



UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET

Dr Jelena M. Radović

**ZASTUPLJENOST MUTACIJA I R202Q POLIMORFIZMA GENA ZA
PORODIČNU MEDITERANSKU GROZNICU I NJIHOV UTICAJ NA
OKSIDATIVNI STRES I KLINIČKE ZAPALJENSKE MANIFESTACIJE**

- DOKTORSKA DISERTACIJA -

Mentor:

Prof. dr Jelena Vojinović

Niš, 2014. godina



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF MEDICINE

Dr Jelena M. Radović

**DISTRIBUTION OF MUTATIONS AND R202Q POLYMORPHISM OF
THE GENE FOR FAMILIAL MEDITERRANEAN FEVER AND THEIR
INFLUENCE ON OXIDATIVE STRESS AND CLINICAL
MANIFESTATIONS OF INFLAMMATION**

- DOCTORAL DISSERTATION -

Mentor:

Prof Dr Jelena Vojinović

Niš, 2014.

Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije

Prof. dr Vladmila Bojanić, predsednik

Institut za patofiziologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu

Prof. dr Jelena Vojinović, mentor

Klinika za dečije interne bolesti, Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu

Prof. dr Tatjana Mitrović, član sa Prirodno-matematičkog fakulteta

Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Nišu

Prof. dr Tatjana Jevtović-Stoimenov, član

Institut za biohemiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu

Prof. dr Maja Milojković, član

Institut za patofiziologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu

Datum odbrane doktorske disertacije _____

ZAHVALNOST

Posebnu zahvalnost dugujem svojoj mentorki prof. dr Jeleni Vojinović na stalnoj, nesebičnoj i stručnoj pomoći tokom trajanja mojih studija i izradi doktorata.

Takođe, posebno se zahvaljujem prof. dr Nataši Toplak i dr Maruši Debeljak sa Pedijatrijske klinike u Ljubljani, na prijatnoj saradnji, edukaciji i pomoći u zajedničkom istraživačkom radu.

Zahvaljujem se profesorima i kolegama sa Katedre za Patofiziologiju, Biohemiju, kao i iz Naučnoistraživačkog centra za biomedicinu, Medicinskog fakulteta u Nišu, bez čije podrške i sugestija ne bih mogla da ostvarim rezultate istraživanja.

Zahvaljujem se prof. dr Dušici Pavlović, rukovodiocu projekta III41018, koja mi je rado izašla u susret za sve segmente rada na studijama i doktoratu.

Zahvaljujem se prof. dr Tatjani Mitrović, sa Prirodno matematičkog fakulteta u Nišu, na predusretljivosti i saradnji u izradi ovog doktorata.

Zahvaljujem se porodici i prijateljima na bezrezervnoj podršci i razumevanju za sve vreme mog studiranja i bavljenja istraživačkim radom.

Dr Jelena Radović

I Autor

Ime i prezime	Jelena M. Radović
Datum i mesto rođenja	21.02.1982. Niš
Sadašnje zaposlenje	Saradnik u nastavi na Institutu za patofiziologiju, Medicinski fakultet Niš

II Doktorska disertacija

Naslov	Zastupljenost mutacija i R202Q polimorfizma gena za porodičnu mediteransku groznicu i njihov uticaj na oksidativni stres i kliničke zapaljenske manifestacije
Broj strana	159
Broj slika	23
Broj tabela	15
Broj bibliografskih podataka	310
Ustanova i mesto gde je rad izrađen	Specijalna dijagnostička laboratorija, Pedijatrijske klinike u Ljubljani, Slovenija. Klinika za dečije interne bolesti, Klinički centar Niš. Naučnoistraživački centar za biomedicinu, Medicinski fakultet u Nišu.
Naučna oblast	Molekularna medicina, patofiziologija
Mentor	Prof. dr Jelena Vojinović, Klinika za dečije interne bolesti, Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu.

III Ocena i odbrana teze

Datum prijave teme doktorske disertacije	25.05.2013. godine
Broj odluke i datum prihvatanja teme teze	04-MM-85/09, 08.07.2013. godine
Komisija za ocenu podobnosti teme i kandidata	Prof. dr Vladmila Bojanić, predsednik Prof. dr Jelena Vojinović, mentor Prof. dr Dušica Pavlović, član
Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije	Prof. dr Vladmila Bojanić, predsednik Prof. dr Jelena Vojinović, mentor Prof. dr Tatjana Mitrović, član sa Prirodno-matematičkog fakulteta Prof. dr Tatjana Jevtović-Stoimenov, član Prof. dr Maja Milojković, član
Datum odbrane doktorske disertacije	

Naučni doprinos doktorske disertacije:

Radović J, Vojinović J, Bojanić V, Jevtović-Stoimenov T, Kocić G, Milojković M, Veljković A, Marković I, Stojanović S, Pavlović D. Lipid peroxidation and oxidative protein products in children with episodic fever of unknown origin. J Med Biochem 2014;33(2):197-202.

SKRAĆENICE

AIB	- autoinflamatorne bolesti
AIM2	- eng. <i>absent in melanoma 2</i>
AOPP	- uznapredovali oksidativni produkti proteina (<i>advanced oxidation protein products</i>)
AP-1	- aktivator proteina 1
AS	- ankilozantni spondilitis
ASC	- apoptoza udruženi speck-like protein
ASP	- asparaginska kiselina
ATP	- adenozin trifosfat
BCNU	- 1,3-bis(2-kloroetil)-1-nitrozurea
BMI	- prosečni indeks telesne težine (<i>body mass index</i>)
BD	- <i>Behcetova</i> bolest
BDT	- Big-Dye Terminator
bZIP	- transkripcioni faktor bazični domen
CAPS	- kriopirin udruženi periodični sindrom
CARD	- kaspaza regrutujući domen
CCD	- elementi sa spregnutim naelektrisanjem (<i>charge coupled devices</i>)
CD	- klaster diferencijacije
CIAS	- hladnoćom izazvan autoinflamatorni sindrom (<i>cold induced autoinflammatory syndrome</i>)
CINCA	- hronični infantilni neurološki, kožni i zglobovi sindrom
CNS	- centralni nervni sistem
CRP	- C reaktivni protein
DAMPs	- molekularni obrasci udruženi sa oštećenjem ćelija (<i>damage-associated molecular pattern molecules</i>)
DD	- domen smrti (<i>death domain</i>)
dHPLC	- denaturišćuća tečna hromatografija visokog učinka
DNK	- dezoksiribonukleinska kiselina
DPI	- difenilen jodonijum
EAHC	- Izvršna agencija za zdravlje i potrošače Evropske komisije (<i>Executive Agency for Health and Consumers</i>)
EC-SOD	- ekstracelularna superoksid dizmutaza
EDTA	- etilendiamin-tetrasirćetna kiselina
FCAS	- familijarni sindrom autoinflamacije na hladnoću
FMF	- familijarna mediteranska groznica
FUO	- groznica nepoznatog uzroka (<i>fever of unknown origin</i>)
GPx	- glutation peroksidaza
GSH	- glutation
Hb	- hemoglobin
HIDS	- hiperimunoglobulinemija D i periodični febrilni sindrom
HIV	- virus humane deficijencije
HLA	- humani leukocitni antigen
HSP	- purpura <i>Henoch-Schonlein</i>
HSP90	- protein toplotnog stresa (<i>heat-shock</i>) 90

IBD	- inflamatorna bolest creva
ICAM	- interćelijski adhezioni molekul
IFN- γ	- interferon- γ
IL	- interleukin
IL-1R	- interleukin 1 receptor
IPAF	- ICE proteaza aktivirajući faktor
I κ B- α	- inhibitor nuklearnog faktora κ B alfa
JIA	- juvenilni idiopatski artritis
KAT	- katalaza
LDL	- lipoprotein niske gustine
LP	- lipidne peroksidacije
LPS	- lipopolisaharid
LRR	- ponavljanje bogato leucinom (<i>leucin-rich repeat</i>)
MAPK	- mitogen aktivirajuće protein kinaze
MCP	- monocit hemotaksički protein
MDA	- malonaldehid
MEFV	- gen za porodičnu mediteransku groznicu (<i>Mediterranean fever</i>)
MICA	- gen za A protein MHC klase I udruženi polipeptid (<i>MHC class I polypeptide-related sequence A</i>)
MIF	- faktor inhibicije migracije makrofaga
MIP	- makrofagni inflamatorni protein
MK	- mevalonat kinaza
MKD	- bolesti sa insuficijencijom enzima mevalonat kinaze
MPO	- mijeloperoksidaza
MS	- multipla skleroza
MVA	- mevalonatna acidurija
MVS	- <i>Muckle-Wellsov</i> sindrom
NACHT	- nukleozid-trifosfataza domen nazvan prema proteinima koji ga sadrže – NAIP, CIITA, HET-E i TP1. (NAIP - <i>the neuronal apoptosis inhibitory protein</i> , CIITA - <i>MHC class II transcription activator</i> , HET-E - <i>incompatibility locus protein from Podospora anserina</i> , TP1 - <i>telomerase-associated protein</i>)
NADPH	- redukovana forma nikotinamid adenin dinukleotid fosfata
NBD	- nukleotid vezujući oligomerizirajući domen
NBT	- nitro blue tetrasolium
NCBI	- nacionalni centar za biotehnoške informacije (deo američke nacionalne biblioteke za medicinu (NLM))
NF- κ B	- nuklearni faktor- κ B
NIH	- nacionalni instituta zdravlja (američka agencija za biomedicinska i zdravstvena istraživanja)
NLR	- NOD-like receptori
NLRC 4	- protein 4 NLR familije sa CARD domenom
NLRP	- NACHT, LRR i PYD domen sadržeći proteini
NOD	- nukleotid vezujući i oligomerizirajući domen
NOX	- NADPH oksidaza
P2X7	- purinergički receptor 2X, ligandni jonski kanal 7

PAMPs	- patogen-udruženi molekularni obrasci (<i>pathogen-associated molecular patterns</i>)
PAPA	- piogeni artritis, pioderma gangrenozum i akne sindrom
PCR	- lančana reakcija polimeraze
PFAPA	- periodična groznica, afte, faringitis i cervikalni adenitis sindrom
PGE2	- prostaglandin E2
PRES	- evropsko društvo pedijatrijske reumatologije (<i>Paediatric Rheumatology European Society</i>)
PRINTO	- internacionalna organizacija za projekte u pedijatrijskoj reumatologiji (<i>The Paediatric Rheumatology International Trials Organisation</i>)
PRRs	- receptori za prepoznavanje obrazaca patogena (<i>pattern recognition receptors</i>)
PRY	- domen udružen sa SPRY domenom
PSTPIP1	- prolin serin treonin fosfataza-interagujući protein 1
PYD	- pirinski domen
RA	- reumatoidni artritis
RFU	- relativna jedinica fluorescence (<i>relative florescent unit</i>)
RNK	- ribonukleinska kiselina
RVA	- reaktivne vrste azota
RVK	- reaktivne vrste kiseonika
SAA	- serumski amiloid A protein
SAD	- Sjedinjene američke države
SE	- sedimentacija eritrocita
SGT1	- supresor G2 alela SKP1 homologa (ubikvitin ligaza udruženi protein)
SH3	- Src homologni protein 3
siRNK	- male interferne RNK (<i>small interfering</i>)
sJIA	- sistemski juvenilni idiopatski artritis
SLE	- sistemski eritemski lupus
SNP	- polimorfizam pojedinačnih nukleotida (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
SOD	- superoksid dizmutaza
SPRY	- domen koji postoji u splA (dualno-specifična kinaza <i>Dictyostelium discoideum</i>) i u rianodin (ryanodine) subtipovima receptora
SPSS	- statistički softver (<i>software package used for statistical analysis</i>)
TAS	- totalni anti-oksidantni status
TBA	- tiobarbiturna kiselina
TBARS	- tiobarbiturne reagujuće supstance
THP-1	- ćelijska linija humane akutne monocitne leukemije
TLR	- Toll-like receptori
TNFR	- TNF membranski receptor
TNFRSF1A	- tumor nekrozis faktor receptor superfamilije 1A
TNF- α	- tumor nekrozis faktor- α
TRAPS	- periodični sindrom udružen sa tumor nekrozis faktor receptorom
TRIM	- eng. <i>tripartite motif</i> sadržeći proteini
Trx	- tioredoksin oksidoreduktaza
UVB	- ultravioletno B zračenje
VCAM	- vaskularni ćelijski adhezioni molekul
xCT	- subjedinica Xc transportera

ZASTUPLJENOST MUTACIJA I R202Q POLIMORFIZMA GENA ZA PORODIČNU MEDITERANSKU GROZNICU I NJIHOV UTICAJ NA OKSIDATIVNI STRES I KLINIČKE ZAPALJENSKE MANIFESTACIJE

SAŽETAK

Uvod

Gen za porodičnu mediteransku groznicu (*Mediterranean fever - MEFV*) ima poseban značaj u etiologiji autoinflamatornih bolesti (AIB). *MEFV* gen kodira protein pirin, jedan od regulatora funkcije inflamazoma u ćelijama urođenog imunskog sistema. Mutacije i R202Q polimorfizam *MEFV* gena menjaju funkciju pirina što dovodi do disregulacije oslobađanja interleukina-1 β , aktivacije NF- κ B, apoptoze, kao i oksidativne eksplozije leukocita. Mutacije M680I, M694V, M694I, V726A i E148Q, čine najveći procenat svih mutacija. Iako je R202Q polimorfizam benigna alteracija u heterozigotnom obliku, više studija je potvrdilo da R202Q homozigoti mogu razviti AIB.

Najpoznatija autoinflamatorna nasledna bolest sa mutacijama *MEFV* gena je familijarna mediteranska groznica. Međutim, ove mutacije postoje i u većem broju drugih bolesti gde predisponiraju proinflamatorno stanje, kao što su: *Behcetova* bolest, purpura *Henoch-Schonlein*, ulcerativni kolitis, sistemski eritemski lupus, multipla skleroza i dr. Tokom akutne faze AIB dolazi do porasta telesne temperature, abdominalnog bola, artralgija, mijalgija, erizipeloidne ospe, malaksalosti i dr. U krvi se registruje inflamatorna reakcija i postoji povećan oksidativni stres, detektovan kroz smanjenu aktivnost antioksidativne zaštite i povišene koncentracije produkata oksidativne modifikacije molekula.

Međutim, različito ispoljavanje kliničkih manifestacija u prisustvu istih *MEFV* mutacija kod različitih osoba, kao i bolest kod heterozigota, doveli su do preispitivanja uloge i značaja promena *MEFV* gena. Utvrđeno je da nosioci mutacija imaju tendenciju za razvoj febrilnih epizoda, češću pojavu reumatskih bolesti i povišene nivoe reaktanata akutne faze zapaljenja. Pretpostavlja se da udeo u ispoljavanju autoinflamacije kod heterozigota imaju za sada nepoznati modifikujući geni ili faktori spoljašnje sredine.

Cilj istraživanja

Cilj istraživanja bio je ispitati prisustvo i distribuciju mutacija i R202Q polimorfizma *MEFV* gena kod zdravih osoba u Srbiji. Potom, utvrditi učestalost ponovljenih febrilnosti i drugih kliničkih manifestacija zapaljenja kod osoba sa mutacijama i R202Q polimorfizmom i

uporediti u odnosu na osobe bez navedenih promena. Pored toga, ispitivano je da li nosioci navedenih promena *MEFV* gena imaju izmenjene parametre oksidativnog stresa i da li postoji njihova povezanosti sa manifestacijama zapaljenja.

Metode

U istraživanje je uključeno 100 zdravih ispitanika. Protokol istraživanja podrazumevao je prikupljanje zdravstvenih podataka ispitanika (primenom zvaničnog upitnika Eurofever projekta) i uzimanje uzoraka krvi radi izvođenja genetskihog testa i analize parametara oksidativnog stresa.

DNK je izolovana iz perifernih leukocita. Sekvenciranje DNK izvedeno je korišćenjem ABI PRISM 310 automatizovanog sekvencera (Applied Biosystems, USA).

Test tiobarbiturnih reagujućih supstanci (TBARS) u plazmi rađen je spektrofotometrijskom metodom po Andreevoj i sar. TBARS u eritrocitima su određivane spektrofotometrijskom metodom po Jain i sar. Uznapredovali oksidacioni produkti proteina (AOPP) su određivani spektrofotometrijski i kalibrisani hloramin-T rastvorom po metodi Witko-Sarsat V i sar. Utvrđivanje aktivnosti superoksid dizmutaze (SOD) je izvršeno pirogalolskom metodom (McCord J, Fridovich I). Aktivnost katalaze je određivana Katalaza ELISA kit-om (Enzo Life Sciences), prema uputstvu proizvođača.

Rezultati

Od ukupno 100 ispitanika 11% je imalo mutaciju *MEFV* gena: 6% heterozigotnu E148Q/N i 5% ispitanika K695R/N mutaciju. Utvrđeno je 10% homozigota i 45% heterozigota za R202Q polimorfizam. Utvrđena frekvenca nosioca mutacija i R202Q polimorfizma je neočekivana i relativno visoka za zdravu populaciju u Srbiji.

Od kliničkih manifestacija zapaljenja ispitanici sa mutacijama zajedno sa R202Q homozigotima su u odnosu na osobe bez navedenih promena značajno češće navodili rekurentne febrilne epizode nepoznatog uzroka ($p=0.027$), difuzni abdominalni bol ($p=0.015$), peritonitis ($p=0.019$) i malaksalost ($p=0.012$). Osobe sa mutacijama *MEFV* gena češće su imali rekurentne febrilne epizode ($p=0.048$), difuzni abdominalni bol ($p=0.017$), peritonitis ($p=0.008$) i malaksalost ($p=0.032$). R202Q homozigoti su značajno češće navodili ponovljene epizode povišene temperature ($p=0.022$), difuzni bol u abdomenu ($p=0.009$) i limfadenopatiju ($p=0.035$). Ponovljene febrilnosti i nespecifični abdominalni bol su najzastupljenije tegobe u najvećem broju AIB sa mutacijama *MEFV* gena i sugerišu na postojanje modifikovanog imunskog odgovora ovih osoba.

Osobe sa mutacijama *MEFV* gena i R202Q homozigotnim polimorfizmom su imale značajno više koncentracije TBARS u eritrocitima u odnosu na osobe bez navedenih promena gena ($p=0.03$), što ukazuje na postojanje povećanog oksidativnog oštećenja membrana eritrocita. Takođe, plazmatska aktivnost SOD bila je značajno viša kod ovih ispitanika ($p=0,049$), kao i kod R202Q homozigota posebno ($p=0,001$), što može biti rezultat povećane indukcije ekstracelularne SOD. Promene parametara oksidativnog stresa kod nosioca *MEFV* promena bile su značajno udružene sa biohemijskim parametrima zapaljenja (broj leukocita sa eritrocitnim TBARS ($p=0.009$) i sedimentacija eritrocita i SOD u plazmi ($p=0.031$)).

Zaključak

Mutacije *MEFV* gena su prisutne kod 11% zdravih osoba u Srbiji i to E148Q/N kod 6% i K695R/N kod 5% osoba. U populaciji Srbije utvrđeno je 10% homozigota za R202Q polimorfizam *MEFV* gena, dok je 45% heterozigotni nosilac ovog polimorfizma. Osobe sa E148Q i K695R heterozigotnim mutacijama *MEFV* gena i R202Q homozigotnim polimorfizmom češće imaju febrilne epizode nepoznatog uzroka, kao i druge nespecifične manifestacije zapaljenja. Nosioci mutacija i R202Q homozigoti imaju značajno veće vrednosti eritrocitnih TBARS, kao i plazmatsku aktivnost SOD, u odnosu na osobe bez navedenih genskih promena. Češća pojava nespecifičnih manifestacija zapaljenja kod nosilaca mutacija i R202Q homozigota ukazuje da navedene promene *MEFV* gena predstavljaju jednu od predispozicija za razvoj zapaljenja. Promene parametara oksidativnog stresa upućuju na postojanje blagog oksidativnog stresa i stimulaciju urođenog imunskog odgovora, uz moguće specifične promene funkcije leukocita kod ovih osoba.

Ključne reči: mutacije *MEFV* gena, R202Q polimorfizam, autoinflamacija, febrilnost, oksidativni stres.

DISTRIBUTION OF MUTATIONS AND R202Q POLYMORPHISM OF THE GENE FOR FAMILIAL MEDITERRANEAN FEVER AND THEIR INFLUENCE ON OXIDATIVE STRESS AND CLINICAL MANIFESTATIONS OF INFLAMMATION

SUMMARY

Introduction

The Mediterranean fever gene (*MEFV*) has special importance in autoinflammatory diseases (AID) etiology. The *MEFV* gene codes for protein pyrin, one of the inflammasome regulators in the innate immune cells. Mutations and R202Q polymorphism of the *MEFV* gene alter pyrin function, consequently leading to a dysregulation of interleukin-1 β release, activation of NF- κ B, apoptosis, as well leukocytes oxidative burst. Mutations M680I, M694V, M694I, V726A and E148Q represent the largest percentage of all mutations. Although the R202Q polymorphism in heterozygous form is a benign alteration, several studies confirmed that R202Q homozygotes may develop AID.

Familial Mediterranean fever is the most common hereditary autoinflammatory disease with *MEFV* gene mutations. However, these mutations are determined in a number of other diseases, where they predispose a proinflammatory state, such as: Behcet's disease, *Henoch-Schonlein* purpura, ulcerative colitis, systemic lupus erythematosus, multiple sclerosis, etc. The acute phase of AID is characterised by increased body temperature, abdominal pain, arthralgia, myalgia, erysipeloid rash, fatigue, etc. There is an inflammatory reaction in the blood and increased oxidative stress, detected through the decreased antioxidant activity and increased levels of oxidatively modified molecular products.

However, various clinical presentation in the presence of the same *MEFV* mutations in different individuals, as well as disease in heterozygotes, led to a reconsideration of the role and significance of *MEFV* gene changes. It is found that mutation carriers have a tendency for febrile episodes, frequent occurrence of rheumatic diseases, and increased levels of acute phase reactants. It is assumed that still unknown modifying genes or environmental factors are partially responsible for AID in heterozygotes.

Aim

The aim of this study was to investigate the presence and distribution of the *MEFV* gene mutations and R202Q polymorphism in healthy population in Serbia. Also, the intention was to determine the incidence of recurrent fevers and other clinical signs of inflammation in

persons with mutations and R202Q polymorphism, and compare with persons without these changes. In addition, it was investigated whether persons with *MEFV* changes have altered oxidative stress parameters and what is their association with inflammatory events.

Methods

The study enrolled 100 healthy subjects. The investigation protocol included: collection of health data (using the official Eurofever project questionnaire) and collection of blood samples to perform genetic test and analysis of oxidative stress parameters.

DNA was extracted from peripheral blood leukocytes. DNA sequencing was performed using ABI PRISM 310 automated sequencer (Applied Biosystems, USA).

Thiobarbituric acid reactive substances test (TBARS) in plasma was performed by the spectrophotometric method of Andreeva et al. TBARS in erythrocytes were determined by spectrophotometric method of Jain et al. Advanced oxidation protein products (AOPP) were determined spectrophotometrically and calibrated by chloramine-T solution by the method of Witko-Sarsat V et al. Determination of superoxide dismutase (SOD) was performed with pyrogallol method (McCord J, Fridovich I). Catalase activity was determined by catalase ELISA kit (Enzo Life Sciences), following the manufacturer's instructions.

Results

Out of 100 examined subjects 11% had *MEFV* gene mutation: 6% heterozygous E148Q/N mutation and 5% K695R/N. There were 10% of R202Q polymorphism homozygotes and 45% heterozygotes. Unexpectedly, the carrier frequency of mutations and R202Q polymorphism was relatively high for a healthy population in Serbia.

Regarding clinical manifestations, persons with the mutations and R202Q homozygotes reported more frequently: febrile episodes of unknown cause ($p=0.027$), diffuse abdominal pain ($p=0.015$), peritonitis ($p=0.019$) and fatigue ($p=0.012$) in comparison with persons without these gene changes. Individuals with the *MEFV* gene mutations had more frequently recurrent febrile episodes ($p=0.048$), diffuse abdominal pain ($p=0.017$), peritonitis ($p=0.008$) and fatigue ($p=0.032$). R202Q homozygotes have experienced significantly more often repeated episodes of fever ($p=0.022$), diffuse abdominal pain ($p=0.009$) and lymphadenopathy ($p=0.035$). Recurrent fever and nonspecific abdominal pain are the most common symptoms in most AID with *MEFV* gene mutations and suggest the existence of a modified immune response in these persons.

Individuals with the *MEFV* mutations and R202Q homozygotes had significantly higher concentration of erythrocytes TBARS compared with persons without these gene

changes ($p=0.03$), suggesting the existence of increased oxidative damage of erythrocyte membranes. Also, the plasma SOD activity was significantly higher in these individuals ($p=0.049$), and in R202Q homozygotes particular ($p=0.001$), which may be due to increased induction of extracellular SOD. Changes in oxidative stress parameters in the *MEFV* changes carriers were significantly associated with biochemical parameters of inflammation (leukocytes count with erythrocyte TBARS ($p=0.009$) and erythrocyte sedimentation rate and SOD levels ($p=0.031$)).

Conclusion

The *MEFV* gene mutations are present in 11% of healthy persons in Serbia, those are E148Q/N in 6% and K695R/N in 5% of people. There are 10% homozygote for R202Q polymorphism and 45% heterozygote R202Q carriers in Serbian population. Persons with E148Q and K695R heterozygous *MEFV* gene mutations and R202Q homozygous polymorphism have frequently febrile episodes of unknown cause, as well as other non-specific manifestations of inflammation. The mutations carriers and R202Q homozygotes have significantly higher values of erythrocyte TBARS and plasma SOD activity, compared with persons without aforementioned genetic changes. Frequent occurrence of non-specific inflammation manifestations in mutation carriers and R202Q homozygotes indicates that these *MEFV* gene changes are a predisposition for development of inflammation. Changes in oxidative stress parameters indicate the existence of a mild oxidative stress and stimulation of the innate immune response together with possible changes in specific leukocyte functions in these individuals.

Key words: *MEFV* gene mutations, R202Q polymorphism, autoinflammation, febrile episodes, oxidative stress.

SADRŽAJ

UVOD	1
1. PREGLED LITERATURE	2
1.1. <i>MEFV</i> gen, pirin i interleukin-1 β	2
1.2. Značaj mutacija <i>MEFV</i> gena u zapaljenju.....	13
1.3. Značaj R202Q polimorfizma <i>MEFV</i> gena u zapaljenju.....	23
1.4. Oksidativni stres i značaj promena sekvence <i>MEFV</i> gena.....	25
1.5. Autoinflamatorne bolesti.....	34
1.5.1. Monogenske autoinflamatorne bolesti.....	39
1.5.2. Poligenske/multifaktorijske autoinflamatorne bolesti.....	43
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	45
3. RADNA HIPOTEZA	46
4. MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA	47
4.1. Ispitanici.....	47
4.1.1. Protokol istraživanja.....	48
4.1.2. Metoda anketiranja.....	48
4.2. Metode.....	50
4.2.1. Izolacija DNK iz uzoraka pune krvi.....	50
4.2.2. PCR reakcija.....	51
4.2.3. Denaturišćuća tečna hromatografija visokog učinka.....	52
4.2.4. Sekvenciranje DNK.....	53
4.2.5. Određivanje parametara oksidativnog stresa.....	56
4.2.5.1. Određivanje koncentracije produkata lipidne peroksidacije u plazmi.....	56
4.2.5.2. Određivanje koncentracije TBARS u eritrocitima.....	57
4.2.5.3. Određivanje uznapredovalih oksidativnih proteinskih produkata.....	57
4.2.5.4. Određivanje aktivnosti superoksid dizmutaze u plazmi i eritrocitima.....	57
4.2.5.5. Određivanje aktivnosti katalaze.....	58
4.2.6. Određivanje elemenata kompletne krvne slike i biohemijske analize krvi.....	58
4.3. Statistička obrada.....	59
5. REZULTATI	60
5.1. Populaciono–deskriptivna analiza ispitanika.....	60
5.2. Frekvencija mutacija, genotipova i R202Q polimorfizma <i>MEFV</i> gena.....	60

5.3. Hardy–Weinbergov princip za R202Q polimorfizam.....	64
5.4. Rezultati promena parametara oksidativnog stresa.....	65
5.5. Rezultati prisustva kliničkih manifestacija zapaljenja	73
5.5.1. Analiza elemenata krvne slike i biohemijske analize krvi.....	77
6. DISKUSIJA	80
7. ZAKLJUČCI	112
8. LITERATURA	113

UVOD

Najnovija otkrića genetskih osnova autoinflamatornih poremećaja su dovela do značajnog progressa u razumevanju funkcionisanja imunskog sistema. Disregulacija urođenog imunskog odgovora uzrokovana različitim faktorima može dovesti do razvoja autoinflamacije. Autoinflamacija se može definisati kao inflamacija usmerena prema sopstvenom tkivu, gde lokalni faktori na predisponirajućim mestima pokreću aktivaciju ćelija urođenog imunskog sistema, u odsustvu infektivnog patogena ili autoimunskog odgovora. Urođeni autoinflamatorni poremećaji nalaze se na suprotnom kraju spektra imunoloških poremećaja u odnosu na autoimunske (1-8).

