;16:97-104
140. Yang X, Khosravi-Far R, Chang Y. et al. Daxx, novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell.* 1997;89:1067-76
141. Ghoreschi K, Laurence A, Yang X. et al. Generation of pathogenic Th17 cells in the absence of TGF β signaling. *Nature.* 2010;467:967-71
142. Ichiyama K, Sekiya T, Inoue N. et al. Transcription factor Smad-independent T helper 17 cell induction by transforming-growth factor- β is mediated by suppression of eomesodermin. *Immunity.* 2011;34:741-54
143. Tran D. TGF- β : the sword, the wand and the shield of FOXP3+ regulatory T cells. *J Mol Cell Biol.* 2012;4:29-37
144. Lu Y, Boer J, Barsova R et al. TGF β 1 genetic polymorphisms and coronary heart disease risk, a meta analysis. *BMC Medical genetics.* 2012;13-39
145. Yao Z, Painter S, Fanslow W, et al. Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *J Immunol.* 1995;155:5483-6
146. Kolls J, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity.* 2004;21:467-76

147. Rouvier E, Luciani MF, Mattéi MG. et al. CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a Herpes virus saimiri gene. *J Immunol.* 1993;150:5445-56
148. Yao Z, Timour M, Painter S. et al. Complete nucleotide sequence of the mouse CTLA8 gene. *Gene.* 1996;183:223-5
149. Aggarwal S, Gurney A. IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. *J Leukoc Biol.* 2002;71:1-8
150. Moseley T, Haudenschild D, Rose L. et al. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003;14:155-74
151. Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH. et al. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Bio Chem.* 2003;278:1910-4
152. Cho M, Kang J, Moon Y. et al. STAT3 and NF-kappaB signal pathway is required for IL-23-mediated IL-17 production in spontaneous arthritis animal model IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *J Immunol.* 2006;176:5652-61
153. Chen Z, Laurence A, Kanno Y. et al. Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells. *Proc. Nat Acad Sci.* 2006;103: 8137-42
154. Veldhoen M, Hocking R, Atkins C. et al. TGF-beta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity.* 2006;24:179-89
155. Mangan P, Harrington L, O'Quinn D. et al. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature.* 2006;441:231-4
156. Bettelli E, Carrier Y, Gao W. et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature.* 2006;441:235-8
157. Ye P, Garvey P, Zhang P. et al. Interleukin 17 and lung host defense against *Klebsiella pneumoniae* infection. *Am J Respir Cell Mol.* 2001;25:335-40
158. Chung D, Kasper D, Panzo R. et al. CD4+T cells mediate abscess formation in intra-abdominal sepsis by an IL-17-dependent mechanism. *J Immunol.* 2003;170:1958-63

159. Kelly M, Kolls J, Happel K. et al. Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against *Toxoplasma gondii* infection. *Infect Immun*. 2005;73:617-21
160. Shuly S, Kohler G, Holcher C. et al. IL-17A is produced by Th17, gamma delta T cells and other CD4- lymphocytes during infection *Salmonella enterica* serovar Enteritidis and has a mild effect in bacterial clearance. *Int Immunol*. 2008;20:1129-38
161. Hamada S, Umemura M, Shiono T. et al. IL-17A produced by gamma delta T cells plays a critical role in innate immunity against *Listeria monocytogenes* infection in the liver. *J Immunol*. 2008;181:3456-63
162. Edwards L, Nistala K, Mills D. et al. Delineation of the innate and adaptive T-cell immune outcome in human host in response to *Campylobacter jejuni* infection. *Plos One*. 2010;5:e15389
163. Torrado E, Cooper A. IL-17 and Th17 cells in tuberculosis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010;21:455-62
164. Arababadi M, Pourfathollah A, Jafarzadeh A. et al. Serum levels of IL-10 and IL-17A in occult HBV-infected south-east Iranian patients. *Hepatitis Monthly*. 2010;10:31-5
165. Yuan J, Yu M, Lin Q. et al. Th17 cells contribute to viral replication in Coxsackie virus B3-induced acute viral myocarditis. *J Immunol*. 2010;185:4004-10
166. Leipe J, Grunke M, Dechant C. et al. Role of Th17 cells in human autoimmune arthritis. *Arthritis Rheum*. 2010;62:2876-85
167. Adamopoulos I, Chao C, Geissler R. et al. Interleukin-17 up regulates receptor activator of NF- κ B on osteoclast precursors. *Arthritis Res Ther*. 2010;12:R29
168. Genovese M, Bosch F, Robertson S. et al. LY2439821, a humanized anti-interleukin-17 monoclonal antibody, in the treatment of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2010;62:929-39
169. Chi W, Yang P, Zhu X. et al. Production of interleukin-17 in Behcet's disease is inhibited by cyclosporin A. *Mol Vis*. 2010;16:880-6