Autoinflamatorne bolesti (AIB) imaju specifične imuno-patogenetske i kliničko-patološke odlike. Primarno ih karakterišu spontane epizode povišene temperature i lokalizovanog i/ili generalizovanog zapaljenja. Aktivacija neutrofila i monocita praćena je oslobađanjem proinflamatornih citokina, pokretanjem akutno-faznog zapaljenskog odgovora, kao i intraćelijskom oksidativnom eksplozijom sa intenzivnim formiranjem reaktivnih kiseoničnih vrsta i reaktivnih azotnih medijatora (1, 7).

Promene u strukturi gena za porodičnu mediteransku groznicu (*Mediterranean fever - MEFV*) detektovane su u velikom broju AIB. Osnovna uloga *MEFV* gena je u regulaciji sistemskog inflamatornog odgovora. Produkt *MEFV* gena - protein pirin - jedan je od regulatora aktivnosti inflamazoma, pa time i aktivacije i sekrecije IL-1 β , IL-18, IL-33, aktivacije NF- κ B i apoptoze leukocita (1, 4-6). Uloga mutacija i polimorfizama *MEFV* gena u patogenezi AIB, ali i hroničnih zapaljenskih bolesti sa periodičnom febrilnošću još uvek nije potpuno jasna, ali je utvrđeno da one predisponiraju proinflamatorno stanje (2, 9-13).

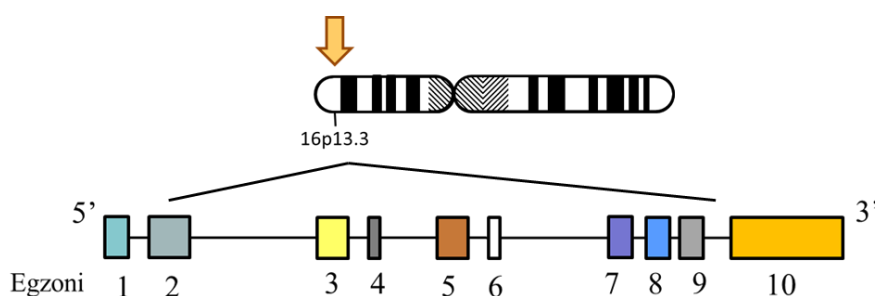
1. PREGLED LITERATURE

1.1. *MEFV* gen, pirin i interleukin-1 β

Gen za porodičnu mediteransku groznicu (*Mediterranean fever - MEFV*) je jedan od prvih identifikovanih gena od posebnog značaja u istraživanjima etiologije autoinflamatornih bolesti (AIB). U poslednjih 10 godina desila su se značajna otkrića na molekularnom nivou u inflamatornim mehanizmima, odnosno identifikovana je genetska osnova febrilnih sindroma i njihova povezanost sa urođenim imunskim odgovorom (1, 2).

U početku genetskih istraživanja naslednih sindroma autoinflamacije koristio se pristup „gena kandidata“, odnosno fokusiralo se na istraživanje defektnih proteina ili medijatora inflamacije. Gen za porodičnu mediteransku groznicu prvi put je izolovan 1997. godine korišćenjem metode „pozicionog kloniranja“ od strane dva nezavisna konzorcijuma (Internacionalnog konzorcijuma za familijarnu mediteransku groznicu (FMF)) i konzorcijuma Francuskih laboratorija i kliničara iz Izraela). Proteinski produkt gena dobio je naziv „pirin“ prema asocijaciji na febrilnost, dominantni simptom u AIB (3, 4).

MEFV gen se nalazi na kraćem kraku hromozoma 16 na poziciji 13.3 (od baznog para 3,292,027 do 3,306,647, na reverznom lancu DNK) i sastavljen je od 10 egzona i 13 introna (14600 baznih parova), dok celokupni transkript gena sadrži 3499 baznih parova (Slika 1) (5-7). U zavisnosti od tipa ispitivanih ćelija identifikovano je 15 različitih transkripta gena (splajsing varijanti). Međutim, najveći broj njih ima preuranjeni stop kodon tako da je njihov fiziološki značaj još uvek nejasan (7).



Slika 1. Šema građe *MEFV* gena

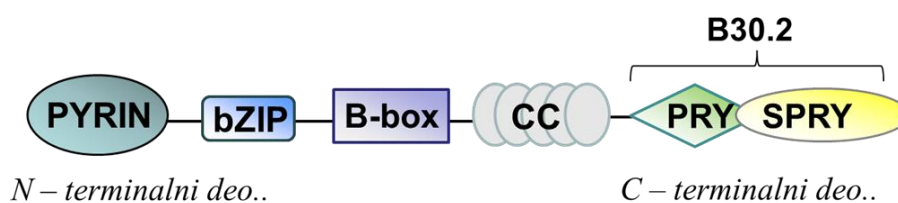
MEFV gen se pre svega eksprimira u neutrofilima, glavnim ćelijama inflamatornih eksudata, kao i u eozinofilima i monocitima, ali ne i limfocitima (5). Informaciona RNK *MEFV* gena nije detektovana u prepromijelocitnoj ćelijskoj liniji, dok je u CD34+

hematopoetskim stem ćelijama ekspresija *MEFV* gena utvrđena tek nakon mijelocitne faze odnosno diferencijacije granulocita (8, 9). Pretpostavlja se da najveći deo ekspresije pirina nastaje tokom procesa aktivacije zrelih neutrofila. U monocitima je nivo ekspresije varijabilan, pri čemu ekspresiju povećavaju proinflamatorni faktori, kao što su interferon- γ (IFN- γ), faktor nekroze tumora- α (TNF- α) i lipopolisaharid (LPS). Manji stepen *MEFV* ekspresije postoji u sinovijalnim fibroblastima, peritoneumu i koži, u odnosu na neutrofile, a može se povećati dejstvom interleukina-1 β (IL-1 β) ili forbol miristat acetata, specifičnog aktivatora protein kinaze C i posledično nuklearnog faktora- κ B (NF- κ B) (9).

MEFV gen kodira protein pirin ili marenostin, veoma bazni protein bogat NH₂ grupama, građen od 781 aminokiseline. U skladu sa ekspresijom *MEFV* gena, protein pirin se dominantno nalazi u ćelijama granulocitne loze, aktiviranim monocitima, makrofagima, seroznim i sinovijalnim fibroblastima i dendritičnim ćelijama (3, 5, 10-12).

U građi pirina razlikuje se pet različitih domena, od kojih svaki može stupiti u interakciju sa drugim proteinima, to su: PYRIN (ili PYD) domen, bZIP transkripcioni faktor bazični domen, B-box cinkani prsti, α -heliksni (“*coiled coil*” - CC) i B30.2 (PRYSPRY) domen (Slika 2) (10, 13).

Svaki domen ima specifičnu ulogu u protein-protein interakcijama i to sa proteinima uključenim u procese inflamacije, regulacije ćelijske smrti, sekrecije citokina, regulacije



Slika 2. Šema građe proteina pirina

transkripcije i citoskeletne signalizacije. Identifikacija većeg broja mogućih vezujućih proteina upućuje na učešće pirina u više molekularnih puteva signalizacije. Međutim, ako se uzme u obzir njegova ograničena ekspresija u ćelijama urođenog imunskog sistema izgleda da je glavna uloga ovog molekula u regulaciji procesa inflamacije (13).

Pirin prolazi kroz najmanje dve post-translacione modifikacije. Fosforilacija pirina omogućava njegovo vezivanje za proteine „14.3.3“ koji učestvuju u apoptozi, dok se izoforma pirina kojoj nedostaje egzon 2 lakše translocira u jedro (7, 14).

Pirin je lokalizovan u jedru sinovijalnih fibroblasta, dendritičnih ćelija i polimorfonukleara i u citoplazmi monocita (11). Iako je C-terminalni deo homolog sa nekoliko transkripcionih faktora, ceo molekul pirina se kolokalizuje sa mikrotubulima

citoplazme, pri čemu je N-terminalni domen neophodan i dovoljan za kolokalizaciju. Bojenjem faloidinom utvrđeno je da se pirin kolokalizuje sa aktinom u perinuklearnim filamentima i perifernim lamelarnim rafovima. Zbog toga su prve pretpostavke o funkciji pirina bile vezane za regulaciju inflamatornog odgovora na nivou citoskeletne organizacije leukocita (15).

Precizna uloga pirina još uvek nije dovoljno jasna. Zna se da je on jedan od regulatora aktivnosti inflamazoma, pa time i aktivacije IL-1 β , NF- κ B i apoptoze leukocita. Posledično, mutacije u genu ovog proteina dovode do poremećaja regulacije navedenih procesa u ćelijama urođenog imunskog sistema (16).

Poznato je da proteini koji u svojoj građi poseduju PYRIN domen učestvuju u kontroli inflamazoma. PYRIN domen je identifikovan u više od 20 proteina sa funkcijom regulacije inflamacije i apoptoze (10, 13). N-terminalni PYRIN domen (~ 90 aa) je klasifikovan kao četvrti član superfamilije proteina sa takozvanim domenom-smrti (*death domain fold superfamily* – DD) u koju spadaju još i DD domen, domen efektor smrti i kaspaza regrutujući domen (CARD) (17). Trodimenziona struktura DD superfamilije proteina sadrži šest alfa heliksa i dozvoljava homotipsku protein-protein interakciju, pa se tako putem interakcije dva PYRIN domena molekula pirina može vezati sa drugim proteinima koji imaju PYRIN domen. PYRIN domen pirina može stupiti u interakciju sa adaptivnim proteinom ASC (*apoptosis-associated speck-like*), odnosno njegovim CARD domenom. ASC je građen od N-terminalnog PYRIN domena i C-terminalnog CARD domena i utvrđeno je da oligomerizuje i učestvuje u proteolitičkoj aktivaciji kaspaze-1 kroz formiranje i aktivaciju inflamazoma. ASC ima specifičnu ulogu u regulaciji sekrecije citokina, aktivaciji NF- κ B i apoptozi, tako što direktno učestvuje u formiranju različitih inflamazoma (13, 18, 19).

S druge strane, C-terminalni domen pirina - B30.2 se sastoji iz N-terminalnog PRY i C-terminalnog SPRY subdomena (~ 200 aa), koji takođe postoje u različitim ćelijskim proteinima sa različitim funkcijama. PRYSPRY domen je nađen u preko 500 različitih proteina uključenih u imunsku (citokinsku) signalizaciju, ćelijski rast i razvoj, kao i restrikciju retrovirusnih infekcija. Ovi subdomeni reaguju sa specifičnim partnerskim proteinskim obrascima, pre nego ustaljenim nespecifičnim sekvencama proteina (13, 20).

SPRY domen je evolutivno starija sekvenc proteina koja se nalazi kod životinja, biljaka i gljiva, za razliku od PRYSPRY domena, koji postoji samo kod nekih kičmenjaka (21). PRYSPRY domena nema kod glodara što ukazuje na njegov skorašnji evolutivni razvoj i naglašava specifičnu funkciju kod ljudi. Evolutivna ekspanzija SPRY u PRYSPRY domen je slična ekspanziji imunskih receptora koja je nastala pojavom adaptivnih imunskih

mehanizama (22, 23). PRYSPRY domen formira dimer u kojoj se C-terminalna akceptorska sekvenca molekula vezuje za konkavnu površinu donorne sekvence i tako formira interakciono mesto, slično interakciji kompleksa antigen-antitelo (20). Ovakva interakcija sugerira vezivanje PRYSPRY domena za target proteine različitih sekvenci. Polimorfizam sekvenci 24 PRYSPRY TRIM (*tripartite motif*) proteina upućuje na postojanje specifičnih setova target proteina za svakog člana ove familije (24).

Povećanje ekspresije indukovano tipom 1 interferona i retrovirusnim infekcijama stvara pretpostavku o mogućoj ulozi pirina u antiviralnom odgovoru. Takođe, funkcija određenih članova TRIM familije proteina je u ograničenju retrovirusne replikacije i to prepoznavanjem virusnog kapsida njihovim SPRY domenom (25, 26).

B30.2 ili PRYSPRY domen pirina omogućava interakciju sa glavnim komponentama inflamazoma kao što su proteini NLRP1, NLRP2, NLRP3 (proteini koji sadrže NACHT, LRR (eng. *leucin-rich repeat*) i protein 3 sa PYRIN domenom) i kaspazom-5 (13, 26). Takođe, B30.2 može stupiti u direktnu vezu sa kaspazom-1 i modulirati njenu aktivnost. Dokazano je da se B30.2 domen pirina direktno vezuje za katalitički domen kaspaze-1 kao i njene aktivne katalitičke subjedinice: p10 i p20 (13, 27-30).

Istraživanja AIB su doprinela boljem razumevanju urođenog imunskog sistema. Receptori za prepoznavanje obrazaca patogena (PRRs - *pattern recognition receptors*) je grupa molekula odgovorna za prepoznavanje signala opasnosti ćelija (mikrobnih patogena, komponenti ćelijskog oštećenja i stresa) koji su uključeni u prvu liniju odbrane organizma. U grupu signalnih PRRs spadaju "ekstracelularni" membranski Toll-like receptori (TLRs), otkriveni pre desetak godina, dok je nekoliko godina kasnije otkrivena i grupa intracelularnih citoplazmatskih NOD-like receptora (NLRs). PRRs su visoko konzervirani molekuli prisutni čak u biljkama i insektima. Otkriveno je da su dva NOD-like receptora, NLRP3 i NOD2, povezana sa nastankom AIB (31-34).

Naime, inflamazomi su citoplazmatski multiproteinski kompleksi koji se formiraju kao odgovor na različite signale patogena ili signale oštećenja ćelije, čija je glavna uloga u regulaciji aktivnosti enzima kaspaze-1 i maturacije i sekrecije proinflamatornih citokina. Veliki broj različitih stimulusa, kako infektivnih tako i endogenih signala oštećenja tkiva, može pokrenuti integraciju ovih kompleksa u ćelijama urođenog imunskog sistema. Utvrđeno je da aktiviranje intraćelijskih puteva signalizacije IL-1 β predstavlja zajednički mehanizam u patogenezi AIB (16, 34, 35).

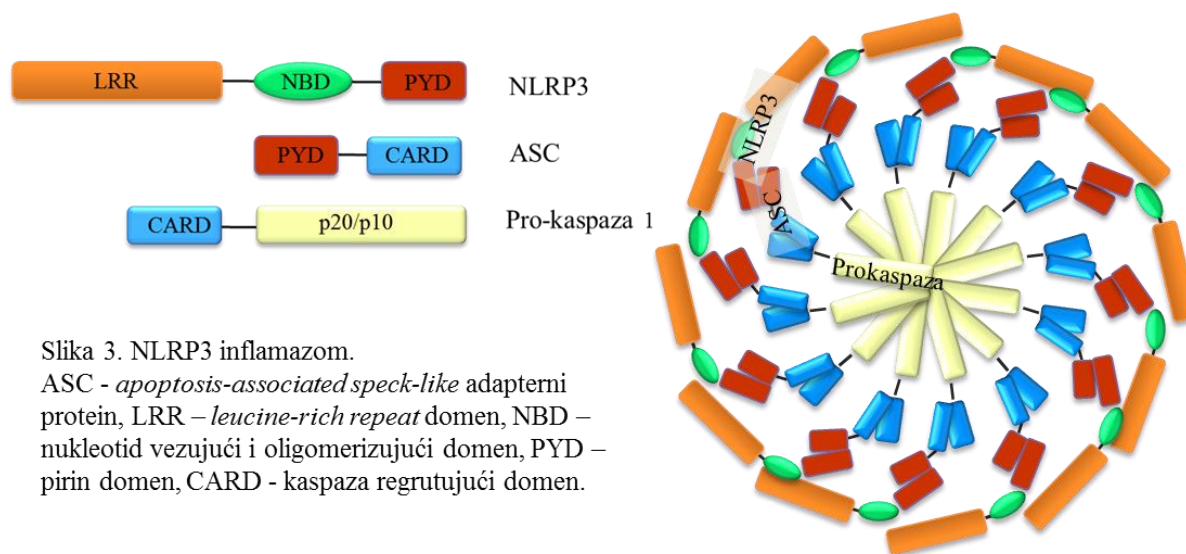
Nekoliko grupa inflamazoma je definisano na osnovu njihovih aktivirajućih receptora, odnosno: nukleotid vezujućih i oligomerizirajućih domen (NOD) receptora (NLRs), gde spadaju NALP1, NLRP2 i NLRP3. U drugu grupu inflamazoma spada ICE proteaza aktivirajući faktor (IPAF) ili NLRC4 (eng. *NLR family CARD domain-containing protein 4*). Nedavno je utvrđen još jedan tip inflamazoma – AIM2 (eng. *absent in melanoma 2*) (interferon inducibilni član porodice proteina HIN-200) koji se aktivira citoplazmatskim DNK (36, 37). U NLRP i AIM2 inflamazomima ASC učestvuje kao adaptivni molekul koji povezuje receptor inflamazoma sa svojim PYRIN domenom i prokaspazu-1 svojim CARD domenom. Imajući u vidu da ASC reaguje sa pirinom moguće je da pirin učestvuje kao modulator u NLRP2/3 ili AIM2 inflamazomima ili može i sam biti komponenta ovih inflamazoma (13).

Aktivacija NLRP3 inflamazoma (700kDa) je kompleksni proces koji je ekstenzivno proučavan poslednjih nekoliko godina. U stanju mirovanja ćelije ekspresija NLRP3 inflamazoma je jako niska i on se nalazi neaktivan u citoplazmi zbog veze sa šaperonskim kompleksom SGT1/HSP90. Aktivacija NLRP3 prvenstveno zahteva transkripciju gena za komponente ovog inflamazoma što mogu pokrenuti različiti signali, kao na primer: LPS, TNF i IL-1 β . Smatra se da je sekundarni signal neophodan za sklapanje NLRP3 inflamazoma i njegovu aktivaciju u makrofagima (Slika 3) (33, 38-40).

Veliki broj stimulusa može aktivirati NLRP3 inflamazom, uključujući: mikrobiološke komponente (LPS, nukleinske kiseline, muramil dipeptid), toksine, citokine, velike neorganske kristale (azbest, silicijum aluminijum hidroksid – adjuvans), endogene molekule: ATP, mokraćnu kiselinu, heparin sulfat, oksidisani LDL, ceramid, kristale holesterola, amiloid β i drugo (2, 41, 42). Zbog velike raznovrsnosti stimulusa smatra se da svi oni aktiviraju NLRP3 preko zajedničkih signalnih mehanizama i pokreću slične ćelijske odgovore. Jedan od njih je smanjenje citoplazmatske koncentracije kalijuma. Neki agensi formiraju pore u membrani posredstvom paneksin kanala čime ekstracelularni molekuli ulaze u ćeliju i aktiviraju NLRP3. Ekstracelularni ATP aktivira inflamazom preko P2X7 jonskog kanala, koji pokreće brzi izlaz kalijuma iz ćelije i stvaranje pora preko paneksina-1. Veće ingestovane partikule koje se teško uklanjaju destabilizuju fagozome i dovode do ruptur lizozoma čime se oslobađa lizozomski protein katepsin B, koji potom aktivira NLRP3.

Neki agensi aktiviraju inflamazom posredstvom reaktivnih vrsta kiseonika (RVK) (najčešće u situacijama ćelijskog stresa). Ovo je potvrđeno farmakološkom blokadom RVK koja redukuje aktivaciju inflamazoma (41-43).

NLRP3 inflamazom je poseban u odnosu na druge inflamazome jer zahteva primarnu pripremu (prajming) proinflamatornim signalom, a koji podrazumeva indukciju njegove ekspresije. Pokazano je da inhibitori RVK blokiraju ovaj prvi korak u aktivaciji NLRP3. Ovo je kritični period jer su nivoi komponenti inflamazoma u mirujućim ćelijama minimalni i potrebna je njihova transkripcija da bi se obezbedio dovoljan nivo u ćeliji. Za razliku od toga, aktivacija kaspaze-1 putem AIM2 i NLRC4 inflamazoma se ne menja inhibicijom RVK zbog njihove konstitutivne ekspresije (43).



Slika 3. NLRP3 inflamazom.

ASC - *apoptosis-associated speck-like* adaptorni protein, LRR – *leucine-rich repeat* domen, NBD – nukleotid vezujući i oligomerizujući domen, PYD – pirin domen, CARD - kaspaza regrutujući domen.

Sklapanjem NLRP3 inflamazoma dva molekula prokaspaze-1 se dovode u bliski kontakt, što izaziva njihovu proteolitičku aktivaciju i oslobađanje aktivnih katalitičkih domena: p20 i p10. Kaspaza-1, ili IL-1 β konvertujući enzim, je cistein proteaza koja procesuirala pro-IL-1 β , pro-IL-18, pro-IL-33 i još nekoliko drugih sekretornih proteina u bioaktivne citokine. Pro-IL-1 β se nalazi u monocitima, makrofagima i dendritičnim ćelijama u veoma malim količinama u odsustvu proinflamatornih stimulusa. Aktivna kaspaza-1 proteolitički preseca N-terminalni kraj prekursora 17kD-IL-1 β na mestu alanina na poziciji 117 polipeptidnog lanca u njegovu biološki aktivnu 17-kDa formu (19, 38, 42).

Zbog potencijalne interakcije proteina pirina sa ASC preko PYRIN domena, moguće je da je i pirin uključen u regulaciju ovog tipa inflamazoma. Međutim, ne zna se tačno da li je njegova uloga inhibitorna ili promotivna u odnosu na aktivaciju IL-1 β (44, 45). Postoji više hipoteza o mehanizmu dejstva pirina. Prema sekvencijalnoj hipotezi, pirin ima inhibitorni efekat na formiranje inflamazoma (NLRP1-3), time što se kompetitivno vezuje za njegove komponente, odnosno za ASC protein i prokaspazu-1 (27, 29, 30, 46). Zbog mogućnosti vezivanja za prokaspazu-1 pretpostavlja se da pirin inhibira proteolitičku aktivaciju prokaspaze-1 kao i njenih subjediniica. Takođe, dokazano je da B30.2 domen može reagovati

sa pro-IL-1 β što bi dodatno dovelo do blokade sekrecije IL-1 β (25, 47). Pored toga, česte mutacije pirina M694V i M680I pogoršavaju njegovu interakciju sa kaspazom-1, što bi značilo manju inhibiciju, a čime bi se mogla objasniti povećana produkcija IL-1 β u autoinflamaciji (30, 48).

Druga hipoteza je da sam pirin učestvuje u formiranju inflamazoma i to vezivanjem za ASC i druge adapterne proteine radi aktiviranja prokaspaze-1 i aktivacije IL-1 β (49).

U jednom od istraživanja u kome se razmatra inflamazom-aktivirajuća funkcija pirina pokazano je da se pirin specifično vezuje za protein PSTPIP1 (prolin serin treonin fosfataza-interagujući protein 1) ili takozvani CD2 vezujući protein-1. Veza ova dva proteina se uspostavlja između B-box/CC domena pirina i SH3 (*Src homology-3*)/CC regiona PSTPIP1 i značajno je povećana u prisustvu mutacija PSTPIP1 molekula. Mutacije PSTPIP1 dovode do pojave sindroma - piogeni artritis, pioderma gangrenozum i akne (PAPA) u kome takođe postoji povećanje nivoa IL-1 β u monocitima. Utvrđeno je da vezivanje PSTPIP1 za pirin promoviše demaskiranje PYRIN domena pirina i njegovu interakciju sa ASC, koji potom regrutuje kaspazu-1. Ovaj proces je intenzivniji u prisustvu mutacija PSTPIP1 u PAPA sindromu (26, 50).

Pored toga, sama kaspaza-1 može preseći pirin, koji je za nju vezan, na mestu ASP330. Tako nastali C-terminalni deo pirina ostaje u citoplazmi dok se N-terminalni fragment vezuje sa p65 subjedinicom NF- κ B i translocira u jedro, čime ujedno ubrzava ulazak p65 u jedro. N-terminalni fragment reaguje i sa I κ B- α (NF- κ B inhibitor), te i tako učestvuje u promociji ASC nezavisne aktivacije NF- κ B (51). NF- κ B je transkripcioni faktor koji se nalazi inaktivan u citoplazmi ćelija i obično se aktivira citokinima ili oksidansima. NF- κ B je uključen u proces inflamacije i aktivacije imunskog sistema, a pokazano je i da pojačava ekspresiju gena za inducibilnu azot monoksid sintazu (7, 52).

N-terminalni fragment pirina izgleda potencira aktivaciju NF- κ B i to putem bar dva moguća mehanizma: ubrzanjem ulaska p65 NF- κ B u jedro i povećanjem degradacije I κ B- α . Interakcija pirina sa p65 komponentom se dešava kroz bZIP transkripcioni faktor bazni domen, dok se interakcija sa I κ B- α ostvaruje nedefinisanim proteinskim domenom u susedstvu bZIP-a (8, 13, 51).

bZIP domen postoji u brojnim eukariotskim transkripcionim faktorima. Poznatu grupu ovih faktora čini NF- κ B/Rel familija. Kroz Rel domen-bZIP vezu, p65 može reagovati sa većim brojem transkripcionih faktora. Istim ovim putem i N-terminalni fragment pirina može vezati p65 subjedinicu i modulirati njenu funkciju u smislu povećanja genske ekspresije (13).

Regulatorna uloga N-terminalnog fragmenta pirina je izgleda specifična za p65 subjedinicu jer ovaj fragment ne reaguje sa drugom subjedinicom NF- κ B (p50) što je karakteristika i interakcije Fos i Jun (AP-1) transkripcionih faktora sa NF- κ B. Interakcija N-terminalnog fragmenta pirina sa I κ B- α indukuje kalpain posredovanu degradaciju I κ B- α , što takođe predstavlja ređi, ne-klasični, put aktivacije NF- κ B (13).

U različitim eksperimentalnim sistemima pokazano je da pirin može delovati pojačanjem ili inhibicijom aktivacije inflamazoma. U zavisnosti od tipa eksperimentalnog modela, ektopično "utišavanje" pirina sa siRNK dovelo je do povećanja ili smanjenja IL-1 β sekrecije u THP-1 humanim monocitnim ćelijama (26, 27, 30, 46, 48).

Dokazi da pirin ima anti-inflamatornu ulogu su proizašli iz eksperimenata sa skraćenom formom molekula "truncated" pirina u animalnim modelima. U ovom slučaju rezultati su pokazali povećanu obradu IL-1 i defektivnu lipopolisaharid- i IL-4 indukovanu apoptozu peritonealnih monocita (53).

Bez obzira na tačan mehanizam dejstva pirina, aktivacija ili odsustvo inhibicije intraćelijskih signalnih puteva IL-1 β je čest mehanizam u patogenezi AIB (3). Interleukin-1 β je plejotropni citokin i centralni medijator inflamatornog odgovora. Naziva se endogeni pirogen jer svojim dejstvom na termoregulacioni centar u hipotalamusu, posredstvom sinteze i oslobađanja prostaglandina E₂, dovodi do podešavanja rada termoregulacionog centra na viši nivo, što rezultuje porastom telesne temperature. Smatra se da je odgovoran za pojavu konstitucionalnih simptoma u koje se pored febrilnosti ubrajaju i malaksalost, anoreksija, zastoj rasta i dr. Dejstvom na hipotalamo-pituitarnu osu utiče na produkciju adenokortikotropnog hormona, hormona rasta, somatostatina i vazopresina. U ostale efekte IL-1 β se ubrajaju: indukcija leukocitoze, hiperalgezija, smanjenje osećaja gladi, povećanje sinteze proteina akutne faze zapaljenja posredstvom IL-6, aktivacija osteoklasta i stimulacija sinteze matriks-metaloproteinaza. Takođe, IL-1 stimuliše proliferaciju timocita preko indukcije otpuštanja IL-2, stimuliše maturaciju i proliferaciju B ćelija, kao i aktivnost fibroblastnog faktora rasta; pojačava transkripciju gena proinflamatornih molekula (inducibilne azot monoksid sintaze, ciklooksigenaze 2, fosfolipaze A₂) i proinflamatornih citokina i adhezionih molekula (3, 13, 54, 55). Interleukin-1 familija citokina interaguje sa tipom 1 receptora (IL-1R), uključujući IL-1 α , IL-1 β i IL-1 receptor antagonist protein. IL-1 α i IL-1 β se u inaktivnim ćelijama sintetisu kao citoplazmatski prekursori (pro-IL-1 α i pro-IL-1 β) (56). IL-1 β i IL-18 pokrenuta signalna transdukcija dovodi do serije događaja koji konačno dovode do aktivacije signalnih puteva NF- κ B i p38 mitogen aktivirajuće protein

kinaze (MAPK). Takođe, patogenima aktivirani inflamazomi pokreću specifični oblik ćelijske smrti zavisne od kaspaze-1, nazvane - piroptoza. Ovo indukuje jaki inflamatorni odgovor sa otpuštanjem proinflamatornih citokina (57-59).

Oslobađanje IL-1 β iz monocita je strogo kontrolisan proces gde se manje od 20% ukupnog prekursora IL-1 β obrađuje i sekretuje (60). U fiziološkim uslovima, produkcija i oslobađanje IL-1 β su stimulisani patogen-udruženim molekularnim obrascima (*pathogen-associated molecular patterns* - PAMPs) ili molekulskim obrascima udruženim sa oštećenjem ćelija (*damage-associated molecular pattern molecules* - DAMPs). Ovaj proces ima nekoliko faza (3, 60, 61).

Mehanizam sekrecije IL-1 β se deli u dva koraka. U prvom, patogenim antigenima stimulisani receptori indukuju ekspresiju gena za IL-1 β i akumulaciju prekursora (pro-IL-1 β). U drugom koraku, stimuli kao što je ekstracelularni ATP, kristali, RVK ili drugo, pokreću sklapanje inflamazoma i potom konverziju pro-IL-1 β u aktivnu formu i njegovu sekreciju (60, 61). U humanim monocitima stimulacija PAMP molekulima (prvi korak) je dovoljna za sekreciju IL-1 β jer se istovremeno sa stimulacijom antigenih receptora oslobađa endogeni ATP. Odnosno, autokrini stimulacija P2X7 receptora ATP-om pokreće kaskadu događaja koji rezultuju sekrecijom IL-1 β (42, 62).

Obrada i oslobađanje IL-1 β su blisko povezani jer se sekretorna forma IL-1 β nalazi samo unutar inflamatornih ćelija neposredno pre sekrecije (56). Pošto ne poseduju signalnu sekvencu oni se ne sekretuju klasičnim putem preko endoplazmatskog retikuluma-Goldžijevog aparata (63). U monocitima se deo ćelijskog IL-1 β oslobađa putem kasnih endozoma i ranih lizozoma i ovo možda predstavljaju mesta ćelijskog odeljka obrade IL-1 β (44). Postoji više pretpostavki o samom procesu oslobađanja IL-1 β iz ćelija. Jedan od najverovatnijih je otpuštanje mikrovezikula sa plazma membrane aktivisanih ćelija. Oslobađanje mikrovezikula sa plazma membrane se dešava unutar 2-5 sekundi od aktivacije membranskog receptora P2X7 na humanim THP-1 monocitima, što predstavlja glavni sekretorni put brzog oslobađanja IL-1 β (64).

Tačan uticaj redoks stanja ćelije na sekreciju citokina još uvek nije sasvim jasan. Pretpostavlja se da RVK, koje su stvorene NADPH (nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat) oksidazom nakon izlaganja egzogenom ATP-u, mogu aktivirati inflamazome (65-67). U humanim monocitima aktiviranje PRR indukuje aktivaciju NADPH oksidaze sa ranom produkcijom RVK koji su potom odgovorni za pokretanje antioksidativnog odgovora ćelije. I produkcija RVK i antioksidativni odgovor su neophodni za oslobađanje zrele forme IL-1 β (68). Inhibitori redoks odgovora remete oslobađanje IL-1 β čime se potvrđuje funkcionalna

veza između ova dva procesa. Farmakološka sredstva koja blokiraju produkciju RVK ili antioksidativnog odgovora onemogućavaju sekreciju zrele forme IL-1 β , ali ne i biosintezu pro-IL-1 β , što ukazuje da promena redoks stanja ćelije utiče na IL-1 β obradu i sekreciju (69). Inhibitori NADPH oksidaze (difenilen jodonijum - DPI) i tioredoksin oksidoreduktazne (Trx) aktivnosti (BCNU) značajno smanjuju sekreciju IL-1 β monocita kod bolesnika sa kriopirin udruženim periodičnim sindrom (CAPS) i sistemskim juvenilnim idiopatskim artritismom (sJIA), što potvrđuje vezu redoks stanja i IL-1 β sekrecije (70).

Budući da mitohondrije predstavljaju važan izvor ćelijskih RVK, pokazano je da su upravo one mesto najveće produkcije RVK tokom aktivacije NLRP3 inflamazoma. Produkcija RVK i aktivacija inflamazoma se suprimiraju kada dođe do farmakološke blokade mitohondrijalnih membranskih kanala. Ovo ukazuje da NLRP3 inflamazom detektuje mitohondrijalnu disfunkciju, a mitohondrijalni RVK obezbeđuju prvi korak u aktivaciji inflamazoma tj. povećavaju transkripciju NLRP3. Takođe, RVK aktiviraju proinflamatorne transkripcione faktore, dok njihova produkcija pozitivno reguliše ekspresiju proinflamatornih gena u više signalnih puteva urođenih imunskih ćelija (71-73).

Interleukin-1 β je potentni medijator urođenog imunskog sistema, nastanka groznice i lokalnog i/ili sistemskog zapaljenja. Disregulacija inflamazoma koja aktivira kaspazu-1 narušava kontrolu prerade prekursora IL-1 β , tako da defekt u kontroli regulacije inflamazoma dovodi do poremećaja signalnih puteva IL-1 β , ali bez aktivacije stečenog imunskog sistema (74). Zbog toga su i kliničke manifestacije poremećaja regulacije inflamazoma i kaspaze-1 pre svega posledica dejstva IL-1 β i masivnog infliksa aktiviranih leukocita u različita tkiva. Aktivacija neutrofila i monocita je praćena oslobađanjem i drugih proinflamatornih citokina (IL-6 i TNF- α), pokretanjem akutno-faznog zapaljenskog odgovora, kao i intraćelijskom oksidativnom eksplozijom sa intenzivnim formiranjem RVK i reaktivnih azotnih medijatora, putem NADPH oksidaza kompleksa i mijeloperoksidaznog sistema (10, 13). Reaktivne kiseonične i azotne vrste mogu oštetiti ćelije i to putem peroksidacije lipida ćelijske membrane i oksidativne modifikacije ugljenih hidrata, lipida, proteina i nukleinskih kiselina. Oksidativno modifikovani lipidi i proteini su citotoksične komponente koje dalje mogu oštetiti različite molekule, komponente ćelije i prolongirati inflamaciju (13).

Takođe, značajno je postojanje pozitivne povratne sprege između sekrecije IL-1 β , aktivacije fagocita i produkcije RVK, koja može pogoršati inflamaciju i oksidativni stres. IL-1 β indukuje neutrofiliju i aktivaciju fagocitne NADPH oksidaze (13, 27, 46, 75). Aktivirani fagociti produkuju proinflamatorne citokine (IL-1, TNF- α , i IL-6) (54), dok RVK sa svoje

strane regulišu IL-1 β produkciju kroz aktivaciju inflamazoma i NF- κ B, kao i privlačenjem fagocitnih ćelija u ognjišta zapaljenja (76). Zbog svega ovoga, formiranje RVK može biti produženo u hroničnim sindromima zapaljenja čak i u klinički mirnom periodu bolesti. Uloga oksidativnog stresa u zapaljenju je opisana u patogenezi mnogih bolesti uključujući autoinflamatorne (54, 75-77).

1.2. Značaj mutacija *MEFV* gena u zapaljenju

Mutacije su najveći izvor genetskih varijacija jedne vrste i predstavljaju važan element evolutivnog procesa. Mutacija je proces u kome dolazi do zamene parova nukleotidnih baza u sekvenci DNK. Zamena može biti u smislu promene jednog ili nekoliko parova baza (*point* mutacije), ili celih ili dela hromozoma (hromozomske mutacije) (13).

Za razliku od mutacija, DNK polimorfizam predstavlja više varijanti (formi) alela jednog hromozomskog lokusa, koji se mogu razlikovati u nukleotidnoj sekvenci (SNP - eng. *single nucleotide polymorphism*) ili imaju takozvane - tandemske ponovke promenljivog broja. Sem toga, smatra se da je polimorfizam varijacija sekvence DNK koja je česta u populaciji, sa prevalencom većom od 1%, dok su mutacije promene sekvence DNK prisutne u manje od 1% opšte populacije (78).

I mutacije i polimorfizmi DNK imaju varijabilni uticaj na strukturu i funkciju ćelija. Neke mutacije su potpuno neutralne i ne menjaju funkciju ćelija, dok druge mogu biti fatalne za jedinku. Mutacije mogu dovesti do potpunog prestanka sinteze određenog proteina ili abnormalnosti njegove funkcije, čime se menja i fenotip ćelije. Najveći broj polimorfizama ima potpuno neutralni efekat na ćeliju. Međutim, pojedine polimorfne sekvence doprinose predispoziciji osoba za razvoj multifaktorijskih bolesti, kao što su srčane ili neurodegenerativne bolesti (13, 78).

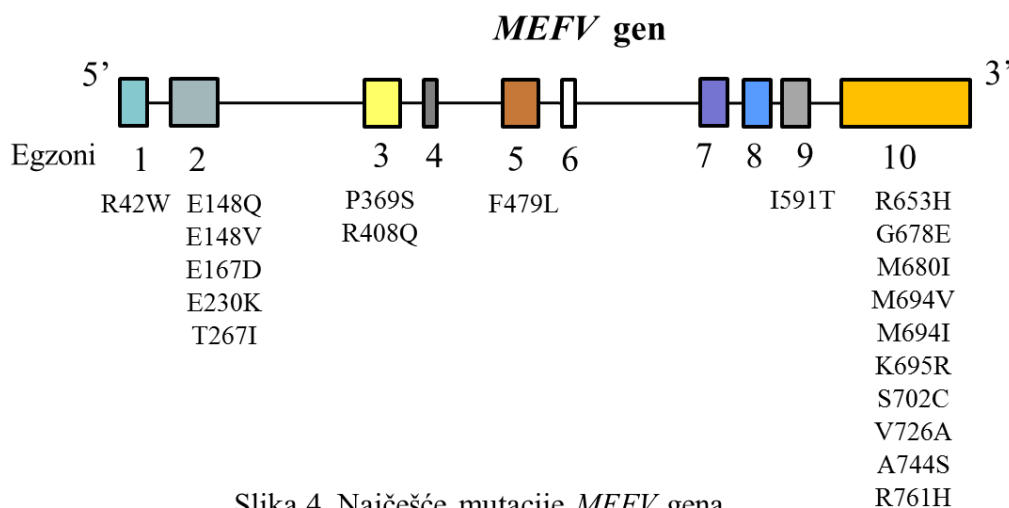
Tako na primer, mutacije u genu za TNF receptor-1 (*TNFRSF1A*) dovode do disregulacije odgovora ćelije na ovaj citokin, što pokreće intracelularni zapaljenski odgovor. S druge strane, polimorfizmi gena za TNF (-1031 T/C, -863 C/A, -857 C/T) mogu doprineti razvoju reumatoidnog artritisa putem povećanja produkcije TNF- α (78-81).

Do danas je identifikovano 289 varijanti sekvence *MEFV* gena sa različitim potencijalom za razvoj autoinflamacije. Najveći broj mutacija su "missense" mutacije, izazvane supstitucijom jednog baznog para tako da nastali protein ima izmenjenu aminokiselinsku sekvencu, što može drastično promeniti njegovu funkciju. Manji broj genskih promena čine pojedinačne duplikacije ili delecije gena (6).

U primarne ili "founder" mutacije *MEFV* gena, koje su ujedno i najčešće, ubraja se pet mutacija i to: M694V, V726A, M680I i M694I u egzonu 10, koje odgovaraju domenu B30.2 pirina, i E148Q u egzonu 2. One čine oko 74% hromozomskih promena tipičnih za porodičnu mediteransku groznicu u populacijama istočnog mediteranskog basena, pre svega kod Jevreja, Turaka, Arapa i Jermena. M694V mutacija je najčešća u ove četiri populacije sa

zastupljenošću od 20-65% (82-84). Međutim, prisustvo *MEFV* mutacije se sve češće otkriva i u mnogim drugim zemljama - Španija, Italija, Grčka, Portugalija, Indija, Kina i dr (85-87).

Frekvencija nosioca mutacija kod severno-afričkih Jevreja se procenjuje na 1/5, kod Aškenazi Jevreja (centralna i zapadna Evropa) 1/11, Jermena 1/7 i Turaka 1/5 (88, 89). Opšta stopa nosioca četiri najčešće mutacije (M680I, M694V, V726A i E148Q) u studiji Gershoni-Baruch i sar. (90) iznosila je 1:4.5 kod Aškenazi Jevreja, 1:4.7 kod marokanskih Jevreja, 1:3.5 iračkih i 1:4.3 kod muslimanskih Arapa.



Slika 4. Najčešće mutacije *MEFV* gena

Ukupna frekvencija alela pet najčešćih mutacija u turskoj populaciji prema istraživanju Yilmaz i sar. (91) iznosi 11%. Mutacija M694V dominira kod FMF bolesnika (51,6%), dok je stopa nosioca ove mutacije 3% u opštoj turskoj populaciji.

Najčešće identifikovane mutacije u grčkoj populaciji prema studiji Giaglis-a i sar. (92) su M694V (38,1%), M680I (19,7%), V726A (12,2%), E148Q (10,9%) i E230K (6,1%). U ređe detektovane mutacije spadaju K695R (3,4%) i M694I (2,7%).

Takođe, postoje retke mutacije *MEFV* gena koje pretenduju vezu sa specifičnim populacijama, na primer: I591T u francuskoj populaciji (93) ili S702C i F479L koje su česte na Kipru. Slično tome, R202Q alteracija povezana je sa razvojem AIB kod Grka (92). U ređe mutacije udružene sa razvojem autoinflamacije spadaju i E167D i T267I u egzonu 2, P369S u egzonu 3, F479L egzonu 5, I692del, K695R, A744S i R761H u egzonu 10 (Slika 4) (94).

Procena zastupljenosti *MEFV* mutacija nije do sada ispitivana u našoj populaciji. Međutim, zbog geografskog položaja Srbije u neposrednoj blizini Mediterana i čestog mešanja stanovništva sa susednim narodima tokom svoje istorije, postoji verovatnoća da se mutacije *MEFV* gena prenosile i na naše stanovništvo.

Mutacije koje kod ljudi izazivaju različite bolesti često predstavljaju normalnu gensku sekvencu kod određenih životinjskih vrsta. Ova pojava je utvrđena i za određeni broj mutacija *MEFV* gena u toku evolucije primata. Pojava mutiranog gena predstavlja ponovno javljanje ancestralnog aminokiselinskog sastava proteina. Istraživanja prisustva selekcije mutacija *MEFV* gena su utvrdila da je postojala epizodična pozitivna selekcija koja je uslovlila funkcionalnu evoluciju pirina kod ljudi i primata (39, 95).

Mutacije i polimorfizmi gena koji kodiraju regulatore ili aktere inflamatornog odgovora ćelija (pirin, IL-1 β , TNF- α , NF- κ B) mogu značajno remetiti imunoregulatorne mehanizme i dovesti do autoinflamatornih poremećaja (3, 13, 51, 81).

Jedna od najčešćih mutacija - M694V prisutna je kod severno-afričkih Jevreja i Jermena, dok se V726A mutacija javlja kod iračkih i ne-Aškenazi Jevreja, Druza i Jermena. Ovi podaci podržavaju teoriju da su ove dve mutacije jako stare i da su se verovatno pojavile na bliskom istoku odakle su se širile u Evropu i severnu Afriku pre više od 2500 godina (3).

Visoka frekvencija nosioca mutacija u populacijama istočnog mediteranskog basena se objašnjava fenomenom heterozigotne selekcije (85-87). Prisustvo visoke frekvencije mutacija u većem broju populacija, sa različitim mutacijama u različitim etničkim grupama, podržava heterozigotnu selekciju u odnosu na genetski drift kao oblik genske selekcije (13).

Pretpostavlja se da se funkcija ove "prednosti" nosioca mutacija odnosi na jači inflamatorni odgovor ili bolju otpornost prema još nedeterminisanim mikroorganizmima, intracelularnim patogenima ili specifičnim organizmima (95-98). Takođe, moguće je da heterozigotni genotip pruža određenu zaštitu protiv bolesti sa pojačanom Th2 aktivnošću kao što je astma, pošto *MEFV* varijante utiču na promenu polariteta Th odgovora iz Th2 u Th1 (98, 99). Tako je pokazano da je prevalenca atopije i alergijskog rinitisa kod FMF bolesnika kao i nosioca mutacija značajno manja u odnosu na kontrole (100, 101).

Posebno bitnu ulogu u razvoju autoinflamacije ima C-terminalni B30.2 domen pirina jer se tu nalazi najveći procenat mutacija udruženih sa nastankom poremećaja funkcije inflamazoma. B30.2 domen je neophodan i dovoljan za direktnu interakciju pirina sa kaspazom-1 (10, 13, 28).

Utvrđeno je da se pirin koji nosi jednu od tri najčešće mutacije (M680I, M694V i V726A) vezuje za kaspazu-1, ali je ova interakcija značajno slabija u odnosu na nativni pirinski molekul (102). Takođe, u kristalnom modelu strukture interakcije pirina sa kaspazom-1, mutacije M680I i M694V su lokalizovane tačno na mestima vezivanja ova dva molekula. Ovo ide u prilog inhibitornoj ulozi pirina na produkciju IL-1 β , gde u slučaju

mutacija dolazi do nekontrolisane aktivacije kaspaze-1 i povećane sekrecije IL-1 β . *MEFV* mutacije imaju manji inhibitoryni efekat na kaspazu-1 i moguće je da su selektovane tokom humane evolucije zbog intenzivnijeg odgovora urođenog imunskog sistema (13).

U monocitima osoba sa mutacijama u B30.2 domenu, više od 70% pirina je fragmentisano (u "isečenoj" formi), dok je celi molekul pirina dominantan u ćelijama osoba bez mutacija. Povećana senzitivnost pirina, sa mutacijama u B30.2 domenu, za presecanje kaspazom-1 objašnjava se razlikom u vezivanju i stepenom inhibitorynog efekta mutiranog pirina na kaspazu-1 (30, 48) ili mogućom konformacionom promenom mutiranog pirina koja ih čini osetljivijim na dejstvo kaspaze (13). Međutim, izgleda da je i afinitet za presecanje kaspazom zavisian od tipa ćelije, te je tako utvrđeno da je celi molekul pirina zastupljeniji u granulocitima osoba sa mutacijama nego kod osoba bez mutacija (7).

Ekspresija *MEFV* gena zavisi od više nivoa regulacije i nosioci mutacija mogu imati povećane, smanjene ili nepromenjene nivoe ekspresije *MEFV* gena (7, 103). Takođe, leukociti sa mutacijama *MEFV* gena imaju izmenjeni proces apoptoze, sa produženjem njihovog života kao jednim od mogućih patogenetskih mehanizama AIB. Naime, mutacije ili polimorfizmi u genima koji kodiraju TNF receptor i pirin superfamiliju molekula mogu dovesti do produženja života leukocita koji bi u normalnim uslovima podlegli apoptozi, čime se stvaraju uslovi za umnožavanje i pojačavanje relativno slabih inflamatornih stimulusa (2).

Nasuprot ovim pretpostavkama, pokazano je da je apoptoza neutrofila i monocita kod FMF bolesnika značajno povećana tokom napada u odnosu na period remisije bolesti i zdrave osobe, dok apoptoza limfocita nije značajno promenjena. Pretpostavlja se da je u pitanju fiziološki odgovor na veliki broj inflamatornih ćelija, kojim se i objašnjava samoograničavajuća priroda same bolesti (104).

Bez obzira na tačan mehanizam dejstva, konačni efekat mutacija na funkciju pirina je izmena u sekreciji IL-1 β . Utvrđeno je da makrofagi, diferentovani iz monocita krvi bolesnika *in vitro*, sekretuju značajno veće količine IL-1 β nakon stimulacije LPS-om i ATP-om. Značajno veća sekrecija IL-1 β je utvrđena kod FMF bolesnika sa različitim homozigotnim, ali i heterozigotnim mutacijama *MEFV* gena (10).

Kod bolesnika sa kriopirin udruženim febrilnim sindromom (CAPS) (AIB sa mutacijama gena za NLRP3) postoji mnogo brža kinetika sekrecije IL-1 β , sa značajnom ulogom u razvoju zapaljenja. U normalnim uslovima slabi stimulus monocita će indukovati slabi inflamatorni odgovor, jer su mehanizmi koji ograničavaju zapaljenje (sekrecija IL-1R antagonista) potpuno funkcionalni u trenutku dostizanja maksimuma sekrecije IL-1 β (60). Za razliku od toga, isti slabi stimulus bi pokrenuo značajan inflamatorni odgovor i kliničke

manifestacije zapaljenja kod CAPS bolesnika. Tada bi količina sekretovanog IL-1 β odmah nakon stimulacije bila veća i brža, odnosno mnogo pre nego što bi antizapaljenski mehanizmi bili pokrenuti. Jedna od pretpostavki hroničnih epizoda zapaljenja kod CAPS je da su ona posledica ponovnih i burnih odgovora na slabe stimulse koji ne bi doveli do inflamacije kod zdravih osoba (70).

Najveći broj *MEFV* mutacija prisutan je kod bolesnika sa klinički dijagnostikovanom FMF, koja čini veliki udeo monogenских AIB. FMF se smatra mendelskom recesivno-naslednom bolesti. Klinički se odlikuje naizgled spontaninim napadima povišene temperature, peritonitisom, artralgiama, mijalgijom, erizipeloidnom ospom i dr. Klinička slika dosta varira ali su povišena temperatura i serozitisi najučestalije manifestacije. Glavni zdravstveni rizik ovih osoba je razvoj bubrežne amiloidoze zbog taloženja serumskog amiloid A proteina (SAA), koja vodi bubrežnoj insuficijenciji (3, 105).

Postoje bolesnici sa amiloidozom kao prvom i jedinom manifestacijom bolesti, ali je ovakva klinička slika retka i naziva se fenotip II bolesti (3). Prema pojedinim autorima postoji i fenotip III, koji se odnosi na osobe bez manifestacija bolesti ali koje imaju dve *MEFV* mutacije. Utvrđeno je da ove osobe imaju češće epizode febrilnosti u odnosu na osobe bez mutacija. Mora se naglasiti da navedena zapažanja važe za populacije sa visokom prevalencom FMF (97).

Mutacije *MEFV* gena su utvrđene i u većem broju drugih AIB kao i u bolestima gde imunski sistem igra patogenetsku ulogu, kao što su: *Behcetova* bolest (BD), purpura *Henoch-Schonlein* (HSP), poliarteritis nodoza, inflamatorne bolesti creva (ulcerativni kolitis i *Crohnova* bolest), multipla skleroza (MS) i druge (106-112).

Poznato je da *MEFV* mutacije promovišu inflamaciju posebno u korist razvoja teškog vaskulitisa (113). Prevalenca mutacije dva alela *MEFV* gena je viša kod dece sa HSP (9%) u odnosu na opštu populaciju u Turskoj. Međutim, mutacije nisu uticale na kliničku prezentaciju, s obzirom da se nisu razlikovale u odnosu na decu sa HSP bez mutacija (114).

U studiji Ozcakar-a i sar. (115) trećina bolesnika sa HSP iz Turske imala je heterozigotne mutacije *MEFV* gena koje su predstavljale važni faktor podložnosti razvoja ove bolesti i uticale su na kliničku prezentaciju. Nasuprot tome, *MEFV* mutacije nisu bile značajno više zastupljene kod dece sa HSP u Sloveniji, niti su ove mutacije uticale na kliničku prezentaciju bolesti (116).

Mutacije *MEFV* i *NOD2* gena su češće kod bolesnika sa inflamatornom bolešću creva (IBD). U studiji Akyuz-a i sar. (109) frekvenca mutacija *MEFV* gena je bila značajno viša

kod IBD bolesnika (25,5%) u odnosu na zdrave kontrole (9,9%) u Turskoj. Pretpostavlja se da su mutacije u ovoj studiji predisponirajući faktor za IBD u populaciji sa visokom stopom nosioca mutacija, kao i da genom osoba u ovoj regiji pogoduje njihovom ispoljavanju.

Mutacije *MEFV* gena su identifikovane kod 35,2% bolesnika sa ulcerativnim kolitisom u studiji Yildirim-a i sar. (117), od čega je 31,5% imalo heterozigotnu mutaciju (E148Q 11,1%, M694V 5,6%, V726A 5,6%, K695R 1,8%, M680I 1,8%). U studiji Giaglis i sar. (111) takođe je postojala povećana incidenca *MEFV* mutacija kod bolesnika sa ulcerativnim kolitisom u Grčkoj i one su imale modifikujući efekat na patološki proces, pre svega njegove ekstraintestinalne manifestacije, odnosno pojavu artritisa.

I u drugim inflamatornim bolestima, npr. tuberkulozi i BD, obično se otkriva pojedinačna ili složeni heterozigotni oblik mutacija, a opisano je nekoliko porodica sa naizgled dominantnom šemom nasleđivanja bolesti (118, 119).

Frekvencija *MEFV* mutacija u BD iznosi do 30-40,5% bolesnika u zavisnosti od studije (119-121). Prisustvo *MEFV* mutacija je češće kod BD bolesnika nego zdravih kontrola, a određene mutacije predominiraju (M694V 2,6%, V726A 2,6% i E148Q 5,2%). Takođe, P706 polimorfizam je češći kod BD bolesnika u odnosu na zdrave osobe (10,5% vs. 1,6%). Zbog svega toga se smatra da neke mutacije *MEFV* gena predstavljaju dodatni faktor rizika i učestvuju u patogenezi BD (110, 119).