170. Nguyen C, Yin H, Lee B. et al. IL-17: potential therapeutic target in Sjogren's syndrome using adenovirus-mediated gene transfer. *Lab Invest.* 2011;91:54-62
171. Park S, Lee Y. Interleukin-17 regulation: an attractive therapeutic approach for asthma. *Resp Res.* 2010;11:78
172. Agache I, Ciobant C, Agache C. et al. Increased serum IL-17 is an independent risk factor for severe asthma. *Respir Med.* 2010;104:1131-7
173. Fujino S, Andoh A, Bamba S. et al. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut.* 2003;52:65-70
174. Nodrang G, Viken M, Hollis-Moffatt et al. association analysis of the interleukin 17A gene in Caucasian rheumatoid arthritis patients from Norway and New Zealand. *Rheumatology.* 2009;48:367-70
175. Arisawa T, Tahara T, Shibata T et al. The influence of polymorphisms of interleukin 17A and interleukin 17F genes on the susceptibility to ulcerative colitis. *J Clin Immunol.* 2008;28:44-9
176. Pahram C, Chirica M, Timans J. et al. A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit IL-23R. *J Immunol.* 2002;168:5699-708
177. Laurence A, O'hea J. T(H)-17 differentiations: of mice and man. *Nat Immunol.* 2007;8:903-5
178. Kim K, Cho M, Park M. et al. Increased interleukin-17 production via a phosphoinositide 3-kinase/Akt and Nuclear factor kappaB-dependent pathway in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy.* 2005;7:39-48
179. Yoichiro I, Harumichi I. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest.* 2006;116:1218-22
180. Cho J. The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:458-66
181. Barrett J, Hansoul D, Nicolae J. et al. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet.* 2008;40:955-62

182. Jin L, Martynowski D, Zheng S. et al. Structural basis for hydroxy cholesterol as natural ligands of orphan nuclear receptor ROR γ . *Mol Endocrinol.* 2010;24:923-9
183. Jetten A, Kurebayashi S, Ueda E. The ROR nuclear orphan receptor subfamily: critical regulators of multiple biological processes. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 2001;69:205-47
184. Jetten A. Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm and cellular metabolism. *Nucl Recept Signal.* 2009;7:e003
185. Solt L, Kumar N, Nuhant P. et al. Suppression of Th17 differentiation and autoimmunity by a synthetic ROR ligand. *Nature.* 2011;472:491-4
186. Nurieva R, Chung D, Yang X. et al. Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2 or 17 cell lineages. *Immunity.* 2008;29:138-49
187. Stehlin-Gaon C, Willmann D, Zeyer D. et al. All-trans retinoic acid is a ligand for the orphan nuclear receptor ROR β . *Nat Struct Biol.* 2003;10:820-5
188. Yang X, Pappu B, Nurieva R. et al. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR α and ROR γ . *Immunity.* 2008b;28:29-39
189. Elias M, Laurence A, Davidson T. et al. Retinoic acid inhibits Th17 polarization and enhances Foxp3 expression through Stat3/Stat5 independent signaling pathway. *Blood.* 2008;111:1013-20
190. Chen Y, Coulter S, Jetten M. et al. Identification of human CYP2C8 as a retinoid-related orphan nuclear receptor target gene. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009;329:192-201
191. Zhang F, Zhao Y. The regulation of Foxp3 expression in regulatory CD4⁺CD25⁺T cells: multiple pathways on the road. *J Cell Physiol.* 2007, 211:590-7
192. Fontenot D, Rasmussen P, Williams M. et al. Regulatory T cell lineage specification by the forehead transcription factor Foxp3. *Immunity.* 2005;22:329-41

193. Bettelli E, Dastrange M, Oukka M. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc Nat Acad Sci USA*. 2005;102:5138-43
194. Hiroto K, Pan Z, Yang L. Signaling through Foxp3 as an X-linked tumor suppressor. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010;42:1784-7
195. Knops C, Schering C, Spence S. et al. Regulation of Foxp3+ inducible regulatory T Cell Stability by SOCS2. *J Immunol*. 2013;190:3235-45
196. Gosha S, Koralova S, Stevanovic I. et al. Hyperactivation of nuclear factor of activated T cells 1 (NFAT1) in T cells attenuates severity of murine autoimmune encephalomyelitis. *PNAS*. 2010;107:1-6
197. Lal G, Bromberg J. Epigenetic mechanisms of regulation of Foxp3 expression. *Blood*. 2009;114:3727-35
198. Tone M, Green M. Cooperative regulatory events and Foxp3 expression. *Nature*. 2011;12:14-6
199. Wang W, Hao C, Qu Q et al. The deregulation of regulatory T cells on interleukin 17 producing T helper cells in patients with unexplained early recurrent miscarriage. *Hum Reprod*. 2010;25:2591-6
200. Lee S, Kim J, Lee G et al. Th17 and regulatorz T cells in women with recerrent pregnancz loss. *Am J Reprod Immunol*. 2012;67:311-8
201. Vanderbroeck K. Cytokine gene polymorphisms and human autoimmune disease in the era of genome wide association studies. 2012;32:139-51
202. Ramos P, Criswell L, Moser K et al. A comprehensive analysis of shared lodi between systemic lupus erythematosus (SLE) and sixteen autoimmune diseases reveals limited genetic overlap. *PloS Genet*. 2011;7:e1002406
203. Zhao X, Pan H, Yuan H et al. Increased serum interleukin 17 in patients with systemic lupus erythematosus. *Mol Biol Rep*. 2009; 10.1007/s11033-009-9533-3
204. Cripsin J and Tsokos G. IL-17 in Systemic lups erythematosus. *J Biomedicine and Biotehnology*. 2010;ID943254

205. Wen Z, Xu I, Yin Z. et al. Interleukin-17 Expression Positively Correlates with Disease Severity of Lupus Nephritis by Increasing Anti-Double-Stranded DNA Antibody Production in a Lupus Model Induced by Activated Lymphocyte Derived DNA. *Plos One*. 2013;8:ie58161
206. Apostolidis S, Crispin J, Tsokos G. IL-17-producing T cell in lupus nephritis. *Lupus*. 2011;20:120-4
207. Popovic-Kuzmanovic D, Novakovic I, Stojanovich L. et al. Increased activity of interleukin-23/interleukin-17 cytokine axis in primary antiphospholipid syndrome. *Immunobiology*. 2013;218:186-91
208. Kawaguchi M, Takahashi D, Hizawa N, et al. IL-17F sequence variant (His161Arg) is associated with protection against asthma and antagonizes wild-type IL-17F activity. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117:795–801
209. Arisawa T, Tahara T, Shibata T. et al. et al. The influence of polymorphisms of interleukin-17A and interleukin-17F genes on the susceptibility to ulcerative colitis. *J Clin Immunol*. 2008;28:44-9
210. Seinderer J, Elben I, Diegelmann J, et al. Role of the novel Th17 cytokine IL-17F in inflammatory bowel disease (IBD): Upregulated colonic IL-17F expression in active Crohn's disease and analysis of the *IL17F* p.His161Arg polymorphism in IBD. *Inflammatory Bowel Dis*. 2008;4:437-45
211. Paradowska-Gorycka A, Wojtecka-Lukasik E, Trefler J, et al. Association between IL-17F Gene Polymorphisms and Susceptibility to and Severity of Rheumatoid Arthritis (RA). *Immunology*. 2010;72:134-41
212. Jang W, Nam Y, Ahn Y, et al. Interleukin-17F gene polymorphisms in Korean patients with Behcet's disease. *Rheumatol Int*. 2008;29:173-8
213. Saitoh T, Tsukamoto N, Koiso H, et al. Interleukin-17F gene polymorphism in patient with chronic immune thrombocytopenia. *Eur J Haematol*. 2011;87:253-8
214. Mok M, Wu H, Lau C. The relation of interleukin 17 (IL-17) and IL-23 to Th1/Th2 cytokines and disease activity in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 2010;37:2046-52