Veća stopa nosioca *MEFV* mutacija utvrđena je kod osoba sa različitim reumatskim bolestima, uključujući seronegativnu spondiloartropatiju i neke forme juvenilnog idiopatskog artritisa (JIA). U populacijama gde je FMF retka, određeni polimorfizmi *MEFV* gena su povezani sa teškim inflamatornim komplikacijama artritisa. Pretpostavlja se da polimorfizmi povećavaju aktivnost urođenog imuniteta koji je prethodno aktiviran određenim faktorom spoljašnje sredine (108). Relativno viša stopa *MEFV* mutacija je utvrđena i kod bolesnika sa ankilozantnim spondilitisom (AS). Mutacije su pozitivno udružene sa predispozicijom za razvoj ove bolesti, posebno M694V mutacija (122). U studiji Tunca i sar. (123) je kod osobe sa homozigotnom M694V mutacijom opisan aksijalni deformitet sa ankilozantnim spondilitisom, bez prisutnog HLA-B27 lokusa i drugim inflamatornim manifestacijama, a daljim ispitivanjem je utvrđena i blaga proteinurija i amiloidoza. Ovaj bolesnik se može smatrati primerom takozvanog fenotipa II FMF bolesti. Visoka prevalenca *MEFV* mutacija (12,3%) je otkrivena kod bolesnika sa palindromnim reumatizmom negativnim na anticitrulinska antitela. I ovde se pretpostavlja da mutacije stvaraju predispoziciju i učestvuju u patogenezi nediferentovanih inflamatornih reumatskih poremećaja (124).

U studiji Feng i sar. (125) retke mutacije *MEFV* gena (E148Q, A289V, I591T, K695R, A744S) su detektovane kod 15% bolesnika sa fibromijalgijom, raspoređenih u 10 specifičnih retkih haplotipova. Utvrđeno je da su mutacije udružene sa povećanim rizikom od pojave ove bolesti, međutim zahtevaju dodatne faktore da bi se bolest razvila. Bolesnici sa fibromijalgijom su imali značano više nivoe plazmatskog IL-1 β ($p=0,019$), kao i hemokina MIP-1 α (makrofagni inflamatorni protein) uključenog u migraciju i aktivaciju monocita, u odnosu na druge bolesnike sa fibromijalgijom kao i kontrole (125).

Takođe, prisustvo *MEFV* mutacija je utvrđeno kod bolesnika sa sistemskim eritemskim lupusom (SLE) (15,7%). I ovde su mutacije imale modifikujući efekat na fenotip bolesti u smislu značano češće pojave inflamatornih manifestacija, ali i znatno ređeg zahvatanja bubrega bolešću (126).

Uloga *MEFV* mutacija u patogenezi svih navedenih bolesti za sada nije potpuno definisana, ali je utvrđeno da one predisponiraju proinflamatorno stanje i da mogu biti doprinoseći faktori za teži oblik razvoja reumatskih bolesti (86, 106-108).

Slično tome, mutacije koje se smatraju odgovorne za nastanak periodičnog sindroma udruženog sa tumor nekrozis faktor receptorom (TRAPS) se mogu javiti udruženo sa MS, panikulitisom i vaskulitisom, dok klinička slika može ličiti na JIA što stvara dijagnostički problem (6).

Određene varijante *MEFV* gena, pre svih E148Q-L110P i P369S-R408Q, su udružene sa razvojem sindroma periodične groznice, afte, faringitis i cervikalni adenitis (PFAPA) i mogu uticati na fenotip bolesti. Međutim, za razliku od drugih prethodno navedenih poremećaja, smatra se da je u ovom slučaju *MEFV* modifikujući gen koji ublažava simptome PFAPA sindroma (99, 127).

Fenotip atipične AIB može biti uslovljen sinergističnim efektom promena dva različita gena udružena sa autoinflamacijom. Tako na primer, postoji značana asocijacija promena gena za IL23R i TLR4 i *Behcetove* bolesti, kao i prisustva *MEFV* mutacija, koje predstavljaju povećani rizik za nastanak ove bolesti. Promene u genima za TLR4 i pirin upućuju na ulogu urođenog imunskog sistema i mehanizme prepoznavanja bakterija u patogenezi BD (128).

Pored atipične ili „preklapajuće“ kliničke slike dve AIB može se desiti da jedna osoba boluje od dve AIB. U studiji Livneh i sar. (109) ispitivane su osobe sa FMF i BD. Utvrđeno je da su svi bolesnici imali heterozigotnu *MEFV* mutaciju i zaključeno je da BD može indukovati razvoj FMF kod nosioca mutacija. Pretpostavlja se da do ovoga dolazi zbog povećane potrebe za pirinom u aktiviranim granulocitima BD, ali da istovremeno postoji

smanjenje funkcionalnog pirina zbog mutacija, te dolazi do gubitka kontrole inflamatornog procesa. Smatra se i da je BD jedan od mnogih faktora koji mogu pokrenuti tipičnu autoinflamatornu kliničku sliku FMF kod heterozigotnih nosioca *MEFV* mutacija.

Tipične kliničke manifestacije AIB kod bolesnika sa mutacijama *MEFV* gena su praćene povišenim vrednostima reaktanata akutne faze zapaljenja i oksidativnim stresom (13, 129-131). Tokom akutnog napada postoji izraženi zapaljenski odgovor organizma sa leukocitozom, ubrzanom sedimentacijom eritrocita i povišenim vrednostima C-reaktivnog proteina (CRP), fibrinogena, haptoglobina, SAA i C3 i C4 komponenti komplementa (16, 45). U određenim studijama otkrivena je smanjena aktivnost inhibitora C5a komponente komplementa. Analize urina su obično uredne, a ako je prisutna proteinurija treba proveriti mogućnost razvoja renalne amiloidoze (132, 133). Tokom febrilnog napada postoji prekomerna produkcija neutrofila i kontinuirani influks polimorfonukleara u tkiva. Kao odgovor na ove promene biološke membrane indukuju produkciju citokina (IL-1 i TNF), dok je aktivnost interferona smanjena. Istovremeno lipidna peroksidacija (LP) indukuje fosfolipazu A2 koja menja funkcije receptora na ćelijskoj membrani (134-137).

Visoka sedimentacija eritrocita nađena kod FMF pacijenata tokom perioda remisije bolesti se objašnjava prisustvom kontinuirane subkliničke inflamacije. Prema određenim istraživanjima do 25% FMF bolesnika ima subkliničku inflamaciju između dva napada bolesti (5, 87, 107, 138). Inače subklinička inflamacija je značajan faktor rizika za razvoj reaktivne sistemske amiloidoze AA, komplikacije povezane sa povećanim mortalitetom kod mnogih bolesnika (38).

Prezentacija i težina AIB pre svega variraju u zavisnosti od tipa mutacije i genotipa *MEFV* gena. Teški oblik i tok FMF koreliše sa homozigotnom M694V mutacijom koja ima jako visoku penetrantnost (99%) i karakteriše se ranim početkom, češćim napadima inflamacije i zahvatanjem više zglobova, kao i potrebom za višim terapijskim koncentracijama kolhicina (3, 84). Nasuprot tome, E148Q i V726A imaju redukovanu penetrantnost, pa su generalno simptomi bolesti kod ovih bolesnika blaži (10, 13).

Pored tipa mutacije, smatra se da je dozno-zavisni efekat mutacija jedan od uzroka postojanja različitih fenotipova (10, 45, 139). Različito ispoljavanje kliničkih manifestacija u prisustvu istih mutacija *MEFV* gena kod različitih osoba, kao i bolest kod heterozigotnih osoba, dovela je do preispitivanja uloge i značaja samih mutacija i genotipova *MEFV* gena. Razlike koje postoje u ispoljavanju bolesti govore u prilog dozno-zavisnom efektu ovih

mutacija, pre nego gubitka funkcije pirina, što se očekuje u recesivnim bolestima (10, 13, 102, 140, 141).

Mutacije oba alela *MEFV* gena su otkrivene u samo dve trećine klinički klasične forme FMF (105). Prisustvo pojedinačne (heterozigotne) mutacije *MEFV* gena kod FMF bolesnika se kreće od 1-40%, uprkos sekvenciranju čitavog gena, kao i ispitivanju nekoliko drugih poznatih autoinflamatornih gena (10, 118, 140, 142, 143).

Većina bolesnika sa heterozigotnom mutacijom ima tipične karakteristike blage autoinflamacije, dok ponekad mogu imati bolest „nalik“ FMF (118, 140, 144). Ovo pokazuje da se autoinflamacija može prezentovati kao dominantno stanje sa varijabilnom ekspresivnošću. Međutim, nepoznato je zbog čega subklinička inflamacija kod nekih heterozigota prelazi u izraženu AIB (118, 142). Moguća je uloga modifikujućih gena i njihov efekat dominantne modifikacije, koji podrazumeva semidominantno ispoljavanje heterozigotnog genotipa kod osoba sa pogodnim genskim sklopom (145).

U prilog dominantnog efekta mutacija pirina govore i studije na animalnim modelima. U njima je pokazano da gubitak funkcije pirina ne dovodi do proinflamatornog fenotipa. Dok miševi sa dve mutirane kopije gena pokazuju brojne inflamatorne manifestacije, a težina bolesti zavisi od količine produkovanog mutiranog proteina (10, 38).

U određenom procentu (oko 34%) prisustvo *MEFV* mutacija nije prisutno kod FMF bolesnika. Tako, čak do 59% FMF bolesnika arapskog porekla i 30% bolesnika turskog porekla ima normalnu sekvencu *MEFV* gena (13, 146).

Slični nedostatak mutacija kao „osnove“ bolesti je zabeležen i u drugim monogenskim AIB. Tako 25% bolesnika sa hiperimunoglobulinemijom D nema pozitivan genetski test na mutacije gena za mevalonat kinazu, kao i čak 50% bolesnika sa CINCA sindromom (neonatalna multisistemska bolest i hronični infantilni neurološki, kutani i artikularni sindrom) (147).

S druge strane i zdrave osobe mogu biti nosioci mutacija *MEFV* gena (106-108, 148). U studiji Yigit i sar. (143) 68% rođaka FMF bolesnika je imalo jednu mutaciju dok je 15,8% imalo dve *MEFV* mutacije, od toga je 6% bilo apsolutno asimptomatsko. Ovakav genotip odgovara ranije navedenom fenotipu III i posebno je izražen kod Aškenazi Jevreja (1:300) i pokazuje da većina osoba sa mutacijama u ovoj populaciji ostaje bez kliničkih manifestacija bolesti (97).

Razlog različitog ispoljavanja mutacija je nepoznat, a sumnja se na mutacije drugih gena ili promotornog regiona *MEFV* gena. Takođe, ne kodirajući regioni - introni još uvek

nisu potpuno analizirani (13, 105). Razlog može donekle biti i testiranje *MEFV* mutacija kod osoba koje imaju autoinflamatorne simptome ali se radi o nekom drugom poremećaju urođenog imuniteta (149). Pored toga, pretpostavlja se da uticaj na fenotip imaju za sada nepoznati modifikujući geni ili faktori spoljašnje sredine, koji bi uticali na penetrantnost i ekspresivnost postojećih mutacija. Poznato je da fenotip mendelski naslednih osobina može varirati u zavisnosti od tipa alela, uticaja faktora spoljašnje sredine i modifikujućih gena. Efekti modifikujućih geni su veoma česti kod ljudi i mogu uticati na penetrantnost, ekspresivnost, dominantnu modifikaciju i plejotropnost drugih gena (118, 142, 145).

U kompleksnim alelima *MEFV* gena jedna mutacija može imati modifikujući efekat na drugu. Tako, E148Q koja ima redukovanu penetrantnost kada se nalazi u složenom alelu sa V726A dovodi do značajnog porasta rizika za razvoj amiloidoze (150). Utvrđeno je da modifikujući efekat ima i gen A za glavni kompleks histokompatibilnosti klase I (MICA). U slučaju nasleđivanja varijante MICA A9 zajedno sa M694V mutacijom dolazi do razvoja bolesti u ranijem uzrastu, dok je prisustvo MICA A4 udruženo sa blažim oblikom bolesti (151).

Istraživači Shohat i sar. (152) su otkrili povezanost HLA-DR4 alela i FMF. Tokom napada bolesti ekspresija HLA-DR gena raste i viša je u odnosu na zdrave kontrole (152, 153). Takođe, postoji veza između mutacije M694V i HLA-DR3, DR11/5, DR13/6, DQ6/1, DQ7/3, DQ8/3, kao i M680I i HLA-DR7 i DQ2, V726A sa HLA-DQ6/1 (154).

Pretpostavlja se da nastanak renalne amiloidoze kod osoba sa mutacijama *MEFV* gena zavisi od prisustva modifikujućih gena, pre svega polimorfizma gena za serumski amiloid A protein. Genotip alfa/alfa SAA1 gena je udružen sa teškim fenotipom bolesti i razvojem amiloidoze bubrega (123, 151, 155). Pored SAA gena, sa nastankom amiloidoze značajno i nezavisno su povezani: muški pol, M694V homozigotnost i napadi artritisa (156).

1.3. Značaj R202Q polimorfizma *MEFV* gena u zapaljenju

R202Q (c.605G>A) *missense* promena u egzonu 2 *MEFV* gena prvi put je identifikovana od strane istraživača Bernot i sar. (94) 1998. godine. U početku se smatralo da predstavlja benigni polimorfizam, zbog visoke prevalencije R202Q u heterozigotnom obliku kod zdravih osoba. Za razliku od toga, učestalost R202Q homozigota je mala i vrlo retko se identifikuje. Zbog navedene razlike između zastupljenosti heterozigotnog i homozigotnog genotipa R202Q postoji pretpostavka o još neutvrđenoj favorizovanosti R202Q heterozigota (92, 157, 158). Na osnovu slabe konzervacije ove promene tokom evolucije, smatra se da R202Q alteracija predstavlja relativno novo nastali polimorfizam (5).

Međutim, rezultati istraživanja *MEFV* gena su otkrili da R202Q promene postoje u homozigotnom obliku ili složenom heterozigotnom obliku sa mutacijama tipičnim za FMF i to bez drugih promena *MEFV* gena (92, 158).

R202Q označava da je došlo do supstitucije arginina sa glutaminom, odnosno bazne aminokiseline sa pozitivno naelektrisanim bočnim lancem sa neutralnom aminokiselinom. Utvrđeno je da R202Q uzrokuje elektrohemijske promene egzona 2 *MEFV* gena koje su uporedive sa promenama izazvanim E148Q mutacijom, što sugeriše na slični efekat ove dve promene i dovodi u pitanje benignost R202Q polimorfizma (159).

Naime, Naimushin i sar. (159) su proučavajući elektrohemijsku i trodimenzionu strukturu *MEFV* gena, sa normalnom sekvencom i različitim mutacijama, utvrdili da E148Q mutacija uzrokuje smanjenje energije veza sa devijacionim indeksom od 1,15% u odnosu na *wild* tip gena. V726A stvara devijaciju od 0,41% dok je devijacija R202Q promene 2,59%. Ako se uzme u obzir da mutacije koje su udružene sa težim oblikom autoinflamacije stvaraju veću devijaciju energije u molekulu, npr. M694V od 4,64%, može se reći da R202Q promena stvara veće promene u molekulu pirina u odnosu na E148Q, pa i V726A mutaciju.

Ispitivanja nivoa ekspresije pirina sa različitim genskim promenama pokazala su da najniža ekspresija gena postoji kod homozigota za M694V mutaciju (vrednosti 0,53). Slično tome i bolesnici sa homozigotnom R202Q promenom su imali nisku ekspresiju pirina (0,63). Za razliku od navedenog, heterozigotna R202Q promena je bila udružena sa povišenim nivoima informacione RNK pirina u ćelijama (vrednosti 1,23), kao i heterozigotna E148Q mutacija kod bolesnika. Istraživači su zaključili da je moguće da postoji proteinska nestabilnost pirina kod heterozigota koja podstiče transkripciju negativnom povratnom spregom (160).

U prvim istraživanjima vezanim za R202Q polimorfizam utvrđeno je da kada ova promena postoji udruženo sa još nekom mutacijom u *MEFV* genu, dolazi do ispoljavanja AIB. Odnosno, prema određenim autorima prisustvo R202Q polimorfizma je u gametskoj neravnoteži (eng. *linkage disequilibrium*) sa M694V mutacijom i stvara predispoziciju za razvoj autoinflamatornih sindroma (6).

U studiji Ozturk i sar. (161) dokazano je da R202Q utiče na pojavu kliničkih simptoma kada se nalazi u složenom heterozigotnom obliku sa mutacijama koje najčešće dovode do razvoja bolesti (pre svega M694V). U studiji Shinawi i sar. (162) R202Q homozigoti nisu identifikovani u kontrolnoj grupi ispitanika (n=121) dok je postojala visoka frekvenca R202Q heterozigota. Pokazano je i da se klinička slika FMF ispoljava ako se ova promena nalazi u složenom heterozigotnom stanju sa mutacijom koja „izaziva“ bolest.

Međutim, u drugim studijama, kao što je Akar i sar. (157), R202Q polimorfizam nije bio u gametskoj neravnoteži sa M694V kod FMF bolesnika i zaključeno je da i samostalno može predstavljati predispoziciju za razvoj AIB kod nekih osoba (157, 163).

FMF bolesnici sa homozigotnom R202Q imaju blagi oblik bolesti, najmanji broj febrilnih epizoda godišnje i dobar odgovor na standardnu terapiju kolhicinom. Međutim i kod njih je zabeležen razvoj amiloidoze nakon određenog trajanja bolesti (92, 157, 158). Prema istraživanju Giaglis-a i sar. (92), R202Q homozigotnost se može smatrati odgovornom za AIB u grčkoj populaciji. U ovom istraživanju homozigoti za R202Q alteraciju su identifikovani kod 9,2% FMF bolesnika sa tipičnim fenotipom, kao i kod 0,7% zdravih kontrola ($p < 0.001$). Heterozigotna R202Q alteracija je bila prisutna kod 31,6% FMF bolesnika i 33,6% zdravih kontrola.

Takođe, u studiji Giaglis-a i sar. (92) utvrđeno je da je penetrantnost R202Q homozigotne promene jako visoka (92,3%), s obzirom da je samo jedan homozigot pronađen u grupi zdravih kontrola. Relativno odsustvo R202Q homozigota kod zdravih osoba reflektuje potencijalni dozno-zavisni efekat povezan sa razvojem bolesti.

Zbog navedenih efekata R202Q promene u homozigotnom i heterozigotnom stanju može se pretpostaviti da i u ovom slučaju postoji dozno-zavisni efekat promena koji je dovoljan da modifikuje urođeni imunski odgovor i stvori kod zdravih osoba predispoziciju za lakši nastanak febrilnosti i drugih manifestacija zapaljenja (92, 157, 158).

1.4. Oksidativni stres i značaj promena sekvence *MEFV* gena

Oksidativni stres predstavlja gubitak ravnoteže između stvaranja reaktivnih molekulskih vrsta i kapaciteta antioksidativnih odbrambenih mehanizama organizma u korist prooksidanata. Slobodni radikali su atomi, joni ili molekuli koji sadrže barem jedan nesporeni elektron u spoljašnjoj orbitali i mogu postojati samostalno. Nesporeni elektron stvara veliku reaktivnost ovih vrsta u smislu njihovog afiniteta da doniraju ili prime drugi elektron da bi postigle stabilnost. U RVK spadaju superoksid anjon (O_2^-), hidroksil ($HO\bullet$), peroksil ($RO_2\bullet$), alkoksil ($RO\bullet$), hidroperoksil ($HO_2\bullet$) radikal, ali i neradikali - jedinjenja koja imaju karakter slobodnih radikala iako to po hemijskoj strukturi nisu, gde spadaju: vodonik peroksid (H_2O_2), hipohlorna kiselina ($HOCl$), ozon (O_3), singletni kiseonik (1O_2) (164-166).

Reaktivne vrste kiseonika imaju korisni efekat kada su prisutne u niskim ili srednjim koncentracijama u ćeliji i podrazumevaju fiziološke procese, kao što je odgovor ćelije na smanjenje koncentracije kiseonika ili indukcija mitogenog odgovora. Utvrđeno je da se inicijacija i normalna funkcija više signalnih intraćelijskih puteva oslanja na aktivnost RVK kao signalnih molekula, odnosno sekundarnih glasnika (167).

Štetni efekat slobodnih radikala nastaje kada postoji prekomerna produkcija RVK i/ili reaktivnih vrsta azota (RVA) (azot monoksid, peroksinitritni anjon i dr) s jedne strane ili deficijencija enzima i neenzimskog antioksidativnog sistema s druge strane, što rezultuje oštećenjima tkiva. Preterana produkcija RVK najčešće nastaje putem prekomerne stimulacije NADPH oksidaze citokinima, putem mitohondrijalnog elektron transportnog lanca ili ksantin oksidaze. RVK mogu reagovati sa ključnim ćelijskim strukturama i molekulima čime menjaju njihovu biološku funkciju. U patološkim uslovima, abnormalno velike koncentracije RVK /RVA mogu voditi trajnim promenama u signalnoj transdukciji i genskoj ekspresiji, što se događa u različitim bolestima. Posledice povećanja RVK uključuju smanjenje količine ATP-a i NADP-a, oštećenje DNK, promene stabilnosti proteina i destrukciju membrana putem lipidne peroksidacije i oslobađanja proinflamatornih citokina (167-171).

Prisustvo oksidativnog stresa detektuje se kroz smanjenu aktivnost antioksidativne zaštite i povišene koncentracije produkata oksidativne modifikacije molekula (lipidna peroksidacija, uznapredovali oksidativni produkti proteina i oksidativno oštećenje DNK) (130 172, 173).

Lipidna peroksidacija i oštećenje DNK kao posledica RVK mogu voditi ka mutagenezi, karcinogenezi i ćelijskoj smrti (174). Prevelika produkcija RVK i/ili RVA

doprinosu procesu starenja i razvoju različitih patoloških procesa tipičnih za kancer, dijabetes, ishemijsko-reperfuzionu povredu, neurodegenerativne, virusne, toksične, inflamatorne i druge bolesti (167). Oksidativni stres i imbalance antioksidativnih enzima je opisan u mnogim patološkim stanjima, kao na primer hroničnoj granulomatoznoj bolesti, *Downovom* sindromu, hepatitisu, reumatoidnom artritisu (RA), pneumoniji, katarakti, HIV i influenza infekcijama i dr (175).

Najvažniji prooksidativni molekuli su singletni kiseonik, superoksidni anjoni, hidrogen peroksid i hidroksilni radikali (170, 171).

Superoksidni anjon (O_2^-) se produkuje u ćelijama različitim procesima, uključujući mitohondrijalni elektron-transportni lanac, ksantin oksidazu, ciklooksigenazu, monoamin oksidazu, NADPH oksidazu i dr. Superoksidni anjon nastao iz metaboličkih procesa ili „aktivacijom” kiseonika radijacijom se smatra primarnim RVK. On može dalje reagovati sa drugim molekulima i stvoriti sekundarne RVK i to direktnom reakcijom ili putem enzimskih procesa i procesa katalizovanih jonima metala (167, 168, 176).

Hidrogen peroksid nastaje dizmutacijom superoksidnih radikala. Postoje enzimi koji direktno ili indirektno produkuju H_2O_2 (poliamin oksidaza). H_2O_2 može izazvati oštećenje ćelije pri relativno niskim koncentracijama ($10\mu M$), a štetni efekti se dele na one izazvane direktnim dejstvom, zbog njegovih oksidativnih karakteristika, i indirektnim gde služi kao izvor reaktivnijih vrsta, kao što su $OH\cdot$ ili $HClO\cdot$. U reakciji sa jonima metala može dovesti do formiranja visoko reaktivnih hidroksilnih radikala. Neke od posledica štetnih efekata H_2O_2 su degradacija hem proteina, oslobađanje molekula gvožđa, inaktivacija enzima, oksidacija DNK, lipida, SH grupa i keto-kiselina (164, 177).

Oštećenje lipida nastalo slobodnim radikalima naziva se **lipidna peroksidacija** i prolazi kroz 3 faze: inicijaciju, propagaciju i terminaciju. U inicijalnoj fazi radikal izdvaja H^+ atom iz metilenske grupe lipida u α -položaju od mesta dvogube veze polinezasićene masne kiseline. Nastali alkil-radikal zadržava 1 elektron i stabilizuje se rearanžiranjem molekularne strukture formiranjem konjugovanog diena. Ako je kiseonik prisutan u dovoljnoj količini konjugovani dien reaguje sa njim i formira peroksi radikal ($ROO\cdot$) tokom faze propagacije. $ROO\cdot$ radikali su sposobni da sami izdvoje vodonik iz susednih molekula masnih kiselina, što pokreće isti krug reakcija. $ROO\cdot$ može podleći dekompoziciji u aldehid ili formirati ciklični endoperoksid, izoprotane i hidrokarbonate. Pokrenute reakcije se mogu prekinuti sjedinjavanjem dva radikala u neradikalni proizvod (52, 178).

Inicijacija lipidne peroksidacije dovodi do lančane reakcije koja može rezultovati peroksidacijom svih nezasićenih masnih kiselina u membrani ćelije te se smatra autokatalitičkim procesom sa najčešće ireverzibilnim posledicama (52, 178).

Pokazano je da hidroperoksilni radikali iniciraju peroksidaciju masnih kiselina putem dva paralelna mehanizma: hidroperoksid-masnih kiselina zavisnim i nezavisnim putem. Pretpostavlja se da je hidroperoksid-masnih kiselina zavisni mehanizam odgovoran za pokretanje lipidne peroksidacije *in vivo*. Kada se formiraju, ROO• se mogu rearanžirati ciklizacijom do endoperoksida (prekursora malonaldehida) sa krajnjim produktom malonaldehidom (MDA). MDA je glavni oksidativni degradacioni produkt nezasićenih masnih kiselina ćelijskih membrana i biološki je visoko reaktivan, odnosno i sam se ubraja u RVK (179). Molekuli MDA reaguju sa slobodnim SH i NH₂ grupama aminokiselina dovodeći do modifikacije proteina, nukleotida i fosfolipida što menja njihova funkcionalna svojstva. Takođe, ovo je mutageni molekul u bakterijskim i životinjskim ćelijama i kancerogen kod pacova, verovatno zbog stvaranja DNK adukta sa citozinom, adeninom i guaninom (167, 178).

Nusprodukti lipidne peroksidacije izazivaju ozbiljne promene u strukturnoj organizaciji i funkcijama ćelijske membrane, uključujući smanjenje fluidnosti membrane, povećanje permeabilnosti, inaktivaciju enzima vezanih za membranu i gubitak esencijalnih masnih kiselina. U slučaju oštećenja ćelija inflamacijom produkti lipidne peroksidacije difunduju iz ognjišta zapaljenja u krv (180, 181).

Jednostavnost, dostupnost i laki postupak izolacije čini membrane eritrocita odličnim modelom za istraživanje ćelijskih membrana. Eritrociti i eritrocitne membrane su veoma podložni lipidnoj peroksidaciji zbog stalne izloženosti visokom pritisku kiseonika i bogatstvom polinezasićenih masnih kiselina. Takođe, eritrociti imaju veliki broj različitih mehanizama odbrane od potencijalne RVK lipidne peroksidacije, koji se sastoje iz enzimskih i neenzimskih antioksidanata (52, 182).

Proteini mogu pretrpeti razne promene nakon interakcije sa RVK - peroksidacija, oštećenje specifičnih aminokiselinskih rezidua, promene u terciarnoj strukturi, degradacija i fragmentacija. Posledice ovih oštećenja su gubitak enzimske aktivnosti, promene u energetske produkciji i disregulacija membranskih potencijala ćelije, promene tipa i nivoa intraćelijskih proteina i drugo (52).

Bočni lanci svih aminokiselina proteina su podložni oksidativnom dejstvu RVK/RVA, posebno cistein i metionin. Oksidacija cisteina dovodi do reverzibilnog formiranja mešovite disulfida između proteina sa tiolnim grupama (-SH) i nisko molekularnim tiolima, pre svega

GSH (S-glutationa). Merenje koncentracija karbonilnih i tiolnih grupa služi kao mera RVK posredovane oksidacije proteina (167).

U oštećenja proteina nastala dejstvom RVK spadaju i oksidacija tirozinskih rezidua koja dovodi do formiranja ditirozina, agregacije, unakrsnog vezivanja i fragmentacije proteina. Prisustvo ovakvih proteinskih produkata oštećenja *in vivo* prvi put je utvrđeno i opisano kod oksidativnog stresa izazvanog dijalizom, i nazvani su - uznapredovali oksidativni produkti proteina (eng. *advanced oxidation protein products* - AOPP) (183).

Oksidativno izmenjeni proteini su substrat za proteolitičku razgradnju, što doprinosi održavanju redoks homeostaze u ćeliji. Oksidativnim modifikacijama proteina povećava se podložnost proteolitičkoj razgradnji, koja se uglavnom sprovodi preko proteazoma (184).

Antioksidativni enzimski sistem ćelijske odbrane je najvažniji odbrambeni mehanizam protiv RVK. Enzimski antioksidantna odbrana podrazumeva superoksid dizmutazu (SOD), katalazu (KAT) i glutation peroksidazu (GPx). Dok u neenzimske antioksidante spadaju askorbinska kiselina (vitamin C), alfa tokoferol (vitamin E), glutation (GSH), karotenoidi, flavonidi i drugi antioksidanti (167, 173).

Superoksid dizmutaza (EC 1.15.1.1) katalizuje dizmutaciju superoksidnog anjona u kiseonik i vodonik peroksid zbog čega je esencijalni enzim za brzo uklanjanje superoksidnih radikala u neutralnoj sredini. Postoje tri izoenzima SOD: citoplazmatski (CuZn-SOD ili SOD1), mitohondrijalni (Mn-SOD ili SOD2) i ekstracelularni (EC-SOD ili SOD3) izoenzim. SOD1 je dimer, dok su druge dve SOD tetrameri (185, 186).

SOD1 je prva okarakterisana izoforma enzima i nalazi se u citozolu praktično svih eukariotskih ćelija. SOD2 se inicijalno sintetiše sa vodećim (ledernim) peptidom koji je usmerava isključivo u mitohondrijalni prostor, dok je SOD3 najkasnije opisana izoforma primarno detektovana u plazmi, limfi, peritonealnoj i cerebrospinalnoj tečnosti (186, 187). Glavni SOD izoenzim u plazmi je CuZn-ekstracelularna SOD (EC-SOD). Nju pretežno sekretuju endotelne ćelije krvnih sudova. Aktivirani leukociti proizvode visoke nivoe superoksidnog anjona, dok je EC-SOD glavni enzimski "čistač" RVK u ekstraćelijskom matriksu (188, 189).

Katalaza (EC 1.11.1.6) je enzim široko zastupljen u svim tkivima čoveka. To je tetramerni protein sa četiri ferihemoproteidne grupe po molekulu. Glavna funkcija katalaze je dekompozicija hidrogen peroksida na vodu i kiseonik. Katalaza je odgovorna za razgradnju H_2O_2 u usovima oksidativnog stresa, odnosno tek pri visokim koncentracijama supstrata, dok je glutation peroksidaza glavni enzim za razgradnju manjih koncentracija H_2O_2 . U malim

koncentracijama H_2O_2 ima ulogu ćelijskog glasnika signalnih puteva i učestvuje u značajnim ćelijskim procesima (degradaciji proteina i apoptozi). Katalaza ima ta svojstva da efikasno eliminiše toksične koncentracije H_2O_2 bez narušavanja njegovih niskih, fizioloških koncentracija (167, 190).

Aktivnost katalaze je različita od tkiva do tkiva. Najveća aktivnost je zabeležena u jetri i bubrezima, dok je najmanja u vezivnom tkivu (190). U ćelijama se katalaza nalazi najviše u peroksizomima, slobodna i vezana za membrane, gde pomaže u smanjenju oksidativnog oštećenja ćelija katalizacijom peroksidnog substrata. Eritrociti poseduju visoku aktivnost ovog enzima, a oko 98% ukupne koncentracije enzima se nalazi u citozolu. Ovaj preventivni enzimski antioksidant ima ključnu ulogu u zaštiti eritrocita protiv oksidativnog stresa i H_2O_2 posredovane lipidne peroksidacije (167, 178, 191, 192).

Potencijalni izvori slobodnih radikala su mnogobrojni, odnosno to mogu biti aktivirane inflamatorne ćelije, hipoksantin-ksantin oksidazni sistem, oštećeni elektron-transportni sistem mitohondrija, peroksizomi, citohrom P-450, metabolizam arahidonske kiseline putem lipooksigenaznog puta ili vaskularne endotelne ćelije (185, 193, 194).

Inflamatorni odgovor u odbrani organizma je neophodan i koristan sve dok ne postane previše destruktivan ili dugotrajan. Fagocitni leukociti doživljavaju oksidativnu eksploziju nakon adekvatne stimulacije egzogenim ili endogenim faktorima. Oksidativna eksplozija se karakteriše masivnom produkcijom RVK u inflamatornoj sredini i igra ključnu ulogu u fiziološkoj odbrani protiv spoljašnjih patogena (167, 185, 193, 195).

Tokom oksidativne eksplozije fagociti povećano troše kiseonik, produkuju O_2^- i H_2O_2 , a povećana je i aktivnost heksozo-monofosfatnog šanta. Svi navedeni procesi zavise od aktivnosti multikomponentnog enzimskog sistema NADPH oksidaze, koji ima značajnu ulogu u funkciji fagocita u akutnim i hroničnim zapaljenskim reakcijama. Potrošnja kiseonika se povećava i do 20 puta sa stvaranjem RVK, pri čemu se više od 90% kiseonika transformiše u O_2^- radikal (185, 196). Koncentracija H_2O_2 pod tim uslovima može dostići vrednost od 10-100 μM . Hidrogen peroksid i O_2^- su komponente kiseonik zavisnog antimikrobnog sistema fagocitnih leukocita. Posebni citotoksični efekat obe komponente je njihova sposobnost da reaguju sa produktima drugih antimikrobnih sistemima i stvore dodatne RVK ($OH\cdot$, 1O_2 , O_3). Superoksid može reagovati sa hipohlornom kiselinom ili NO i stvoriti $OH\cdot$ (169, 197, 198).

Dugo vremena se smatralo da NADPH oksidaza postoji samo u profesionalnim fagocitima, međutim nakon otkrića šest homologa ovog enzima sada se govori o NOX familiji NADPH oksidaza prisutnim i u drugim tipovima ćelija. NOX2 tip oksidaze je

specifičan za fagocite. Ovi transmembranski proteini ("redoks lanci") funkcionišu tako što transportuju elektrone preko bioloških membrana, pri čemu je NADPH donor elektrona, na citozolnoj strani membrane, a akceptor elektrona je kiseonik, sa spoljašnje strane membrane, dok je krajnji produkt ovog transporta - superoksid. U nestimulisanim fagocitima NOX2 se nalazi u membranama intracelularnih vezikula koje se po stimulaciji spajaju sa membranom ćelije ili sa fagozomima (194).

Zbog toksičnosti svojih proizvoda regulacija aktivacije NADPH oksidaze je strogo kontrolisana i limitirana. Ona je neaktivna u nestimulisanim ćelijama ali se rapidno aktivira nakon stimulacije fagocita. U fiziološke stimuluse koji aktiviraju NADPH oksidazu se ubrajaju fagocitovane partikule (bakterije, gljivice), molekuli koji indukuju hemotaksu, bioaktivni lipidi i antitela (193).

Oksidanti produkovani putem NADPH oksidaze imaju ključnu ulogu u regulaciji inflamacije i imunske odbrane organizma. Međutim i sama NADPH oksidaza limitira inflamaciju modulacijom redoks senzitivnih puteva u urođenom imunskom odgovoru. Naime, ona, pored ostalog, aktivira Nrf-2 transkripcioni faktor, ključni regulator redoks senzitivnog antiinflamatornog odgovora, koji potom inhibira NF- κ B i time koči inflamaciju (199).

Hipohlorna kiselina (HOCl) i azot monoksid (NO \bullet) se stvaraju u fagocitima dejstvom mijeloperoksidaze i azot monoksid sintaze (193). Fagociti poseduju mijelo-peroksidaza-H₂O₂-halogeni sistem kojim se mogu stvoriti visoko reaktivni toksični produkti. Najznačajniji produkt je hipohlorna kiselina koja dalje u interakciji sa RVK stvara OH \bullet , singletni kiseonik ili monohloramin anjon radikal sa izraženim baktericidnim svojstvima (200).

Povećani oksidativni stres učestvuje u patogenezi velikog broja bolesti (kancer, dijabetes, inflamatorne bolesti creva, neurodegenerativne bolesti i dr). RVK učestvuju u patogenezi nekih reumatoloških stanja kao što je RA, BD, SLE i druge (167, 195).

Ranije je objašnjeno da su sekrecija zrele forme IL-1 β , produkcija RVK i antioksidantni odgovor ćelija urođenog imunskog sistema usko povezani, pa se može pretpostaviti da će disregulacija nekog od ovih činilaca remetiti i ostale procese. RVK bilo da potiču od NADPH oksidaze ili stresa mitohondrija neizostavno utiču na NLRP3 inflamazom, odnosno povećanje njihove koncentracije pozitivno utiče na ekspresiju komponenti inflamazoma.

U stanju mirovanja monocita, redoks homeostaza se održava niskom koncentracijom RVK i niskom ekspresijom komponenti antioksidantnih sistema. Ova homeostaza omogućava efikasnu promenu redoks stanja nakon stimulacije TLR receptora, kada dolazi do povećane produkcije RVK praćene povećanim adaptivnim antioksidantnim odgovorom radi naknadnog

uspostavljanja homeostaze. U normalnim uslovima produkcija RVK nakon stimulacije monocita sa blago odloženim antioksidantnim odgovorom stvaraju redukovanu sredinu koja je neophodna za sklapanje inflamazoma i njegovu optimalnu funkciju (68, 69).

U istraživanju povezanosti redoks balansa i IL-1 β sekrecije u studiji Tassi i sar. (70) utvrđena je mnogo brža sekrecija IL-1 β iz monocita CAPS bolesnika i to zbog ubrzane kinetike ovog procesa, koja je nastala promenom redoks stanja monocita, kao i redoks odgovora nakon stimulacije TLR receptora. Naime, nestimulisani monociti CAPS bolesnika su pod blagim oksidativnim stresom, sa stalno povišenim intracelularnim vrednostima RVK kao i stimulisanim antioksidantnim sistemom. Nestimulisani CAPS monociti proizvode značajno više vrednosti RVK od monocita zdravih osoba. Ovakvo redoks stanje dovodi do promena u odgovoru na stimulaciju ćelija. Redoks odgovor nakon stimulacije je ubrzan sa ranim stvaranjem redukovanog stanja koje pogoduje obradi i sekreciji IL-1 β , koja se ubrzava, ali i brzo dostiže plato sekrecije pa dolazi do iscrpljenja procesa (68, 70).

Takođe, u nestimulisanim CAPS monocitima antioksidativni odgovor je povišen, a nakon stimulacije ćelija dolazi do potpuno obratnih procesa u odnosu na zdrave monocite. Odnosno, smanjuje se ekspresija Trx i xCT (subjedinice Xc transportera, koji učestvuje u internalizaciji cistina), a redukovani cistein se manje sekretuje. Oksidativni stres prisutan u nestimulisanim CAPS monocitima je verovatno odgovoran za povećani antioksidativni odgovor koji teži da povрати redoks homeostazu. Kada dođe do stimulacije ćelija novim oksidativnim događajem već utrošeni antioksidativni sistem nije u mogućnosti da se održi i dolazi do njegovog iscrpljivanja i to ranije nego što bi se desilo u zdravim monocitima (70).

Slično studiji kinetike IL-1 β CAPS bolesnika, u studiji Omenetti i sar. (12) ispitivano je da li postoji ubrzana sekrecija IL-1 β zavisna od NLRP3 inflamazoma kod FMF bolesnika i nosioca *MEFV* mutacija, i da li ona zavisi od tipa mutacije. Stimulisani monociti bolesnika su pojačano oslobađali IL-1 β u odnosu na zdrave osobe, postojala je korelacija sa brojem i penetrantnošću *MEFV* mutacija, a proces je bio zavistan od funkcije NLRP3 inflamazoma. Takođe, *MEFV* monociti su proizveli više RVK. Ali za razliku od CAPS monocita nije bilo promena u antioksidantnom odgovoru, kao i deficitarne produkcije IL-1Ra. Odnosno, ove ćelije su mogle efikasno da ograniče oksidativni stres i očuvaju normalnu produkciju IL-1R što je mogući razlog spontanog limitiranja inflamacije kod ovih osoba.

Monociti i neutrofili TRAPS bolesnika imaju više bazalne nivoe RVK od ćelija zdravih osoba i ove povišene koncentracije RVK učestvuju u povećanju sekrecije proinflamatornih citokina i povećanju aktivnosti MAPK (38).

Takođe, utvrđeno je da mehanizmi brze sekrecije IL-1 β i iscrpljivanja antioksidantnog odgovora nisu prisutni kod sJIA bolesnika iako i kod njih postoji hronična inflamacija. Postojeći redoks imbalance je zanemarljiv, odnosno, kod njih nije zapažena značajna promena kinetike sekrecije IL-1 β niti antioksidativnog odgovora (70).

Poremećeni redoks balans ćelije može nekontrolisano aktivirati redoks-senzitivni proinflamatorni faktor NF- κ B, čime se nastavlja produkcija RVK i RVA i produžava inflamacija. Istovremeno prekomerni RVK oštećuju leukocite tako što reaguju sa biomolekulima ćelije i putem iskorišćavanja enzimskih i neenzimskih antioksidanata. Pored toga, granulocitnom nekrozom se oslobađaju reaktivne molekulske vrste i aktiviraju tkivni makrofagi što dalje održava produkciju proinflamatornih citokina (195, 173).

U hroničnim inflamatornim bolestima tokom vremena dolazi do postepenog nagomilavanja RVK, koji zbog istovremeno postepenog slabljenja antioksidativne odbrane dovode do promena redoks balansa (173, 195, 201).

Prema pojedinim autorima oksidativni stres u AIB učestvuje u samoj patogenezi bolesti, posebno kada je reč o mehanizmu masivnog infliksa neutrofila u različita tkiva tokom akutne faze bolesti. Neutrofili bolesnika sa mutacijama *MEFV* gena proizvode velike količine RVK radikala (posebno O $_2^-$) bez ikakve stimulacije. Uz to i sam IL-1 β može indukovati aktivaciju fagocitne NADPH oksidaze. RVK indukuju hemokine odgovorne za privlačenje granulocita i monocita na mesta povrede tkiva ili infekcije, a imaju i ulogu regulacije produkcije IL-1 β kroz aktivaciju inflamazoma (202-204).

Prevelika produkcija RVK od strane polimorfonukleara postoji kod BD bolesnika. Pretpostavlja se da je pored infiltracije i aktivacije fagocita povećanje RVK odgovorno za oštećenje endotela kod ovih osoba, kao i da je ono značajnije od oštećenja koje nastaje posredstvom lizozomalnih enzima fagocita (66).

Kod FMF bolesnika povećana je fagocitna aktivnost polimorfonukleara i monocita, kao i produkcija RVK putem oksidativne eksplozije u periodu napada bolesti. Spontana produkcija O $_2^-$ je veća kod FMF bolesnika nego zdravih osoba i postoji pozitivna korelacija između produkcije superoksida i klastogenih faktora. Prevelika produkcija RVK vodi povećanju nivoa LP, odnosno MDA, menja strukturu i odnos polinezasićenih masnih kiselina i dovodi do gubitka fluidnosti bioloških membrana (172, 205). Klastogeni faktori izazivaju promene ili prekide hromozoma i potenciraju procese mutageneze, a mogu dodatno promovisati generisanje superoksida i tako stvoriti prooksidantno stanje (169).

U istraživanju Sahin-a i sar. (173) vrednosti serumske i polimorfonuklearne LP, kao i MDA, bile su povišene u aktivnoj fazi FMF u odnosu na zdrave osobe, dok su serumske

koncentracije vitamina E i b-karotena bile snižene. Proteinske karbonilne grupe su generalno povišene, dok su aktivnosti GPx, KAT i SOD1 značajno snižene. Postoji pozitivna korelacija između MDA, karbonilnih grupa i reaktanata akutne faze zapaljenja (CRP-a) (130, 205). Parametri oksidativnog stresa se uglavnom vraćaju u normalni opseg vrednosti tokom remisije bolesti, međutim kod nekih bolesnika su i u remisiji bolesti utvrđeni povišeni parametri inflamacije u krvi i oksidativni stres (131, 172).

1.5. Autoinflamatorne bolesti

Autoinflamatorne bolesti predstavljaju relativno novu kategoriju bolesti koje se karakterišu naizgled spontanom epizodama inflamacije, odnosno povišene temperature i lokalizovanog i/ili generalizovanog zapaljenja. Epizode zapaljenja nastaju u odsustvu specifičnog infektivnog patogena i autoimunskog odgovora, odnosno u njima ne postoji visoki titar autoantitela, antigen specifične T ćelije niti udruženost sa klasom II MHC haplotipova. Autoinflamatorne bolesti su posledica disregulacije urođenog imunskog sistema. U njima dolazi do poremećaja funkcije i neadekvatne aktivacije fagocita, pre svega monocita i neutrofila, što predstavlja važnu razliku u odnosu na autoimunske bolesti u kojima su limfociti glavne efektorne ćelije (13, 16, 39, 45, 55). Genetski poremećaji urođenog imuniteta se nalaze na jednom kraju kontinuumu imunoloških poremećaja, dok se na suprotnom nalaze poremećaji stečenog imuniteta. Termin "autoinflamatorne bolesti" prvi put je počeo da se upotrebljava 1999. godine nakon utvrđivanja specifičnih kliničko-patoloških karakteristika AIB (38, 83).

Zapaljenje je stereotipni fiziološki mehanizam odbrane organizma i koordinisan imunski odgovor koji najčešće pokreću štetni stimuli nastali tokom infekcija ili nakon oštećenja tkiva. Urođeni imunski sistem igra osnovnu ulogu u inicijalnom odgovoru organizma na veliki broj mikroorganizama i drugih faktora spoljašnje sredine, kao i endogenih oštećenja ćelija. Usmeren je na eliminaciju patogena i procese popravke oštećenog tkiva radi uspostavljanja homeostaze. Glavni akteri inflamacije su ćelije urođenog imunskog sistema, koje imaju veliki broj receptora za strane molekulske supstance ili izmanjene endogene molekule u situacijama ćelijskog oštećenja ili stresa. Akutna zapaljenska reakcija je normalno samoograničena i brzo se stišava zahvaljujući uticaju mehanizama negativne povratne sprege (sekrecija anti-inflamatornih citokina, aktivacija regulatornih ćelija, inhibicija proinflamatornih signalnih kaskada i dr) (195).

Genetski poremećaji u regulaciji urođenog imunskog sistema dovode do sistemskih AIB. U AIB je izmenjena funkcija proteina koji kontrolišu aktivaciju inflamazoma, NF- κ B, ćelijsku apoptozu, kao i kaskadnu signalizaciju i sekreciju ključnih inflamatornih citokina. Značajni patogenetski faktor u AIB predstavlja disregulacija signalnih puteva NOD-like receptora, poremećaj regulacije nespecifičnih medijatora inflamacije, odnosno citokina i komponenti komplementa (13, 16, 105).

Noviji patogenetski mehanizmi povezani sa patogeneom AIB uključuju greške u formiranju normalne konformacije proteina (misfolding), oksidativni stres i disfunkciju mitohondrija. Tako se prema molekulskim patogenetskim mehanizmima AIB mogu svrstati u šest kategorija: poremećaji aktivacije IL-1 β , sindromi aktivacije NF- κ B, poremećaji sa misfoldingom proteina, bolesti disregulacije komplemента, poremećaji signalizacije citokina i sindromi aktivacije makrofaga (38, 39).

Elementi kliničke slike AIB opisani su u zadnjih nekoliko dekada, dok je genetska osnova osam ovih poremećaja otkrivena između 1997. i 2002. godine. Zadnjih nekoliko godina došlo se do značajnih razjašnjenja vezanih za patofiziologiju ovih poremećaja, ali postoji još puno nerešenih pitanja. Epidemiološki podaci o AIB su dosta oskudni i generalno se smatraju retkim bolestima (45, 105, 147).

Primarno su se u AIB ubrajali samo retki nasledni periodični febrilni sindromi (genetski određene rekurentne spontane epizode febrilnosti sa intenzivnom inflamacijom pojedinih tkiva), dok se zadnjih godina koncept o autoinflamaciji proširio i prisutan je u sve većem broju poligenih/multifaktorijskih bolesti (45, 55).

Glavna podela AIB se zasniva na načinu nasleđivanja bolesti. U autozomno recesivne bolesti se ubrajaju: porodična ili familijarna mediteranska groznica (FMF) i dve bolesti sa insuficijencijom enzima mevalonat kinaze (MKD) (hiperimunoglobulinemija D i periodični febrilni sindrom (HIDS) i mevalonatna acidurija (MVA)).

Autozomno dominantne poremećaje predstavljaju periodični sindrom udružen sa tumor nekrozis faktor receptorom (TRAPS), piogeni artritis, pioderma gangrenozum i akne - sindrom (PAPA), familijarni sindrom autoinflamacije na hladnoću (FCAS), *Muckle-Wellsov* sindrom (MVS), neonatalna multisistemska bolest ili hronični infantilni neurološki, kutani i artikularni sindrom (CINCA), *Blauov* sindrom, kriopirin udruženi periodični sindromi (CAPS) i drugi (Tabela 1) (3, 105).

NLRP3 ili kriopirin inflamazom je obimno proučavan u AIB jer mutacije u genu koji kodira ovaj protein (*NLRP3 gen*) izazivaju tri različite dominantno nasledne AIB, nazvane kriopirinopatije: *Muckle-Wellsov* sindrom, FCAS i CINCA.

Kriopirinopatije se karakterišu rekurentnim epizodama povišene temperature, urtikarijalnom ospom, različitim stepenom artralgijske ili artritisa. Zapaljenje je posredovano neutrofilima i postoji jaki akutno-fazni odgovor organizma. Informatorni simptomi su izazvani konstitutivnom aktivacijom NLRP3 inflamazoma, a zbog mutacija koje pojačavaju funkciju kriopirina i posledično povećavaju produkciju IL-1 β . Blokada signalnih puteva IL-1 β rekombinantnim IL-1 receptor antagonistima značajno smanjuje simptome bolesti (13).

Tabela 1. Monogenske i multifaktorijalne autoinflamatorne bolesti

<i>Monogenske</i>	<i>Multifaktorijalne/Poligenske</i>
Blauov sindrom	Ankilozantni spondilitis
Familijarni sindrom autoinflamacije na hladnoću (FCAS) *	Behcetova bolest
Hiperimunoglobulinemija D i periodični febrilni sindrom (HIDS)**	Gaucherova bolest (nakupljanje metabolita) Hemofagocitna limfohistiocitoza
Mevalonatna acidurija (MVA)**	Hereditarni angioedem
Muckle-Wellsov sindrom (MWS)*	Hronični rekurentni multifokalni osteomijelitis (CRMO) ili Majeedov sindrom
Neonatalna multisistemska bolest i hronični infantilni neurološki, kutani i artikularni sindrom (CINCA)*	Idiopatska fibroza pluća Crohnova bolest
Periodični sindrom udružen sa tumor nekrozis faktor receptorom (TRAPS)	Periodična groznica, afte, faringitis i cervikalni adenitis sindrom (PFAPA)
Pirogeni artritis, pioderma gangrenozum i akne - sindrom (PAPA)	Psorijaza Reaktivni artritis
Porodična ili familijarna mediteranska groznica (FMF)	Pseudogiht, kristalne artropatije Uratno-kristalni artritis (giht)
Sindrom ciklične neutropenije i periodične groznice	Sistemski juvenilni idiopatski artritis (sJIA) Stillova bolest odraslih
	Sarkoidoza
	Tip 2 dijabetes melitus

* pripadaju kriopirin udruženim periodičnim sindromima (CAPS)

** pripadaju bolestima deficijencije mevalonat kinaze (MKD)

Smatra se da su mnoge autoimunske tj. multifaktorijalne bolesti autoinflamatorne prirode ili da bar imaju neku autoinflamatornu komponentu u svojoj patogenezi. U ovu grupu bolesti se ubrajaju PFAPA, sJIA, *Stillova* bolest odraslih, hronični rekurentni multifokalni osteomijelitis, *Behcetova* bolest, *Crohnova* bolest i druge (Tabela 1) (35, 39, 45, 105).

Koncept autoinflamacije se proširio i na one poremećaje gde se oslobađanje IL-1 pokreće neinfektivnim signalima, odnosno nekrozom ili metaboličkim stresom ćelija. Tu spadaju poremećaji i bolesti za koje se ranije smatralo da nisu inflamatorne kao na primer: giht, tip 2 dijabetes, koronarna arterijska bolest, gojaznost, određene degenerativne bolesti i dr. Metabolički supstrati koji se akumuliraju u određenim tkivima (monosodijum urat, amiloidni polipeptid, oksidisani LDL) mogu stimulisati NLRP3 inflamazom i oslobađanje IL-1 β . Tako na primer, kod tip 2 dijabetesa, koji je metabolički poremećaj ali i hronično inflamatorno stanje, akumulacija amiloidnog polipeptida pankreasnih ostrvca može dovesti do neadekvatne aktivacije NLRP3 inflamazoma i oslobađanja IL-1 β , sa ozbiljnim oštećenjem beta ćelija pankreasa (38, 39, 41).

Iako primarni autoinflamatorni poremećaji nisu česti, oni nisu odsutni u svakodnevnoj kliničkoj praksi. Usled sve veće dostupnosti genetskog testiranja, ove bolesti se ne smatraju više tako retkim i broj njihovih dijagnoza raste, dok se spektar kliničkih manifestacija širi. Početak bolesti je generalno vezan za dečiji uzrast i adolescenciju. Ne postoji značajna polna predominacija javljanja bolesti sem kod FMF gde postoji slaba predominacija javljanja kod muškaraca (35, 105, 168).

Ključni elementi periodičnih febrilnih sindroma su visoka telesna temperatura, kao glavni element bolesti, i postojanje epizoda bolesti, koje se ponavljaju nakon varijabilnog vremenskog intervala bez tegoba. U epizodama postoji karakterističan i predvidiv tok kliničkih manifestacija (isti skup simptoma), ali značajno je i odsustvo simptoma od strane respiratornog trakta (3).

Zbog genetske osnove AIB često se ispituje prisustvo istih ili sličnih tegoba u porodici. Porodična istorija podrazumeva ispitivanje zdravstvenog stanja najbližih članova porodice ili rođaka sa sličnim problemima, autoimunske ili AIB, ili pak amiloidozu.

Najčešći zajednički simptomi tokom napada AIB pored visoke temperature su: malaksalost, artritis ili artralgija, abdominalni bol i ospa. Često se u krvi registruje inflamatorna reakcija. Bolesnici su obično bez simptoma u remisiji, ali mogu imati subkliničku inflamaciju. Pacijenti su pod rizikom da razviju amiloidozu koja je glavna dugoročna posledica mnogih autoinflamatornih poremećaja (35, 45).