215. Holscher C. Targeting IL-23 autoimmunity. *Curr Opin Investig Drugs*. 2005;6:489-95
216. Kyttaris V. Interleukin 23 as a treatment target in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology*. 2012;2:1000e105
217. Rana A, Minz R, Aggrawal R. et al. Gene expression of cytokines (TNF- α , IFN- γ), serum profiles of IL-17 and IL-23 in paediatric systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2012;21:1105-12
218. Duerr R, Taylor K, Brant S, et al. A genome-wide association study identifies IL-23 as an inflammatory bowel disease gene. *Science*. 2006;314:1461-3
219. Hazlett J, Stamp L, Merriman Z. et al. IL-23 rs11209026 polymorphism modulates IL-17A expression in patients with rheumatoid arthritis. *Genes Immun*. 2012;13:282-7
220. Zheng S. Regulatory T cells vs Th17: differentiation of Th17 versus treg, are they mutually exclusive? *Am J Clin Exp Immunol*. 2013;2:94-106
221. Yang L, Yang X, Zou H. et al. Recovery of the immune balance between Th17 and regulatory T cells as a treatment for systemic lupus erythematosus. *Rheumatology*. 2011;doi10.1093
222. Saxena V, Lienesch D, Zhou M, et al. Dual roles of immunoregulatory cytokine TGF- β in the pathogenesis of autoimmunity-mediated organ damage. *J. Immunol*. 2008;180:1903-12
223. Lu L, Cheng H, Sung P, et al. Single-nucleotide polymorphisms of transforming growth factor-1 gene in Taiwanese patients with systemic lupus erythematosus. *J Microbiol Immunol Infect*. 2004;37:145-52
224. Schotte, H, Willeke, P, Rust, S, et al. The transforming growth factor- β 1 gene polymorphism (G915C) is not associated with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2003;12: 86-92

225. Guarnizo-Zuccardi, P, Lopez, Y, Giraldo, et all. Cytokine gene polymorphisms in Colombian patients with systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens*. 2007;70: 376-82
226. Ohl K, Tenbrock K. Inflammatory cytokines in systemic lupus erythematosus. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2011;ID432595
227. Fishman D, Faulds G, Jeffery R. et all. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest*. 1998;102:1369-1376
228. Vormittaq R, Hsieh K, Kaider A. et all. Interleukin-6 and interleukin-6 promoter polymorphism (-174) G>C in patients with spontaneous venous thromboembolism. *Thromb Haemost*. 2006;95:802-6
229. Kutluturk F, Zarman S, Sarvan F. et all. Association of cytokine gene polymorphisms (IL-6, IL-10, TNF- α , TGF- β and INF- γ) AND Graves' disease in Turkish population. *Endocr Metab Immune Disord Drug Tartets*. 2013
230. Sfrent-Cornateanu R, Mihai C, Balan S. et all. The IL-6 promoter polymorphism is associated with disease activity and disability in systemic sclerosis. *J Cell Mol Med*. 2006;10:955-9
231. Wu W, Clark E, Stoddard G. et all. Effect of interleukin-6 polymorphisms on risk of preterm birth within population strata: a meta-analysis. *BMC Genet*. 2013;doi 10.2156-14-30
232. Huang Z, Xie H, Wang R. et all. Retinoid-related orphan receptor gamma t is a potential therapeutic target for controlling inflammatory autoimmunity. *Expert Opin Ther Targets*. 2007;11:737-43
233. Collaborators (103) the coronary Artery Disease (C4D) Genetic Consortium. A genome wide association study in European and South Asian identifies five new loci for coronary artery disease. *Nat Genet*. 2011;43:339-44
234. Miyara M, Gorochoy G, Ehrenstein M, et all. Human Foxp3+ regulatory T cells in systemic autoimmune diseases. *Autoimmun Rew*. 2011;10:744-55