Povišena telesna temperatura je jedan od najčešćih kliničkih znakova u pedijatrijskoj praksi. U mnogim bolestima dečijeg uzrasta javlja se povišena temperatura. U prvim godinama života deca imaju oko 10 samoograničavajućih virusnih bolesti koje podrazumevaju i visoku telesnu temperaturu. Sindromi epizodične ili rekurentne groznice nisu tako retki u pedijatrijskoj praksi. Epizodična groznica nepoznatog uzroka traje nekoliko dana do nekoliko nedelja, nakon čega sledi mirni period bez povišene temperature uz osećaj potpunog blagostanja. Deca sa multiplim samoograničenim bolestima bez ozbiljnih ili neobičnih infekcija i sa dobrim razvojem i rastom ne bi trebalo da se testiraju na defekte imunskog odgovora ili kriptogene infekcije (206, 207).

U slučaju da poreklo groznice $\geq 38.0^{\circ}\text{C}$ ostane nepoznato i ako se dijagnoza ne postavi nakon nedelju dana intenzivnih pretraga (uključujući CT snimak abdomena), tada se ta groznica označava kao groznica nepoznatog uzroka (FUO – *fever of unknown origin*). Ona može postojati samostalno sa kontinuiranim trajanjem najmanje 3 nedelje. Rekurentno ili epizodično javljanje FUO podrazumeva tri ili više epizoda visoke temperature $\geq 38.0^{\circ}\text{C}$, koja traje od nekoliko dana do nekoliko nedelja, sa mirnim periodom između dve epizode bez povišene temperature i drugih tegoba (206, 207). Periodična groznica se definiše kao rekurentna epizoda bolesti u kojoj je povišena temperatura glavni element i uvek je praćena istim ili sličnim setom simptoma koji traju nekoliko dana ili nedelja. Nakon svake epizode bolesti sledi interval bez tegoba koji traje nekoliko nedelja ili meseci. Ponekad epizode imaju konstantnu periodičnost javljanja (3).

Sindromi periodičnih febrilnosti su diferencijalno dijagnostički problem i postavljanje prave dijagnoze je obično odloženo. Prema rezultatima različitih studija utvrđeno je da su infekcije najčešći uzrok FUO. Međutim, ne mali broj slučajeva čine neinfektivne FUO, gde se u sekundarne uzroke samostalne FUO ubrajaju inflamatorne, kolageno-vaskularne bolesti i maligniteti (102, 206, 208). Nakon infekcija, ostali uzroci epizodičnih FUO su nasledne AIB i ponekad autoimunske bolesti (102, 208).

U potencijalne uzroke nastanka rekurentne groznice spadaju infekcije urinarnog trakta, sinuzitisi i skrivene dentalne infekcije. Takođe, bitan podatak je i kontakt sa životinjama i putovanja, gde u diferencijalnu dijagnozu ulaze bruceloza, borelioza i malarija. Autoimunske bolesti (npr. SLE) i posebno AIB (inflamatorna bolest digestivnog trakta i sistemski JIA) se mogu manifestovati rekurentnom groznicom (45, 209).

Klinička slika može nagovestiti o kojoj je AIB reč međutim često postoje preklapanja u kliničkoj prezentaciji različitih bolesti (posebno HIDS, FMF i TRAPS) (105, 168). Takođe, postoje bolesnici sa sumnjom na AIB ali čije se tegobe ne mogu tačno pripisati određenoj

bolesti. Mnoge bolesti liče na AIB, zato su okultne ili rekurentne infekcije (česte virusne infekcije, malarija, bruceloza) važne u diferencijalnoj dijagnozi, kao i maligne bolesti i atipična prezentacija autoimunske bolesti. Moraju se uzeti u obzir i imunodeficijencije, kao što je ciklična neutropenija. U ovim slučajevima važno je dobro proceniti da li postoji izraženi inflamatorni odgovor tokom napada bolesti (206, 207).

U AIB postoji periodična aktivacija leukocita, makrofaga i dendritičnih ćelija koje intenzivno sekretuju limfokine i endogene pirogene citokine (IL-1 β , IL-6, TNF- α) (202). Najveći broj hroničnih inflamatornih bolesti se karakteriše velikom produkcijom citokina (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ), hemokina (IL-8, MCP-1), eikozanoida (PGE2, leukotrijena) i matriks metaloproteinaza. Povišene vrednosti ovih medijatora pojačavaju inflamatorni proces i doprinose destrukciji tkiva i naravno pojavi kliničkih simptoma bolesti. Pored citokina, aktivirani neutrofili i monociti produkuju značajne količine RVK i RVA molekula, koji takođe doprinose inflamaciji (54, 195).

1.5.1. Monogeneske autoinflamatorne bolesti

Veliki udeo AIB čine periodični febrilni sindromi, među kojima je jedan od najpoznatijih i najčešćih familijarna mediteranska groznica. FMF je prototip monogeneske recesivno nasledne AIB i smatra se da su mutacije u *MEFV* genu primarno odgovorne za njen nastanak. FMF je prva AIB kod koje je korišćenjem pozicionalnog kloniranja 1997. godine otkriven genski defekt u AIB (8, 16).

Porodična mediteranska groznica je najrasprostranjenija AIB i pretpostavlja se da oko 120,000 ljudi boluje od ove bolesti u svetu. Najčešća je u populacijama istočnog Mediterana, ali se u manjem procentu može sresti i u drugim etničkim grupama koje okružuju Mediteran. Bolest nije uobičajena u drugim populacijama, međutim prepoznavanje kliničkih manifestacija i patofiziologije postaje sve značajnije zbog emigracije ljudi iz istočno-mediteranskih zemalja (93, 210, 211).

Najčešće kliničke manifestacije FMF-a su samoograničeni rekurentni napadi povišene temperature preko 38.0°C kratkog trajanja (12-72h) i sterilni serozitisi (pre svega peritonitis, u 90% slučajeva). Od ostalih manifestacija često se javljaju sinovitis, mijalgija i erizipeloidna ospa. Akutni neerozivni artritis zahvata obično jedan ili nekoliko većih zglobova (koleno, kuk ili skočni zglob). U 25% pedijatrijskih bolesnika se sreće erizipeloidni eritem na donjim ekstremitetima često udružen sa artritismom (16, 45).

Iako određeni provokativni faktor početka akutne faze FMF nije očigledan, neki bolesnici početak napada povezuju sa fizičkim ili emocionalnim stresom. Napadi FMF-a se tokom godina proređuju, međutim ostaje opasnost od sistemske amiloidoze kao komplikacije bolesti (16, 45).

Tipični napad bolesti se sastoji u pojavi visoke temperature i serozitisa koji traje 1 do 4 dana. Ove osobe su zdrave između napada, nemaju karakteristične tegobe i osećaju se dobro. Učestalost napada može biti različita, od akutnog napada svake nedelje do jednom u svaka 3-4 meseca ili ređe. Težina i učestalost napada obično se proređuju sa starošću (3).

Abdominalni bol je prisutan kod 95% bolesnika i ima tipične karakteristike akutnog peritonitisa. Ovo je u skladu sa većom ekspresijom *MEFV* gena u seroznim i sinovijalnim fibroblastima. Neki bolesnici imaju opstipaciju, dok je kod dece češća dijareja. Abdominalni bol obično prethodi pojavi visoke temperature, a traje 1-2 dana duže od povišene temperature. Bol može biti lokalizovan i simulirati apendicitis ili holcistitis, ili ređe renalnu koliku ili akutnu pelvičnu inflamatornu bolest (3, 5, 10, 11).

Pleuritis sa tipičnim bolom u grudnom košu se javlja kod 25-80% slučajeva FMF i obično je jednostran, sa otežanim disanjem. Ponekad postoji prolazna efuzija kostofreničnog ugla, a kod približno 5% bolesnika predstavlja prvu manifestaciju bolesti (3, 105).

Akutni artritis je takođe čest, sa zahvatanjem jednog ili par većih zglobova (skočni zglob, koleno, kuk ili sakro-ilijačni zglob). Uglavnom se radi o monoartritisu ali može imati i druge forme: asimetrični, ne-destruktivni artritis, hronični destruktivni artritis, sa sakroilitisom i migratorni poliartritis koji liči na akutnu reumatsku groznicu (3, 105).

Erizipeloidni eritem tokom napada je prisutan kod oko 25% pedijatrijskih bolesnika (212). Poliarteritis nodoza i HSP su takođe udružene sa FMF (129).

Najvažnija komplikacija FMF-a je amiloidoza. Ona se javlja obično u bubrezima i može dovesti do bubrežne insuficijencije koja progredira do terminalne bubrežne slabosti. Amiloidoza takođe može ugroziti gastrointestinalni trakt, jetru, slezinu, srce i druge organe. Obično se razvija pre 40-te godine života kod ovih bolesnika. Tip amiloida je AA, što je tipično za sekundarnu formu amiloidoze. Terapija kolhicinom značajno smanjuje učestalost ove komplikacije (3).

Serumski amiloid A protein je prekursor amiloidnog depozita u FMF. Nivo SAA je jako povišen u napadu bolesti i obično se normalizuje u remisiji, međutim u značajnom broju osoba ovo se ne dešava (138). Ne postoji utvrđeni nivo SAA pri kome se ne bi razvila amiloidoza. Mutacije M694V i genotip SAA1 su faktori rizika za amiloidozu (156).

Interesantno je da i život u pojedinim zemlja predstavlja svojevrsni nezavisni faktor rizika, te je visoki rizik utvrđen za Jermeniju, Tursku i Arapske zemlje (213).

Hiperimunoglobulinemija D periodični febrilni sindrom (HIDS) je dobila ime po svojim najvažnijim karakteristikama - povišenim nivoima IgD antitela i periodičnoj groznici. Mevalonatna acidurija (MVA) je teži oblik bolesti od HIDS sa mentalnom retardacijom i deformitetima koji se javljaju udruženo sa simptomima HIDS-a. Obe bolesti su vrlo retke, a nastaju zbog defekta u enzimu mevalonat kinaze. Ovaj enzim konvertuje mevalonsku kiselinu u 5-fosfomevalonsku kiselinu koja je osnovni prekursor sterola (holesterola, steroidnih hormona, vitamina D, žučnih soli) i izoprenoidea (105, 147).

Defekt u mevalonat kinazi (MK) je uzrokovan mutacijom u genu za MK na hromozomu 12, koja dovodi do smanjenja aktivnosti ovog enzima. MK učestvuje u biosintetskom putu holesterola. Defekt u MK dovodi do nagomilavanja mevalonata u serumu i urinu. Obe bolesti karakterišu epizode povišene temperature i zapaljenja koje se ponavljaju na svakih 2-8 nedelja i traju par dana. Drugi prateći simptomi tokom napada su ospa, cervikalna limfadenopatija, artritis ili artralgiya, dijareja i abdominalni bol (214).

Međutim, oko 25% HIDS bolesnika sa tipičnim napadima i visokim serumskim IgD nivoom nemaju mutacije u MVK genu. Smatralo se da su visoki nivoi IgD (> 100 UI/ml) tokom napada visoke temperature glavna odlika HIDS iako je njihova specifičnost dosta niska, jer je utvrđeno da visoki nivoi IgD mogu postojati i u FMF i TRAPS bolesnika (215, 216).

Periodični sindrom udružen sa tumor nekrozis faktor receptorom (TRAPS) je izazvan mutacijama u genu za TNF receptor-1, odnosno genu – tumor nekrozis faktor receptor superfamilije 1A (*TNFRSF1A*) (79). TRAPS je poznat i pod nazivom Hibernijska groznica i prvi put je opisana 1982. godine. Ovo je najčešća autozomno dominantna nasledna AIB i do danas je otkriveno više od 40 različitih mutacija *TNFRSF1A* gena. Najčešće mutacije su R92Q i P46L koje imaju slabu penetrantnost što se vidi po njihovom prisustvu kod asimptomatskih rođaka TRAPS pacijenata. Mutacije u kojima postoji supstitucija cisteina dovode do teškog oblika bolesti i mogućnosti razvoja bubrežne amiloidoze (4, 147).

TNF membranski receptor (TNFR1) se sastoji od ekstracelularnog domena koji vezuje cirkulatorni TNF- α , transmembranskog domena i intracelularnog dela koji prenosi signal u unutrašnjost ćelije (217). Delimično objašnjenje posledica mutacije je da one stvaraju defekt u otpuštanju TNF receptora sa površine ćelija što smanjuje koncentraciju solubilnog TNF receptora u serumu (79). Prema drugoj teoriji postoji defekt u stvaranju odgovarajuće konformacije ekstracelularnog domena mutiranog TNF receptora-1

(misfolding) koji se zbog toga gomila u endoplazmatskom retikulumu i pokreće intracelularni zapaljenski odgovor (80).

TRAPS karakterišu epizode povišene temperature u trajanju dužem od nedelju dana, praćene abdominalnim bolom, artralgijom većih zglobova, migratornom mijalgijom, ospom, pleuritisom, glavoboljom, konjuktivitisom, periorbitalnim edemima i retko uveitisom ili episkleritisom (218). Klinički simptomi i težina bolesti su varijabilni. Akutne epizode se karakterišu značajnim povećanjem reaktanata akutne faze zapaljenja, neutrofilijom i različitim stepenom hipohromne anemije (105, 147, 219). Početak TRAPS u dečijem uzrastu može ličiti na JIA, a može postojati i udruženo sa MS, panikulitisom i vaskulitisom (220).

Kriopirin udruženi periodični sindromi su ranije smatrani za tri posebne bolesti: hronični infantilni neurološki, kutani i artikularni sindrom, *Muckle-Wellsov* sindrom i familijarni sindrom autoinflamacije na hladnoću. Međutim, danas se zna da sve tri bolesti nastaju kao posledica istih mutacija i da ustvari čine jedinstveni klinički kontinuum. U ovim bolestima postoje promene u proteinu kriopirinu izazvane mutacijama u genu nazvanom - *cold induced autoinflammatory syndrome 1* (CIAS1) na hromozomu 1 (105).

Kriopirin se dominantno eksprimira u neutrofilima, monocitima i hondrocitima. Zajedno sa ASC i kardinal proteinima, kriopirin formira kriopirinske inflamazome (NLRP3 inflamazome) (33, 34). Mutacije u genu za kriopirin dovode do pojačane aktivnosti NLRP3 inflamazoma, međutim precizan mehanizam poremećaja je nepoznat. Takođe, nemaju svi bolesnici sa kliničkom slikom CAPS mutacije u CIAS1 genu (čak do 40%), te se pretpostavlja postojanje mutacija u drugim genima (70).

Sva tri oblika bolesti imaju slične ili “preklapajuće” simptome koje čine povišena temperatura, urtikarijalna ospa, artritis ili artralgiya i akutna inflamatorna reakcija. FCAS je najblaži oblik bolesti, zatim sledi MVS i na kraju CINCA kao najteži oblik bolesti.

FCAS karakterišu napadi povišene temperature indukovani hladnoćom udruženi sa urtikarijalnom ospom, artralgijom i konjuktivitisom. MVS je prvi put opisan 1962. godine i podrazumeva akutne epizode povišene temperature, urtikarijalne ospe, malaksalosti, artritisa, konjuktivitisa i progresivnog senzoro-neuralnog gubitka sluha. CINCA pored epizoda povišene temperature prati i trijada kutanih, neuroloških i artikularnih simptoma (105).

CINCA predstavlja najteži fenotip bolesti i javlja se najčešće u neonatalnom periodu ili ranom detinjstvu sa urtikarijalnom ospom. Sindrom podrazumeva i simptome od strane CNS-a (aseptični hronični meningitis, progresivni gubitak sluha, hronične glavobolje, mentalnu retardaciju, epilepsiju), kao i okularne probleme: prednji uveitis, papilitis i atrofija

optičkog nerva. Međutim, samo 50% bolesnika ima pozitivan genetski test što upućuje da mnogi genetski lokusi nisu istraženi (218, 221, 222).

1.5.2. Poligenske/multifaktorijalne autoinflamatorne bolesti

Patogeneza multifaktorijalnih sistemskih AIB, tj. hroničnih zapaljenskih sindroma, još uvek nije dovoljno jasna. Autoinflamatorna komponenta je različito zastupljena u različitim bolestima. Klinički se karakterišu rekurentnim ili perzistentnim sistemskim inflamatornim epizodama koje se javljaju u odsustvu infektivne, neoplastične ili autoimunske etiologije.

PAPA sindrom je nasledna autozomno dominantna AIB u kojoj dominiraju piogeni artritis, pioderma gangrenozum i akne (13, 223). Bolest izazivaju mutacije gena za CD2-vezujući protein 1 (prolin-serin-treonin fosfataza interagujući protein 1 - PSTPIP1) na hromozomu 15 (224). Pirin se direktno vezuje za PSTPIP1, a fosforilacija PSTPIP1 povećava ovu interakciju. PAPA udružene mutacije povećavaju stepen fosforilacije i posledično povećavaju interakciju sa pirinom što rezultuje značajnim povećanjem produkcije IL-1 β . Međutim još uvek se ne zna tačno da li povećana interakcija suprimira ili potencira efekat pirina na kaspazu-1 (13).

Prva manifestacija bolesti se javlja u dečijem uzrastu i to je obično oligoartikularni piogeni artritis sa akumulacijom sterilnog, piogenog, neutrofilima bogatog materijala u zglobovima. Akne se razvijaju kasnije u pubertetu dok se piodermno-gangrenozne ulcerativne lezije ređe javljaju. U dodatne manifestacije spadaju sterilni apscesi i pancitopenija (2).

Uzrok PFAPA sindroma potpuno je nepoznat. Ne smatra se naslednom bolešću, ali u manjem broju slučajeva roditelji obolele osobe imaju slične simptome u detinjstvu. U PFAPA postoji disregulacija imunskog odgovora sa kontinuiranom aktivacijom proinflamatornih citokina (IL-1 β , IL-6, TNF α) i smanjenim antiinflamatornim odgovorom (IL-4) (225). Rekurentni febrilni napadi se javljaju u intervalima od 2-8 nedelja i traju oko 3-7 dana. Febrilnost je praćena faringitisom, cervikalnim adenitisom i/ili oralnim aftama. Inflamatorni parametri (CRP, SE i SAA) značajno rastu tokom napada i normalizuju se između napada. Simptomi bolesti obično nestaju posle nekoliko godina.

Sistemski JIA je jedan od subtipova JIA, odnosno čini 5-10% oblika JIA. To je najteži oblik bolesti i razlikuje se od ostalih subtipova JIA po odsustvu autoantitela. Dijagnoza se postavlja klinički i podrazumeva prisustvo artritisa sa svakodnevnim prisustvom povišene

temperature u trajanju najmanje 2 nedelje. Febrilnost često prati prolazna svetloružičasta ospa, generalizovana limfadenopatija, hepato-splenomegalija i serozitisi. Nedavno je otkriveno da su geni uključeni u obradu IL-1 β aktivirani u sJIA i učešće IL-1 u patogenezi sJIA govori u prilog da se radi o AIB, pre nego autoimunske bolesti. Takođe, postoje dobri terapijski rezultati nakon primene anakinra (IL-1R antagonista) kod ovih bolesnika. Naime, važna karakteristika autoimunskih JIA je brzi odgovor na anti-TNF- α terapiju, što pokazuje ulogu stečenog imunskog odgovora u stvaranju hronične inflamacije. Za razliku od toga, AIB odgovaraju na terapiju blokade IL-1 β (55, 226).

Inflamatorna bolest creva je kompleksna bolest u kojoj su genetski i faktori spoljašnje sredine bitni za patogenezu i najverovatnije je njihova interakcija presudna u određivanju fenotipa i progresiji bolesti (2). *Crohnova* bolest je inflamatorna bolest creva u kojoj postoji epizodično javljanje transmuralnog granulomatoznog zapaljenja creva. Ponekad je oboljenje praćeno artritismom i manifestacijama na koži. Bolest je udružena sa mutacijama u NOD2 receptorima. Ove mutacije se nalaze na drugoj lokaciji gena u odnosu na mutacije u Blau sindromu i udružene su sa gubitkom funkcije gena. Za sada postoje različita tumačenja značaja ovih mutacija za patogenezu bolesti (227, 228).

Crohnova bolest je jedna od prvih poligenijskih bolesti u kojoj je definisana autoinflamatorna komponenta. Metodama pozicionog kloniranja je otkriveno da su mutacije u *NOD2* genu povezane sa poremećajem intracelularnog odgovora urođenih imunskih ćelija, a *NOD2* je identifikovan kao prvi gen predispozicije za *Crohnovu* bolest. U studiji Lasage i sar. (229) 50% pacijenata sa *Crohnovom* bolešću je imalo bar jednu od 30 *NOD2* varijanti udruženih sa bolešću u *NOD2*-LRR domenu, dok je 17% pacijenata sa ranim početkom bolesti i težim fenotipom imalo duple mutacije, što podržava dozno-zavisni efekat gena u *Crohnovoj* bolesti i sugerise recesivni način nasleđivanja (227-229).

Behcetova bolest predstavlja hroničnu rekurentnu inflamatornu bolest koja se ubraja u autoinflamatorne sindrome (230). Bolest se najčešće sreće u populacijama oko takozvanog "puta svile" (azijske regije, od Kine do Mediterana). Klinički podrazumeva sistemski vaskulitis malih krvnih sudova i manifestuje se oralnim i genitalnim ulkusima, folikulitismom, eritemom nodosum i uveitisom. Mutacije u *MEFV* genu su nađene u visokom procentu u ovoj bolesti (110, 119), ali nema povećanog broja mutacija *MVK*, *CIAS1* ili *PSTPIP1* gena (5).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Ispitati prisustvo i distribuciju mutacija *MEFV* gena kod zdravih osoba u Srbiji.
2. Utvrditi učestalost ponovljenih febrilnosti i drugih kliničkih manifestacija zapaljenja kod nosioca mutacija *MEFV* gena i uporediti u odnosu na osobe bez *MEFV* mutacija.
3. Utvrditi prisustvo R202Q polimorfizma *MEFV* gena u populaciji Srbije i moguće kliničke manifestacije kod ovih osoba.
4. Utvrditi da li nosioci navedenih promena *MEFV* gena imaju izmenjene parametre oksidativnog stresa i da li postoji njihova povezanost sa mogućim kliničkim manifestacijama zapaljenja.

3. RADNA HIPOTEZA

Osnovna radna hipoteza istraživanja je:

Kod zdravih osoba u Srbiji postoje različite homozigotne i heterozigotne mutacije *MEFV* gena i ove osobe imaju češću pojavu epizoda povišene temperature i druge kliničke manifestacije zapaljenja.

Dve dopunske hipoteze istraživanja su:

1. Nosioci R202Q polimorfizma *MEFV* gena imaju češće epizode povišene temperature, kao i druge zapaljenske manifestacije, u odnosu na zdrave osobe bez R202Q promena.
2. Nosioci *MEFV* mutacija i R202Q polimorfizma imaju povišene parametre oksidativnog stresa, koji pozitivno korelišu sa prisutnim zapaljenskim manifestacijama.

4. MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA

Istraživanje je organizovano po modelu studije preseka u kombinaciji sa retrospektivnom analizom podataka. Istraživanje je sprovedeno u okviru projekta “Preventivni, terapijski i etički pristup prekliničkim i kliničkim istraživanjima gena i modulatora redoks ćelijske signalizacije u imunskom, inflamatornom i proliferativnom odgovoru ćelije“ Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja br. 41018 (Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja RS 2011-2014). Testiranje mutacija *MEFV* gena je urađeno u sklopu multinacionalnog Eurofever projekta (EAHC, Project No2007332).

Svi ispitanici su pre uključivanja u istraživanje bili informisani o ciljevima i dizajnu istraživanja. Za svakog maloletnog ispitanika je obezbeđena pisana saglasnost roditelja ili zakonskog zastupnika o učestvovanju u ovom istraživanju (Prilog 1). Pored toga, pisani pristanak je obezbeđen i od strane maloletnih ispitanika koji su stariji od 10 godina i koji su razumeli ciljeve i postupke istraživanja (Prilog 2).

Istraživanje je odobreno od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu (br. 01-7289-8 od 14.10.2011. godine) i sprovedeno je u skladu sa Helsinškom deklaracijom i smernicama dobre kliničke prakse.

Istraživanje je sprovedeno u sledećim ustanovama, tj. njihovim organizacionim jedinicama:

1. Klinici za dečije interne bolesti, Kliničkog centra u Nišu,
2. Naučnoistraživačkom centru za biomedicinu, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu,
3. Odeljenju za alergologiju, reumatologiju i kliničku imunologiju, Univerzitetske dečije bolnice u Ljubljani, Slovenija.

4.1. Ispitanici

U istraživanje je uključeno 100 zdravih ispitanika odraslih i dece (uzrasta 2-35 godina, oba pola).

Kriterijumi za uključenje u istraživanje bili su:

1. trenutno odsustvo akutnih bolesti kod ispitanika,
2. odsustvo hroničnih bolesti kod ispitanika,
3. odsustvo povišene temperature najmanje dve nedelje pre davanja uzorka krvi,

4. potpisani pristanak o učestvovanju u istraživanju i dobrovoljnom davanju uzorka pune krvi radi ispitivanja sekvence *MEFV* gena i parametara oksidativnog stresa (Prilog 1 i 2).

Uzorci krvi su uzimani tokom zdravstvenog pregleda, odnosno rutinskog laboratorijskog pregleda krvi i to po jedan uzorak pune venske krvi (3-4 ml) sa EDTA, punkcijom kubitalne vene.

4.1.1. Protokol istraživanja

Protokol istraživanja je podrazumevao:

- a) prikupljanje podataka ispitanika o njihovom zdravstvenom stanju primenom zvaničnog upitnika Eurofever projekta - Eurofever upitnik.
- b) uzimanje uzoraka krvi ispitanika i odvajanje DNK, plazme i eritrocita radi izvođenja, genetskih i biohemijskih analiza.

4.1.2. Metoda anketiranja

Radi prikupljanja podataka o zdravstvenom stanju ispitanika upotrebljena je metoda anketiranja, korišćenjem Eurofever upitnika.

Eurofever projekat je formiran od strane Radne grupe za AIB evropskog društva pedijatrijske reumatologije (*Paediatric Rheumatology European Society (PRES)*) i Internacionalne organizacije za projekte u pedijatrijskoj reumatologiji (*The Paediatric Rheumatology International Trials Organisation (PRINTO)*) i podržan je od strane Izvršne agencije za zdravlje i potrošače Evropske komisije (*Executive Agency for Health and Consumers - EAHC, Project No2007332*).

PRES je internacionalno naučno udruženje evropskih zdravstvenih radnika (kao i pridruženih članova van Evrope) koji se bave pedijatrijskom reumatologijom.

PRINTO je neprofitabilna internacionalna organizacija osnovana 1996. godine i danas uključuje preko 50 zemalja i preko 350 zdravstvenih centara u svetu. Cilj ove organizacije je da podrži, olakša i koordinira razvoj, sprovođenje, analizu i izveštavanje o rezultatima istraživanja multicentričnih međunarodnih studija o reumatološkim bolestima dece.

Glavni ciljevi Eurofever projekta su:

- poboljšanje poznavanja AIB, čime bi se ubrzalo njihovo prepoznavanje od strane pedijatarata i pedijatrijskih reumatologa,
- pružanje adekvatnih informacija porodici osobe koja boluje od AIB,

- povećanje znanja o kliničkoj prezentaciji, terapijskom odgovoru i komplikacijama ovih retkih bolesti.

Takođe, Eurofever projekat uključuje i sledeće aktivnosti:

- prikupljanje informacija o prevalenci dijagnostikovanih ili suspektnih AIB u evropskim pedijatrijskim centrima,
- stvaranje internacionalnog registra AIB,
- praćenje efikasnosti tretmana AIB,
- razmatranje mogućih budućih istraživanja terapije ovih bolesti i
- stvaranje informativnih internet prezentacija za bolesnike i lekare.

Detaljne informacije o Eurofever projektu mogu se naći na internet adresi:

<http://www.printo.it/eurofever/>

Eurofever upitnik je pre svega namenjen prepoznavanju autoinflamatornih sindroma i dizajniran je tako da detaljno evidentira sve informacije kliničkih manifestacija kod bolesnika sa genetski potvrđenom dijagnozom autoinflamatornog stanja ili osoba za koje se sumnja da imaju neku AIB na osnovu kliničke slike.