235. Lin S, Chen K, Lin c. et all. The quantitative analysis of peripheral blood Foxp3-expressing T cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients. *Eur J Clin Invest.* 2001;37:987-96
236. Christodoulou M, Efstathia K, Kapsogeorgou I. et all. Foxp3+ T regulatory cells in Sjogren syndrome. *Am J Pathol.* 2008;173:1389-96
237. Huan J, Culberston N, Spencer L. et all. Decreased Foxp3 levels in multiple sclerosis patients. *J Neurosci Res.* 2005;81:45'52
238. Fu J, Fy Q and Si C. Changes of CD4+Cd25+ regulatory T cells and foxp3 expression in rats with experimental anti-phospholipid antibody syndrome. *Matern Healthcare Chin.* 1010;10:821-4
239. Bassuny W, Ihara K, Sasaki Y, et all. A functional polymorphism in the promoter/enhancer region of the FOXP3/Scurfin gene associated with type1 diabetes. *Immunogenetic.* 2003;55:149-56
240. Shen Z, Chen L, Hao F, et all. Intron-1 rs3761548 is related to t he defective transcription of Foxp3 in psoriasis through abrogating E47/c-Myb binding. *J Cell Mol Med.* 2010;14:226-41
241. Song Q, Shen Z, Xing X. et all. An association study of single nucleotide polymorphisms of the Foxp3 intron-1 and risk of psoriasis vulgaris. *Indian J biochem Biophys.* 2012;49:25-35
242. Zhang L, Zhang Y, Desrosiers M, et all. Genetic association study of Fofp3 polymorphism in allergic rhinitis in Chinese population. *Hum Immunol.* 2009;70:930-4
243. Inoue N, Watanabe M, Morita M. et all. Association of functional polymorphisms related to the transcriptional level of FOXP3 with prognosis of autoimmune thyroid disease. *Clin Exp Immunol.* 2010;162:402-6
244. Wu Z, You Z, Zhang C. et all. Association between functional polymorphisms of Foxp3 gene and the occurrence of unexplained recurrent spontaneous abortion in Chinese Han population. *Cin Dev Immunol.* 2012;2012:896458 doi:10.1155/2012/896458

245. Song P, Wang X, Li H et al. Association between Foxp3 polymorphism and vitiligo in a Han Chinese population. *Br J Dermatol*. 2013 doi: 10.1111/bjd.12377
246. Yang Q, Chen Y, Yong W. Foxp3 genetic variant and risk of acute coronary syndrome in Chinese Han population. *Cell Biochem Funct*. 2013;doi: 10.1002/cbf.2945
247. Jahan p, sreenivasaqari R, Goudi D. et al. Role of Foxp3 gene in maternal susceptibility to pre-eclampsia-a study from south India. *Scand J Immunol*. 2013;77:104-8
248. McGeachy M, Chen Y, Tato C. et al. The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nat Immunol*. 2009;10:314-24
249. Stritesky G, Yeh N, Kaplan M. IL-23 promotes maintenance but not commitment to the Th17 lineage. *J Immunol*. 2008;181:5948-55
250. Ahmed K, Vianna J, Khamashta M. et al. IL-2, IL-6 and TNF levels in primary antiphospholipid syndrome. *Clin Exp Rheumatol*. 1992;10:503
251. Forastiero R, Martinuzzo M, Iarranaga G. Circulating levels of tissue factor and proinflammatory cytokines in patients with primary antiphospholipid syndrome or leprosy related antiphospholipid antibodies. *Lupus*. 2005;14:129-36
252. Yochimura A, Muto G. TGF-beta function in immune suppression. *Cur Top Microbiol Immunol*. 2011;350:127-47
253. Becker-Merok A, Eilersten G, Nossent J. Levels of transforming growth factor-beta are low in systemic lupus erythematosus patients with active disease. *J Rheumatol*. 2010;37:2039-45
254. Wong C, Lit L, Tam L. Hyperproduction of IL-23 and IL-17 in patients with systemic lupus erythematosus: implications for Th17-mediated inflammation in autoimmunity. *Clin Immunol*. 2008;127:385-93
255. Mok M, Wu H, Lo Y. The relation of interleukin 17 (IL-17) and IL-23 to Th1/Th2 cytokines and diseases activity in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 2010;37:2045-52