Upitnik se može naći na sledećim internet stranicama (citirano februara 2014):

http://fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/EUROTRAPS/intranet/doc/D2.1_appendix1.pdf

http://fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/EUROTRAPS/intranet/doc/D2.1_appendix2.pdf

Pored osnovnih demografskih podataka (datum rođenja, pol, uzrast/starost) upitnikom se detaljno prikupljaju podaci o sveukupnom zdravstvenom stanju osobe. Analiziraju se karakteristike povišene temperature (učestalost, trajanje, karakter, pokretači i drugo), sakupljaju podaci o konstitucionalnim simptomima (malaksalost, nesanica, gubitak težine, apetit i dr), muko-kutanim manifestacijama, muskulo-skeletnim tegobama, gastrointestinalnim simptomima, tegobama od strane limfnog i svih ostalih sistema organa. Takođe, beleže se podaci o ranijim laboratorijskim pregledima krvi (rutinski i specifični parametri krvi (antitela, HLA tipizacija, protrombinski markeri)), porodična anamneza, operacije (pre svega tonsilektomija i apendektomija), rezultati različitih vrsta snimanja i drugih dijagnostičkih procedura, kao i podaci o prethodnom korišćenju lekova.

Za potrebe ovog istraživanja Eurofever upitnik je preveden i delimično modifikovan (Prilog 3). Modifikacija se sastojala u isključivanju određenih delova upitnika i modifikaciji prikaza ostalih delova. Isključena poglavlja su bila: postavljena dijagnoza AIB, specifične genetske dijagnostičke analize AIB i praćenje bolesti. Ova poglavlja su isključena jer su naši ispitanici zdrave osobe. Takođe, u upitniku se nisu beležili nalazi laboratorijskog pregleda

krvi, urina i protrombinskih markera jer su ovi parametri rađeni rutinski ukoliko je postojala potreba.

Prikaz poglavlja o kliničkim manifestacijama sistema organa je izmenjen u smislu skraćenja forme teksta, odnosno nije se pojedinačno izjašnjavalo o svakoj navedenoj kliničkoj manifestaciji za dati sistem organa u upitniku, već su se beležile samo one koje su postojale anamnestički, dok su mogućnosti navedene u zagradi kao podsetnik (Prilog 3).

Neposredno po uzimanju podataka za upitnik ispitanicima je uzimana krv za izolaciju DNK, plazme i eritrocita, radi izvođenja genetskih i biohemijskih analiza. Za istraživanje se koristila puna krv, plazma, oprani eritrociti i lizat eritrocita ispitanika.

4.2. Metode

Za izolaciju DNK iz perifernih leukocita upotrebljeno je 200 μ l krvi. Izolacija DNK je urađena u Naučnoistraživačkom centru za biomedicinu, Medicinskog fakulteta u Nišu, upotrebom izolacionog kita - DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA). Ostatak krvi je upotrebljen za izdvajanje plazme i eritrocita, centrifugiranjem na 3000 obrtaja 15 minuta. Posle odvajanja plazme eritrociti su isprani tri puta sa po 3ml fiziološkog rastvora i centrifugiranjem na 3000 obrtaja po 15 minuta. 200 μ l opranih eritrocita je upotrebljeno za pravljenje lizata eritrocita sa ledenom dejonizovanom vodom, u odnosu 1:3, radi određivanja intracelularnih enzima oksidativnog stresa.

4.2.1. Izolacija DNK iz uzoraka pune krvi

DNK je izolovana iz 200 μ l pune krvi korišćenjem QIAamp DNA Mini kit-a (QIAGEN Inc. USA) prema protokolu proizvođača.

Nakon dodavanja 20 μ l QIAGEN proteaze (ili proteinaze K) u tubicu od 1,5 ml, dodaje se 200 μ l uzorka i 200 μ l AL pufera. Smeša se inkubira 10 minuta na 56°C. Zatim se doda 200 μ l etanola i sve prebaci u QIAamp Mini spin kolonu i centrifugira 1 minut na 8000 obrtaja. Kolone se prebace u čiste kolekcione tubice i doda 500 μ l AW1 pufera, pa se ponovo centrifugira na isti način. Postupak se ponovi ali se sada doda 500 μ l AW2 pufera i centrifugira 3 minuta na najvećoj brzini centrifuge. Koloni se na kraju doda 70 μ l AE pufera, inkubira 1 minut i centrifugira minut na 8000 obrtaja. Ovim postupkom se iz 200 μ l pune krvi dobije oko 6 μ l DNK. Izolovana DNK je zamrznuta na -20°C do daljeg postupka.

Koncentracija DNK (μ g/ml) u svakom uzorku je određivana spektrofotometrijski na aparatu „Beckman DU 530 UV vis spectrophotometer“ (GMI, Minnesota, USA).

4.2.2. PCR reakcija

Egzon 2 i egzon 10 *MEFV* su individualno umnoženi lančanom reakcijom polimeraze (PCR), korišćenjem Big Dye Terminator cycle sekvencionog kit-a (TaqMan™ PCR Core Reagent kit, Applied Biosystems, Norwalk, USA) (Tabela 2) i PCR aparata „Applied Biosystems GeneAmp PCR 9700” (PE Applied Biosystems, Norwalk, USA).

Tabela 2. PCR reagensi (volumen 25 µl)

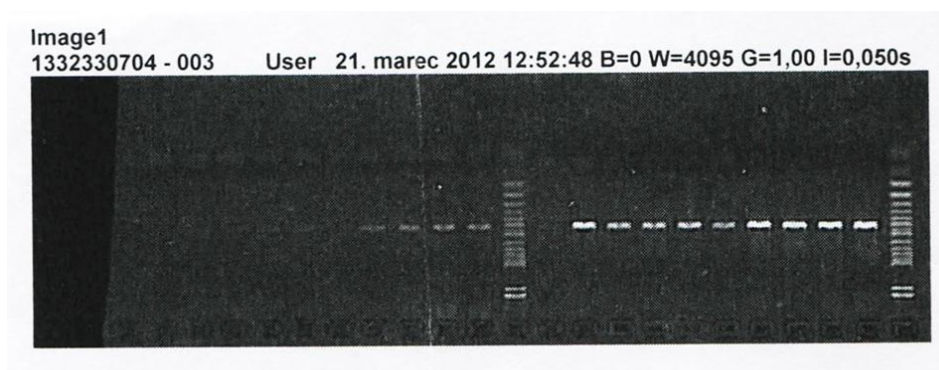
Egzon 2	Egzon 10
prajmeri: 1 µl 2DR	prajmeri: 1 µl 10F
1 µl 202R	1 µl 10R
1 µl DNK	1 µl DNK
1.8 µl MgCl ₂	1.8 µl MgCl ₂
2.5 µl dNTP	2.5 µl dNTP
2.5 µl 10*puferG	2.5 µl 10*puferR
3.4 µl DMSO	0.15 µl Taq-R polimeraza
0.15 µl Taq-G polimeraza	15.35 µl ddH ₂ O
11.65 µl ddH ₂ O	

Pre PCR procedure koncentracija DNK je preračunata tako da svaki uzorak sadrži oko 50 µg/mL DNK. Egzon 2 je umnožen korišćenjem prajmera: *forward* 5'-AAAACGGCACAGATGATTCCG-3' i *reverse* 5'-AAGGGCCTGCACTCCTTC-3'; dok su za egzon 10 upotrebljeni sledeći prajmeri: *forward* 5'-AGCAGGAAGAGAGATGCAGTG-3' i *reverse* 5'-TTGGAGACAAGACAGCATGG-3'. PCR reagensi i program su predstavljeni u Tabelama 2 i 3.

Po završetku PCR-a prisustvo željenog produkta je provereno elektroforezom na 2% agaroznom gelu. PCR egzona 2 ima 360 bp, a egzona 10 ima 400 bp. 6µl uzorka sa 8µl boje SYBR®Safe DNA Gel Stain (Life technologies, Carlsbad CA, USA) je pomešano i elektroforetski razdvojeno (90V, 30 minuta). Prisustvo produkta je određivano preko automatskog *Gel imaging* sistema za fluorescencu i hemilumiscencu (Gel imaging for fluorescence applications G:BOX F3) i upoređivano sa standardom - GelPilot 50 bp Ladder (100) (Qiagen Inc. USA) (Slika 5).

Tabela 3. PCR program (volumen 25 μ l)

Egzon 2	Egzon 10
1. denaturacija DNK, 5 min 94°C	1. denaturacija DNK, 10 min 95°C
2. 35 ciklusa	2. 35 ciklusa
94°C, 30 sec	94°C, 30 sec
58°C, 30 sec	58°C, 30 sec
72°C, 30 sec	72°C, 30 sec
3. 72°C, 7 min	3. 72°C, 7 min
↓ 10°C	↓ 10°C



Slika 5. Prikaz provere PCR produkta egzona 2 (levo) i egzona 10 (desno)

4.2.3. Denaturišćuća tečna hromatografija visokog učinka

Amplikoni egzona 10 su pre sekvenciranja obrađeni korišćenjem denaturišćuće tečne hromatografije visokog učinka (dHPLC - *Denaturing high performance liquid chromatography*), radi identifikovanja i izdvajanja onih uzoraka sa normalnom sekvencom (WAVE®Systems 4500 Series, Transgenomic, Inc, Omaha: NE, USA). Amplikoni egzona 2 su direktno sekvencirani.

DHPLC je metoda odvajanja nukleinskih kiselina primenom jono-izmenjivačke reverzno fazne tečne hromatografije sa posebnim DNK separišućem matriksom. Princip rada je da se željeni PCR produkti DNK, a koji se razlikuju u sekvenci, odnosno jednom baznom paru ako se radi o mutacijama, izmešaju u ekvimolarnom odnosu, denaturišu, renaturišu i analiziraju na temperaturama kolone koje su dovoljne da izazovu parcijalnu denaturaciju analizata. U slučaju renaturacije dva lanca DNK koji nemaju istu sekvencu (npr. jedan lanac ima mutaciju) dolazi do formiranja DNK heterodupleksa, odnosno dvostrukog lanca DNK

koji ima deformitet na mestu neslaganja sekvenci. DNK heterodupleksi su manje stabilni od njihovih tačno uklopljenih duplekse u uslovima reverzno fazne tečne hromatografije tako da dolazi do njihove ranije elucije u odnosu na njihove odgovarajuće homoduplekse. Sami homozigoti mogu različito eluirati u dHPLC uslovima usled razlika u temperaturi denaturacije ili veličini uzorka. Za precizno identifikovanje homozigotnih mutacija uzorci se mešaju sa referentnom analizom poznatog genotipa pre dHPLC-a. Pojedinačne nukleotidne supstitucije, delecije i insercije se uspešno detektuju u okviru 2 do 3 minuta korišćenjem amplicona od oko 200-1000 bp sa senzitivnošću i specifičnošću od skoro 100% (231).

Analiza dHPLC-a je urađena korišćenjem Transgenomic (Omaha, NE) HPLC aparata. Za kalibracioni korak, odnosnu analizu i predviđanje profila temperatura denaturacije fragmenta korišćen je WAVEMAKER (Transgenomic) softver. Kalibracija je uspešna ako se heterozigotni fragmenti odvajaju od kontrolnog homozigotnog fragmenta. Tada se dodaju PCR ampliconi za analizu putem injekcije aparata i to 5 µl po analizi.

4.2.4. Sekvenciranje DNK

Sekvenciranje je izvedeno korišćenjem ABI PRISM 310 automatizovanog sekvencera (ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer, PE Applied Biosystems, Norwalk, USA). Dobljene sekvence nukleotida su upoređene sa referentnom sekvencom *MEFV* gena, odnosno sekvencom gena objavljenoj u GenBank NCBI (Access No. NT_037887).

ABI PRISM 310 automatizovani sekvencer radi na principu integracije multikolornog fluorescentnog obeležavanja, kapilarne elektroforeze i softvera za analizu podataka. Za sekvenciranje i genotipiziranje na *ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer* se koriste ABI PRISM® reagensi i softver. Aparat koristi metodu Sangerovog dideoksi sekvenciranja. U normalnim uslovima transkripcije ili replikacije DNK polimeraza dodaje nukleotide na postojeći lanac (prajmer) sa 3' krajem, tako što formira vezu sa 5' fosfatnom grupom nukleotida koji dolazi u rastući nukleotidni lanac. Elongacija se odvija u 5'-3'smeru. DNK polimeraza može inkorporirati analoge nukleotidnih baza u rastući lanac DNK. Sangerova metoda koristi 2',3'-dideoksinukleotide, nazvane terminatori, jer njima nedostaje 3'OH grupa neophodna za formiranje fosfodiesterne veze pa se dalje formiranje DNK lanca zaustavlja.

U automatizovanom fluorescentnom sekvenciranju različite fluorescentne boje se koriste kao obeleživači dideoksi baza. Svaki od četiri različita dideoksi nukleotida je obeležen drugom bojom. Tako da se rastući lanac DNK prekida a istovremeno se snimanjem fluorescentne boje može otkriti koji je nukleotid u pitanju (A, G, C ili T).

Pre stavljanja uzoraka u sekvencer radi se prečišćavanje DNK i dodavanje dideoksi nukleotida i drugih neophodnih reagensa. Radi prečišćavanja DNK fragmenata koristili smo ExoSAP-IT reagens. Naime, nakon PCR umnožavanja svaki neiskorišćeni dNTP i prajmer koji ostane može smetati metodama DNK sekvenciranja ili SNP analizama. ExoSAP-IT uklanja ove kontaminante.

Nakon toga se uzorci spremaju za sekvenciranje korišćenjem Big-Dye Terminator (BDT) 1.1 reagensa (miksa). Opis reagensa u sekvencionom miksu je dat u Tabeli 4. Big-Dye Terminator reagens se razblaži BDT 5x puferom i po 0.5ml se stavi u ependorfice. 25 μ l Big-Dye reagens i 87.5 μ l 5x pufera je dovoljno za 25 sekvencionih reakcija. U 3.5 μ l reakcijske smeše dodamo 16.5 μ l BDT sa puferom, ako radimo seriju reakcija sa istim prajmerom. Tako spremljen reagens se zamrzava na -20°C do upotrebe.

Tabela 4. Opis reagensa sekvencionog miksa

Komponente sekvencionog kita:
Terminator Ready reakcioni miks:
– A-Dye Terminator obeležen dihlorom[R6G]
– C-Dye Terminator obeležen dihlorom[ROX]
– G-Dye Terminator obeležen dihlorom[R110]
– T-Dye Terminator obeležen dihlorom[TAMRA]
– Deoksinukleotid trifosfati (dATP, dCTP, dITP, dUTP)
– AmpliTaq DNK polimeraza, FS
– MgCl ₂
– Tris-HCl pufer, pH 9.0
pGEM®-3Zf(+) dvolančani DNK kontrolni templejt, 0.2 μ g/ μ L
–21 M13 kontrolni prajmer (<i>forward</i>), 0.8 pmol/ μ L.

Ako se prajmeri razlikuju, u ependorficu sa Big-Dye reagensom (25 μ l Big-Dye reagens u 87.5 μ l 5x pufera) se prvo doda 292.5 μ l H₂O (za 25 reakcija). U svaku ependorficu za sekvencionu reakciju sa 3.5 μ l reakcijske smeše dodaje se po 16.2 μ l reakcionog miksa i 0.3 μ l prajmera (ukupni volumen 20 μ l).

Protokol reakcija pripreme uzoraka za sekvencirajne je dat na Slici 6.

Sekvenciona reakcija

1. 1 μ l ExoSAP-IT (enzim)
+ 2.5 μ l amplikona (template~100 bp)
PCR 37° C 15 min
80° C 15 min
↓10° C
2. 0.3 μ l prajmer (jedan prajmer, bilo koji)
16.2 μ l sekvencionog miksa

PCR za sekvenciranje za 20 μ l

1. 96° C
2. 96° C 0.10 min
50° C 0.05 min
60° C 4.00 min } 25 x
3. 4.0° ∞

Slika 6. Protokol pripreme uzoraka za sekvenciranje

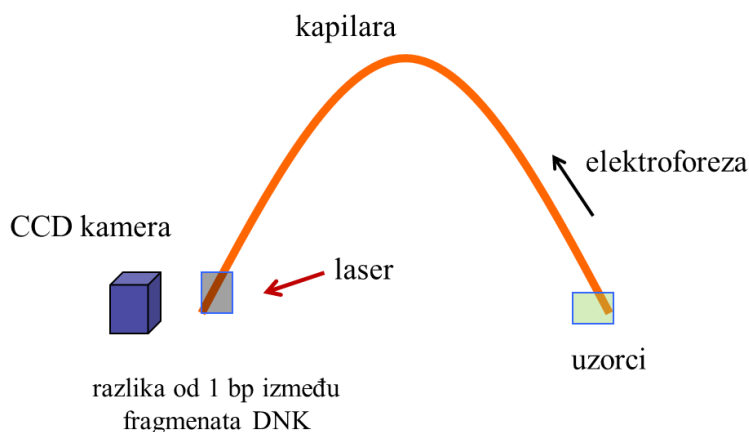
ABI PRISM 310 aparat analizira fluorescentno obeležene DNK fragmente putem kapilarne elektroforeze. Tubice sa uzorcima za sekvenciranje se smeštaju u automatski injektor (*autosampler*) koji ima 48 do 96 mesta. Injektor dovodi u kontakt svaki uzorak sa katodnom elektrodom na jednom kraju kapilare, koja je od stakla i ispunjena separacionim polimerom. Anodna elektroda je na drugom kraju kapilare uronjena u pufer.

Uzorak ulazi u kapilaru dok teče struja od katode ka anodi. Kratkotrajni početni deo procesa kada je katoda u uzorku se naziva elektrokinetička injekcija. Tada uzorak ulazi u kapilaru i na njenom vrhu formira sloj. Potom se katoda premešta u pufer, struja ponovo pušta i elektroforeza nastavlja. Autosampler redom uzima svaki uzorak u kapilaru.

Elektroforeza razdvaja fragmente DNK po njihovoj dužini i razlici od samo jednog baznog para, tako da kraći tj. "lakši" fragmenti putuju brže.

DNK sekvencer detektuje fluorescencu četiri različite boje koje određuju A, G, C i T nukleotide na krajevima fragmenata. Svaka boja emituje svetlost na različitoj talasnoj dužini kada se eksituje argonskim 10 mW jonskim laserom. Kada DNK fragmenti dođu u detektor kapilare laser eksituje fluorescentnu boju na nukleotidu. Emitovana fluorescencija se snima jednom u sekundi pomoću CCD kamere (eng. *Charge coupled devices* – elementi sa

spregnutim naelektrisanjem) i pomoću specifičnih virtualnih filtera za talasne dužine, od 525 do 650nm. Šematski prikaz rada sekvencera je na Slici 7.



Slika 7. Šematski prikaz osnove rada ABI PRISM 310 sekvencera

Softver sekvencera analizira i tumači rezultate i šalje izveštaj u vidu fajlova *.ab1 i *.seq. Program Chromas Lite 2.1.1 (Technelysium Pty Ltd) se koristi radi čitanja izveštaja sekvencera. Program otvara fajlove sekvencera i dobija se prikaz u vidu sinusoide fluorescence sa četiri različite boje. Iznad vrhova fluorescence su početna slova baza koje daju tu boju fluorescence. „N“ stoji ako se dve baze poklapaju ili postoji greška. Ako je osoba heterozigot za 1 bazu postoje dva vrha na istom mestu u sekvenci koji se jasno vide razdvojeno.

Radi upoređivanja dobijenih sekvenci sa normalnim “wild” tipom koristi se genska baza podataka Nacionalnog centra za biotehnoške informacije (*National Center for Biotechnology Information* (NCBI)), koja je deo američke Nacionalne biblioteke za medicinu (NLM).

4.2.5. Određivanje parametara oksidativnog stresa

Radi određivanja stepena oksidativnog stresa kod ispitanika ispitivali smo aktivnost antioksidativnih enzima, superoksid dizmutaze i katalaze, kao i oksidativno izmenjene molekule, odnosno stepen lipidne peroksidacije i uznapredovale oksidativne proteinske produkte.

4.2.5.1. Određivanje koncentracije produkata lipidne peroksidacije u plazmi

Nivo tiobarbiturnih reagujućih supstanci (TBARS) u plazmi je odredivan spektrofotometrijskom metodom po Andreevoj i sar. (1988) (232). Metoda se bazira na

reakciji MDA sa tiobarbiturnom kiselinom, na visokoj temperaturi i kiseloj sredini, pri čemu nastaje hromogen (MDA-TBA₂), a intenzitet boje se čita na $\lambda=532$ nm. Koncentracija TBARS izračunava se korišćenjem molarnog ekstinkcionog koeficijena koji iznosi $1,54 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ i izražava se u $\mu\text{mol/L}$. Intenzitet boje je određivan na spektrofotometrijskom aparatu „Beckman DU 530 UV vis spectrophotometer“ (GMI, Minnesota, USA).

4.2.5.2. Određivanje koncentracije TBARS u eritrocitima

Nivo tiobarbiturnih reagujućih supstanci u eritrocitima je određivan spektrofotometrijskom metodom po Jain i sar. (1990) (217). Oprani eritrociti su bili resuspendovani u fosfatni pufer pH 7.4. Nakon dodatka trihlorsirćetne kiseline, centrifugiranja i dodatka TBA na visokoj temperaturi nastaje hromogen, a intenzitet obojenog jedinjenja se čita na 532 nm. Dobijena vrednost TBARS je izražena u nmol/g hemoglobina (Hb).

4.2.5.3. Određivanje uznapredovalih oksidativnih proteinskih produkata (Advanced oxidation protein product (AOPP) assay)

Nivo uznapredovalih oksidativnih proteinskih produkata je određivan spektrofotometrijski i kalibrisan hloramino-T rastvorom, koji u prisustvu kalijum jodida apsorbuje svetlost na 340nm. Test kiviteta sadrži 200 μl plazme rastvorene u 1/5 fosfatnom puferu sa dodatkom 20 μl sirćetne kiseline. 10 μl 1.16M kalijum jodida se dodaje u 200 μl hloramino-T rastvora (0-100 $\mu\text{mol/liter}$) nakon čega se dodaje 20 μl sirćetne kiseline. Absorbanca reakcione smeše se odmah čita na 340nm u odnosu na 200 μl fosfatnog pufera, 10 μl kalijum jodida i 20 μl sirćetne kiseline. AOPP koncentracije se izražavaju u $\mu\text{mol/L}$ hloramino-T ekvivalenta (Witko-Sarsat V, 1996) (233).

4.2.5.4. Određivanje aktivnosti superoksid dizmutaze u plazmi i eritrocitima

Određivanje aktivnosti SOD je urađeno pirogalolskom metodom McCord J i Fridovich I (1969) (234). Ova metoda pripada grupi metoda “negativnog” tipa, jer se prati smanjenje brzine oksidacije NBT (nitro blue tetrasolium-a) na račun autooksidacije pirogalola u alkalnoj sredini, koja rezultuje produkcijom O_2^- . Prisutna SOD uklanja O_2^- i pri tome inhibira reakciju oksidacije NBT-a. Brzina oksidacije NBT u prisustvu pirogalola prati se spektrofotometrijski preko promene apsorbanice. Pad apsorbanice na 540nm potiče od prisustva SOD koja sprečava autooksidaciju pirogalola i akumulaciju oksidisanog hromogena

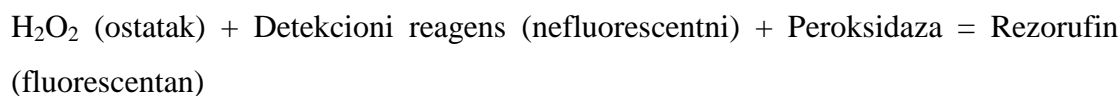
ljubičaste boje. Procenat inhibicije koristi se kao mera katalitičke aktivnosti enzima. Brzina autooksidacije pirogalola i stvaranje hromogena u odsustvu enzima uzima se kao referentna (kontrolna) vrednost, a brzina autooksidacije u prisustvu SOD, predstavlja deo referentne vrednosti. Jedna jedinica aktivnosti SOD predstavlja onu količinu enzima koja može da ostvari 50% inhibicije oksidacije NBT u prisustvu pirogalola.

4.2.5.5. *Određivanje aktivnosti katalaze*

Aktivnost katalaze u uzorcima lizata eritrocita je određivana Katalaza ELISA kit-om (Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, NY 11735, USA), prema uputstvu proizvođača.

Katalaza fluorimetrijski kit je senzitivni florescentni test za detekciju aktivnosti katalaze merenjem količine substrata (vodonik peroksida) koji ostaje nakon dodatka ispitivanog uzorka.

Reakcija podrazumeva:



Ekscitacija se odvija na 530-571nm talasne dužine, a emisija na 590-600nm. Određivanje fluorescence je rađeno na aparatu "Wallac Victor2 V 1420 multilabel HTS counter" (Perkin-Elmer, Waltham, Massachusetts, USA).

Aktivnost katalaze se preračunava:

1. Izračuna se prosečni RFU (*relative florescent unit*) za svaki standard i uzorak i to oduzimanjem prosečne 0 U/ml RFU od prosečne RFU za svaki standard i uzorak.
2. Konstruiše se grafik, tako što se ukrste vrednosti prosečnih RFU za svaki standard sa aktivnošću katalaze (U/ml) u svakom standardu. Prema dobijenoj krivi i metodom interpolacije određuje se nepoznata koncentracija katalaze u ispitivanim uzorcima.

4.2.6. *Određivanje elemenata kompletne krvne slike i biohemijske analize krvi*

Elementi krvne slike (broj eritrocita, leukocita, trombocita i hemoglobin), sedimentacija eritrocita, C-reaktivni protein i koncentracija albumina su određivani u biohemijskoj laboratoriji Klinike za dečije interne bolesti u Nišu.

Broj eritrocita, leukocita, trombocita i hemoglobin su mereni aparatom COULTER® AcT Diff Analyzer (Beckman Coulter Corporation, Hialeah, FL, USA), automatskim

hematološkim analizatorom sa kompletnim sistemom reagensa i autentičnom Coulter tehnologijom: triplikatnog merenja, Coulter histogram diferencijala, *sweep-flow* tehnologije i produženog brojanja trombocita.

Za merenje koncentracije albumina i CRP-a korišćen je potpuno automatizovan Erba Mannheim XL600 analizator i komercijalno dostupni reagesi proizvođača (ERBA Diagnostics Mannheim GmbH, Baden-Wurttemberg, Germany).

Brzina sedimentacije eritrocita je određivana pomoću Westengard ESR metode (235).

4.3. Statistička obrada

Primarno je urađena deskriptivna obrada rezultata (demografske karakteristike ispitanika, procentualna zastupljenost mutacija i vrste mutacija). Rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm standardna devijacija ili medijana \pm interkvartilna razlika, u zavisnosti od normalnosti posmatranog skupa (prema Shapiro-Wilkovom testu). Za određivanje značajnosti povezanosti identifikovanih promena *MEFV* gena i udruženih kliničkih manifestacija korišćen je χ^2 test asocijacije, sa Phi i Cramer V testom jačine asocijacije. Kondiciona logistička regresiona analiza za uparene podatke je korišćena kao metoda za testiranje uzročno-posledične povezanosti *MEFV* genotipova i kliničkih manifestacija (ishoda). *Hardy–Weinbergov* princip je primenjen radi testiranja frekvenci alela R202Q polimorfizma *MEFV* gena. Statistička analiza parametara oksidativnog stresa je sprovedena primenom Mann-Whitney *U*-testa. Korelacija između parametara je ustanovljena Spearmanovim rank order testom. U svim testovima vrednost verovatnoće od $p < 0.05$ je smatrana statistički značajnom. Statistička obrada je izvedena korišćenjem SPSS 17.0 statističkog programa (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

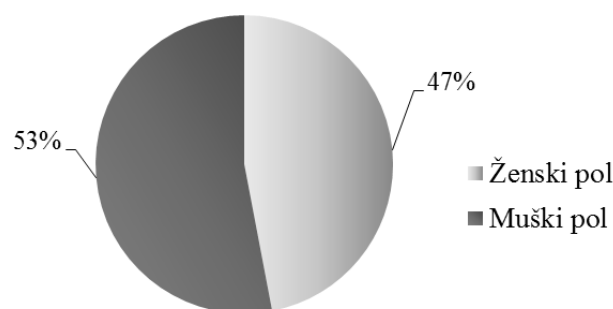
5. REZULTATI

5.1. Populaciono–deskriptivna analiza ispitanika

Nakon dobijanja pismenog pristanka, 100 ispitanika je uključeno u istraživanje.