256. Doreau A, Belot A, Bastid J. et al. Interleukin 17 acts in synergy with B cell-activating factor to influence B cell biology and the pathophysiology of systemic lupus erythematosus. *Nat Immunol.* 2009;10:778-85
257. Krause I, Blank M, Fraser A. et al. The association of thrombocytopenia with systemic manifestation in the antiphospholipid syndrome. *Immunobiology.* 2005;210:749-54
258. Espinoza J, Takami A, Nakata K. et al. A genetic variant in the IL-17 promoter is functionally associated with acute graft-versus-host disease after unrelated bone marrow transplantation. *PLoS One.* 2011;6:e26229
259. Nordang G, Viken M, Hollis-Moffatt. et al. Association analysis of the interleukin 17A gene in Caucasian rheumatoid arthritis patient from Norway and New Zealand. *Rheumatol.* 2009;48:367-70
260. Sole X, et al. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 2006;22:1928-9.

9.0 BIOGRAFIJA AUTORA

Dr Dragana Popović-Kuzmanović je diplomirala na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Specijalizaciju iz kliničke imunologije je upisala 1989/90. god. takođe na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, a 1992. godine je položila specijalistički ispit.

Pri Centru za multidisciplinarne studije u Beogradu, Odsek za opštu i medicinsku ekofiziologiju, upisala je posle diplomске studije koje je uradila na Vojnoj medicinskoj akademiji u Beogradu. Rad pod naslovom «Citologija bronhoalveolarnog lavata kod sarkoidoze pluća u zavisnosti od ekoloških faktora» je uspešno odbranila 1997. godine.

Užu specijalizaciju iz kliničke genetike je upisala 1998. godine, a rad iz uže specijalizacije pod naslovom «Analiza gubitka heterozigotnosti (LOH) na hromozomu 18q kod karcinoma grlića materice» je odbranila 2002. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Doktorske studije je upisala 2010. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Posle završenih studija dr Dragana Popović-Kuzmanović je u Vazduhoplovnom medicinskom institutu, a pri Centru za multidisciplinarne studije u Beogradu, započela postdiplomske studije iz vazduhoplovne medicine. Za rad «Značaj promena nekih kardiovaskularnih i respiratornih parametara u oceni granica tolerancije hipoksije» je primila 1980. godine «Oktobarsku nagradu grada Beograda» za najbolji rad objavljen u toj godini.

U Vazduhoplovnom medicinskom institutu u Beogradu je završila kurs iz vazduhoplovne medicine 1980. god., a u Institutu za pomorsku medicinu u Splitu je 1982. godine završila kurs podvodne medicine i time se usavršila u oblasti poznavanja uslova rada i u hiperbaričnoj i u hipobaričnoj komori.

Njeno interesovanje za genetiku, je počelo 1997. godine, kada je u Institutu za molekularnu genetiku i genetski inženjering u Beogradu završila kurs «Osnovi genetičkog inženjerstva: izolovanje, obrada i elektroforetska analiza DNK». Tokom 2011. godine je bila na studijskom boravku u „Clinical institute of laboratory medicine at the medical university-general hospital Vienna (AKH)“ u Beču.

Od 1991. godine je zaposlena u KBC “ Bežanijsks kosa” kao lekar specijalista kliničke imunologije, a potom i kao lekar subspecijalista kliničke genetike na mestu šefa Odseka imunološke laboratorije sa molekularnom genetikom.

Autor i koautor je 60 radova iz oblasti vazduhoplovne medicine, kliničke imunologije i humane genetike.

10. PRILOZI

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Др Драгана В. Поповић - Кузмановић

број уписа _____

Изјављујем


да је докторска дисертација под насловом

**«Анализа полиморфизама гена значајних за диференцијацију T(X)17 и T
тегулаторних ћелија код болесника са антифосфолипидним синдромом»**

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

Потпис докторанда

У Београду, 10.12.2013. године



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Др Драгана В. Поповић - Кузмановић

Број уписа _____

Студијски програм _____

Наслов рада «Анализа полиморфизама гена значајних за диференцијацију
Т(Х)17 и Т регулаторних ћелија код болесника са антифосфолипидним
синдромом»

Ментор Проф. др Ивана Новаковић

Потписани Др Драгана В. Поповић - Кузмановић

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 10.12.2013. године



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

«Анализа полиморфизама гена значајних за диференцијацију T(X)17 и T регулаторних ћелија код болесника са антифосфолипидним синдромом»

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

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

У Београду, 10.12.2013. године

Потпис докторанда