Polovina ispitanika je rođena u Nišu ili okolini (nišavski okrug) (51,2%), dok su ostali ispitanici bili uglavnom iz jugo-istočne Srbije (48,8%).

U istraživanje je uključeno 47 osoba muškog i 53 ženskog pola (Slika 8).



Slika 8. Procentualni odnos zastupljenosti ispitanika prema polu

Prosečne godine starosti ispitanika su bile $13,3 \pm 8,87$, u rasponu od 2 do 35 godina.

Prosečan indeks telesne težine (BMI) za celu grupu ispitanika iznosi $18,5 \pm 3,3 \text{ kg/m}^2$.

5.2. Frekvencija mutacija, genotipova i R202Q polimorfizma *MEFV* gena

Od ukupno 100 sekvenciranih uzoraka DNK 11% je imalo mutaciju *MEFV* gena u egzonu 2 ili 10.

Od toga je 6% bilo heterozigotno za E148Q/N (c.442G>C) mutaciju u egzonu 2. U ovom slučaju postoji supstitucija guanina citozinom na mestu 442 u sekvenci *MEFV* gena (GAG/CAG), odnosno zamene aminokiseline glutaminske kiseline glutaminom u proteinu. 5% ispitanika je imalo heterozigotnu K695R/N (c.2084A>G) mutaciju u egzonu 10 *MEFV* gena. Ovde postoji zamena adenina guaninom na mestu 2084 *MEFV* gena i dolazi do zamene lizina argininom u aminokiselinskom rasporedu u pirinu (AAG/AGG) (Tabela 5).

Sekveciranjem *MEFV* gena kod 10% osoba je detektovano prisustvo R202Q (c.605G>A) homozigotnog polimorfizma (Tabela 5). U slučaju navedenog polimorfizma dolazi do zamene aminokiseline arginina aminokiselinom glutamin u proteinu (CGG/CAG).

Čak 45% svih ispitanika je imalo heterozigotnu R202Q polimorfiznu promenu.

Kod jedne osobe je detektovana mutacija K695R/N bila udružena sa R202Q homozigotnim polimorfizmom. U tabeli 6 je prikazana distribucija mutacija i frekvence alela kod ispitanika.

Tabela 5. Opis detektovanih mutacija i R202Q polimorfizma

Mutacija	Opis
E148Q	c.442G>C , transverzija 442-og nukleotida koja rezultuje supstitucijom glutaminske kiseline sa glutaminom
K695R	c.2084A>G , tranzicija 2084-og nukleotida koja rezultuje supstitucijom aminokiseline lizina sa argininom
R202Q	c.605G>A , tranzicija 605-og nukleotida sa supstitucijom arginina sa glutaminom

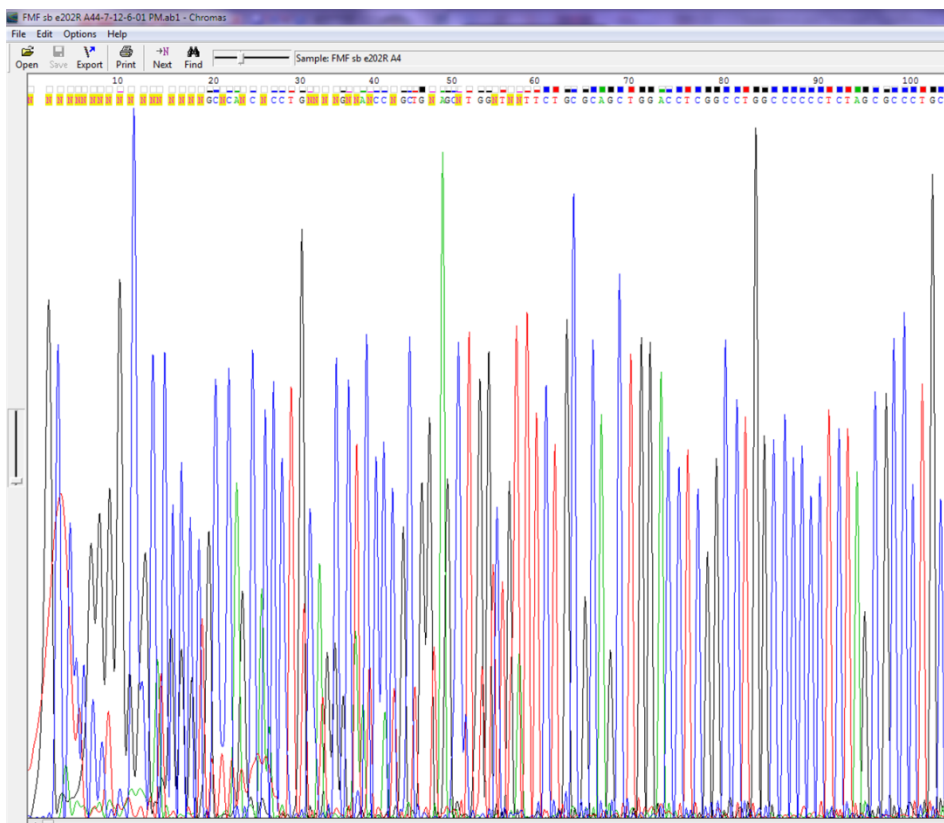
Tabela 6. Distribucija mutacija *MEFV* gena i R202Q polimorfizma (n=100)

<i>MEFV</i> promena	n	frekvencija alela
E148Q/N	6	3%
K695R/N [†]	5	2.5%
R202Q/R202Q	10	32.5%*
R202Q/N	45	-

* ukupni broj R202Q alela

[†] jedan ispitanik je dodatno imao i R202Q/R202Q

Primeri izveštaja programa “Chromas” za dobijene rezultate sekvensera, kao i izveštaj genske baze Nacionalnog instituta zdravlja (NIH) SAD su prikazani na Slici 9 i 10 za osobu sa R202Q polimorfizmom, kao i na Slici 11 i 12 za osobu bez promena DNK sekvence *MEFV* gena.



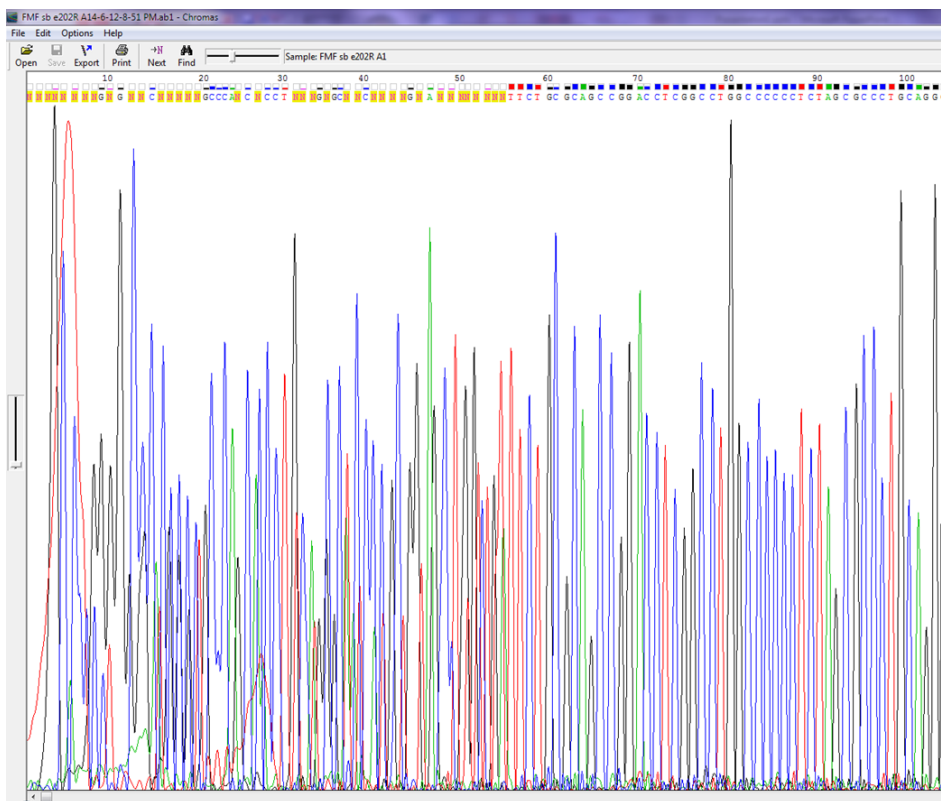
Slika 9. Izveštaj Chromas-a za uzorak FMF sb e202R A44-7-12-6-01 PM.ab1.

Homo sapiens Mediterranean fever (MEFV), RefSeqGene (LRG_190) on chromosome 16
 Sequence ID: [ref|NG_007871.1|](#) Length: 21600 Number of Matches: 1

Range 1: 6858 to 7176 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
562 bits(304)	8e-157	313/319(98%)	0/319(0%)	Plus/Minus
CDS: Putative 1 Query	106 59	R R I Q V E A Q G G E L A R C P G P S R TTCTGCGCAGCTGGACCTCGGCCTGGCCCCCTCTAGCGCCCTGCAGGGGCCGGGGCTTC		118
Sbjct CDS:pyrin isoform 1	7176 205	TTCTGCGCAGCCGACCTCGGCCTGGCCCCCTCTAGCGCCCTGCAGGGGCCGGGGCTTC R R I Q V E A Q G G E L A R C P G P S R		7117
CDS: Putative 1 Query	86 119	G G P L A P S R T R P K G Q A D L G E S TCCCGCCCGCAGGGCCGGGCTCCGGGTCAGAGGCTTCCCTGCGCGTCCAGGCCCTCCG		178
Sbjct CDS:pyrin isoform 1	7116 185	TCCCGCCCGCAGGGCCGGGCTCCGGGTCAGAGGCTTCCCTGCGCGTCCAGGCCCTCCG G G P L A P S R T R P K G Q A D L G E S		7057
CDS: Putative 1 Query	66 179	A K E R R K S L P K R S L G R G A E P Q ATGCCTTCTCTGCGTTTGTCTAGGGGCTTCTCGACAGCCCTCCCGGCCTCGGGCT		238
Sbjct CDS:pyrin isoform 1	7056 165	AGGCCTTCTCTGCGTTTGTCTAGGGGCTTCTCGACAGCCCTCCCGGCCTCGGGCT A K E R R K S L P K R S L G R G A E P Q		6997
CDS: Putative 1 Query	46 239	S C R L S A A G G G Y P R P G N G E N G GGCTGCACCGCAGGCTGGCAGCCCGCCCGTACGGCCGAGGGCCGTTCCTCGTTCC		298
Sbjct CDS:pyrin isoform 1	6996 145	GGCTGCACCGCAGGCTGGCAGCTCCGCCCCGTACGGCCGAGGGCCGTTCCTCGTTCC S C R L S A A G G G Y P R P G N G E N G		6937
CDS: Putative 1 Query	26 299	E P H D P T K L S R P K N E G L S S S A CCTCGGGTGGTCTGGAGTCTTCAGGCTCCTGGGCTTGTCTCCCCAGGGAGCTGGACG		358
Sbjct CDS:pyrin isoform 1	6936 125	CCTCGGGTGGTCTGGAGTCTTCAGGCTCCTGGGCTTGTCTCCCCAGGGAGCTGGACG E P H D P T K L S R P K N E G L S S S A		6877
CDS: Putative 1 Query	6 359	A X X X T G CTGCGNAATNNTCTGTGCC	377	
Sbjct CDS:pyrin isoform 1	6876 105	CTGCGAATCATCTGTGCC A S D D T G	6858	

Slika 10. Deo izveštaja NCBI/ BLAST/ blastn suite/ Formatting Results
 FMF sb e202R A44-7-12-6-01 PM.ab1.



Slika 11. Izveštaj Chromas-a za uzorak FMF sb e202R A14-6-12-8-51

Homo sapiens pyrin (MEFV) gene, complete cds
 Sequence ID: [gb|AF111163.1|AF111163](#) Length: 16891 Number of Matches: 1

Range 1: 2822 to 3145 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
588 bits(318)	1e-164	321/324(99%)	0/324(0%)	Plus/Minus
CDS: Putative 1	107	R R L R V E A Q G G E L A R C P G P S R		
Query	56	TTCTGCGCAGCCGACCTCGGCCTGGCCCCCTTAGCGCCCTGCAGGGCCGGGGCTTC	115	
Sbjct	3145	TTCTGCGCAGCCGACCTCGGCCTGGCCCCCTTAGCGCCCTGCAGGGCCGGGGCTTC	3086	
CDS:pyrin [Homo sapi	205	R R L R V E A Q G G E L A R C P G P S R		
CDS: Putative 1	87	G G P L A P S R T R P K G Q A D L G E S		
Query	116	TCCCGCCCGCAGGGCCGGGCTCCGGGTCAGGGCTTGCCCTGCGCGTCCAGGCCCTCCG	175	
Sbjct	3085	TCCCGCCCGCAGGGCCGGGCTCCGGGTCAGGGCTTGCCCTGCGCGTCCAGGCCCTCCG	3026	
CDS:pyrin [Homo sapi	185	G G P L A P S R T R P K G Q A D L G E S		
CDS: Putative 1	67	A K E R R R K S L P K R S L G R G A E P Q		
Query	176	AGGCCTTCTCTGCGTTTGCTCAGGGGCTTCTCGACAGCCCCCTCCCGGCTCGGGCT	235	
Sbjct	3025	AGGCCTTCTCTGCGTTTGCTCAGGGGCTTCTCGACAGCCCCCTCCCGGCTCGGGCT	2966	
CDS:pyrin [Homo sapi	165	A K E R R R K S L P K R S L G R G A E P Q		
CDS: Putative 1	47	S C R L S A A G G G Y P R P G N G E N G		
Query	236	GGCTGCACCGCAGGCTGGCAGCTCCGCCCCCGTACGGCCGAGGGCCGTTCCCTCGTTCC	295	
Sbjct	2965	GGCTGCACCGCAGGCTGGCAGCTCCGCCCCCGTACGGCCGAGGGCCGTTCCCTCGTTCC	2906	
CDS:pyrin [Homo sapi	145	S C R L S A A G G G Y P R P G N G E N G		
CDS: Putative 1	27	E P H D P T K L S R P K N E G L S S S A		
Query	296	CCTCGGGTGGTCTGGAGTCTCAGGCTCCTGGGCTTGTCTCCCCAGGGAGCTGGACG	355	
Sbjct	2905	CCTCGGGTGGTCTGGAGTCTCAGGCTCCTGGGCTTGTCTCCCCAGGGAGCTGGACG	2846	
CDS:pyrin [Homo sapi	125	E P H D P T K L S R P K N E G L S S S A		
CDS: Putative 1	7	A X D D T G N		
Query	356	CTGCNNATCATCTGTGCCGTTT 379		
Sbjct	2845	CTGCNNATCATCTGTGCCGTTT 2822		
CDS:pyrin [Homo sapi	105	A S D D T G N E		

Slika 12. Deo izveštaja NCBI/ BLAST/ blastn suite/ Formatting Results FMF sb e202R A14-6-12-8-51 PM.ab1

5.3. Hardy–Weinbergov princip za R202Q polimorfizam

Hardy–Weinbergov princip ili ravnoteža (ekvilibrijum) označava stanje u kome frekvence određenih alela i genotipova u populaciji ostaju konstantni iz generacije u generaciju ukoliko nema evolucionih uticaja.

Frekvence alela i genotipova R202Q polimorfizma su bile u *Hardy–Weinbergovoj* ravnoteži u srpskoj populaciji. Iako je frekvencija R202Q recesivnog fenotipa (aa) prilično niska, odnosno 9,61% ($f(a) = 0,31$).

Za svih 100 ispitanika frekvence alela (p i q) za R202Q polimorfizam su bile:

$$AA=0,47, Aa=0,44, aa=0,09$$

$$f(A) = (2 \cdot \text{broj fenotipa AA} + \text{broj fenotipa Aa}) / 2 \cdot \text{broj osoba}$$

$$f(A) = (2 \cdot 47 + 44) / 200 = 0.69 - p$$

$$f(a) = (2 \cdot \text{broj fenotipa aa} + \text{broj fenotipa Aa}) / 2 \cdot \text{broj osoba}; \text{ ili } 1 - p = q$$

$$q = 0.31$$

Očekivane frekvence fenotipova:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

$$p^2 = 0.4761 \text{ (AA)}$$

$$2pq = 0.4278 \text{ (Aa)}$$

$$q^2 = 0.0961 \text{ (aa)}$$

$\chi^2 = \sum (fd - fo)^2 / fo = \dots = 0.0813256$, nema značajne razlike između očekivanih i dobijenih frekvenci fenotipova, te se može zaključiti da su fenotipovi u ravnoteži.

Ispitivanje *Hardy–Weinbergove* ravnoteže R202Q polimorfizma u grupi ispitanika koji navode epizode povišene temperature (n=28):

$$AA = 13, Aa = 11, aa = 4$$

$$AA = 0.464, Aa = 0.393, aa = 0.143$$

$$f(A) = 0.6607, f(a) = 0.3393$$

Očekivane frekvence:

$$AA = 0.464, Aa = 0.449, aa = 0.115$$

$$\chi^2 = 1.55998 < 9.21, \text{ odnosno, fenotipovi su u ravnoteži.}$$

Ispitivanje *Hardy–Weinbergove* ravnoteže R202Q polimorfizma u grupi ispitanika koji ne navode ponovljene temperature (n=30):

$$AA = 13, Aa = 17, aa = 0$$

$$AA = 0.433, Aa = 0.566, aa = 0$$

$$f(A) = 0.716, q=0.283$$

Očekivane frekvence:

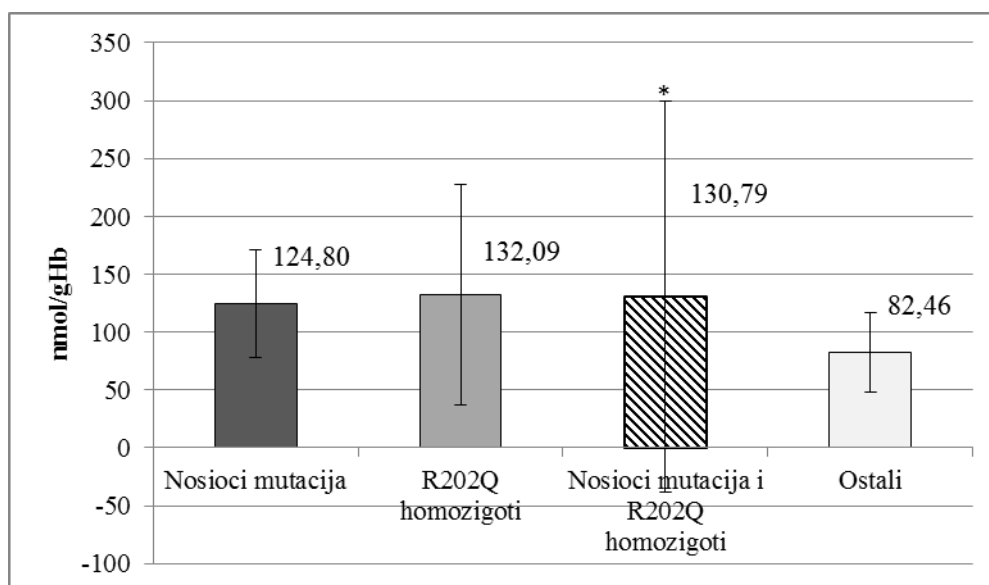
$$AA=0.5126, Aa=0.4074, aa=0.08$$

$$\chi^2 = 0.1541 < 9.21, \text{ odnosno, fenotipovi su u ravnoteži.}$$

5.4. Rezultati promena parametara oksidativnog stresa

Koncentracija TBARS u eritrocitima ispitanika

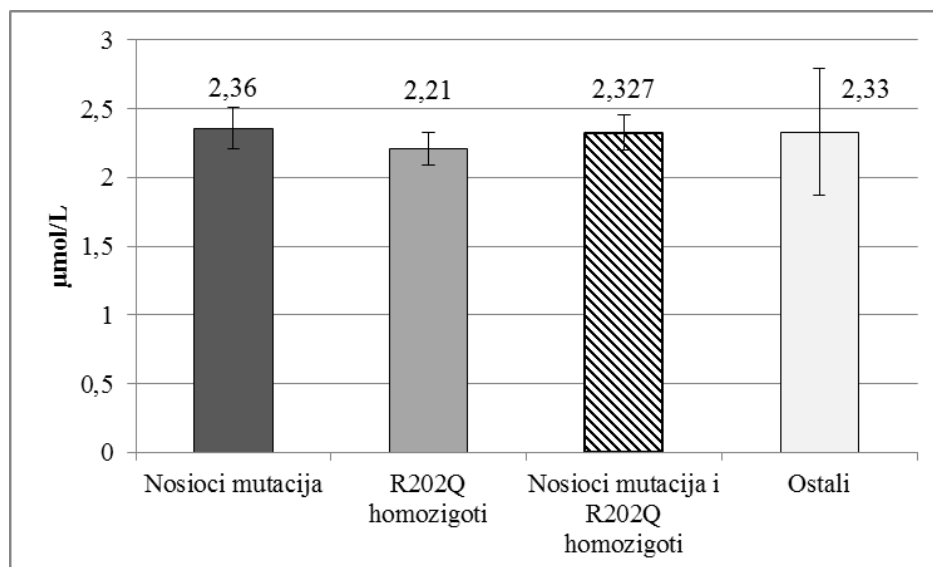
Koncentracija TBARS u eritrocitima osoba sa mutacijama *MEFV* gena i R202Q homozigotnim polimorfizmom ($130,79 \pm 168,86$ nmol/gHb) su bile statistički značajno više u odnosu na osobe bez navedenih promena gena ($82,46 \pm 34,16$ nmol/gHb) za $p=0,03$ i $U=84$. Vrednosti TBARS u eritrocitima nosioca mutacija su iznosile $124,79 \pm 46,41$ nmol/gHb dok su vrednosti kod R202Q homozigota bile $132,09 \pm 94,96$ nmol/gHb ($p=0,052$), i nisu bile statistički značajno različite u odnosu na vrednosti kod osoba bez ovih genskih promena (Slika 13).



Slika 13. Koncentracije TBARS u eritrocitima ispitanika u odnosu na prisustvo mutacija ili R202Q polimorfizma *MEFV* gena. * $p=0,03$, između nosioca mutacija i R202Q homozigota u odnosu na ostale ispitanike.

Koncentracija TBARS u plazmi ispitanika

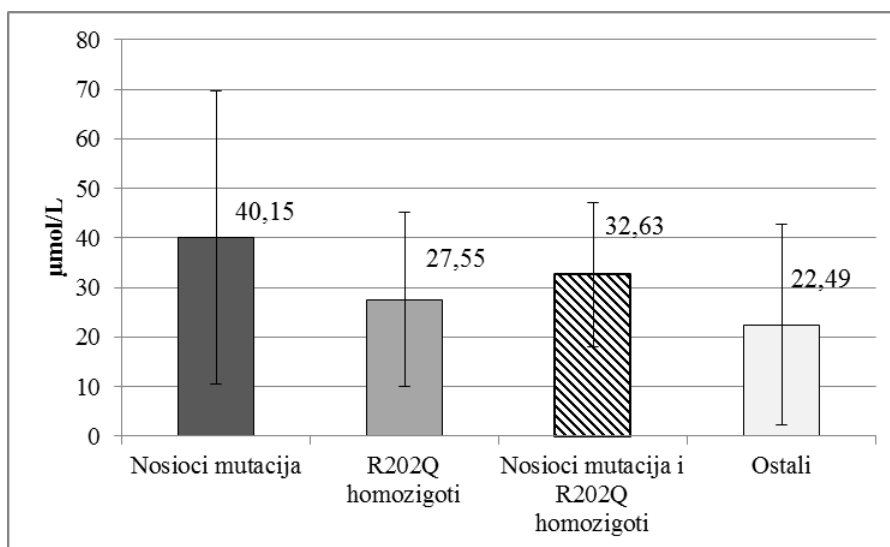
Koncentracije TBARS u plazmi kod nosioca mutacija iznosile su $2,36 \pm 0,15 \mu\text{mol/L}$, kod R202Q homozigota $2,21 \pm 0,12 \mu\text{mol/L}$, kod nosioca mutacija zajedno sa R202Q homozigotima $2,33 \pm 0,125 \mu\text{mol/L}$ i kod osoba bez navedenih promena $2,33 \pm 0,46 \mu\text{mol/L}$. Nije bilo značajnih razlika između vrednosti utvrđenih koncentracija TBARS između ispitivanih grupa (Slika 14).



Slika 14. Koncentracije TBARS u plazmi ispitanika u odnosu na prisustvo mutacija ili R202Q polimorfizma *MEFV* gena.

Koncentracija AOPP u plazmi ispitanika

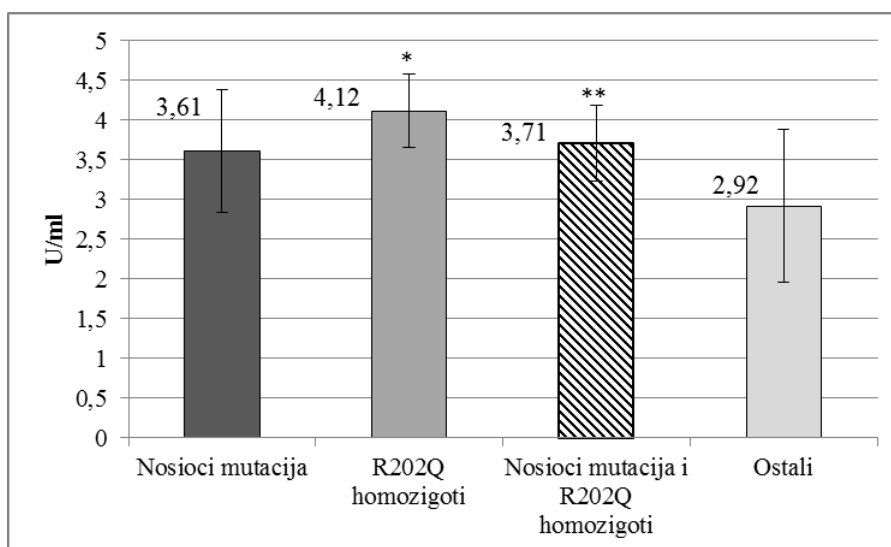
Koncentracije AOPP u plazmi nosioca mutacija su iznosile $40,15 \pm 29,63 \mu\text{mol/L}$, kod R202Q homozigota $27,55 \pm 17,59 \mu\text{mol/L}$, kod nosioca mutacija zajedno sa R202Q homozigotima $32,63 \pm 14,57 \mu\text{mol/L}$ i kod osoba bez navedenih promena $22,49 \pm 20,24 \mu\text{mol/L}$. Iako su vrednosti koncentracija AOPP bile više kod osoba sa navedenim genskim promenama ove razlike nisu bile statistički značajne ($p=0,322$, $U=121$ za razliku od nosioca mutacija i R202Q homozigota u odnosu na ostale) (Slika 15).



Slika 15. Koncentracije AOPP u plazmi ispitanika u odnosu na prisustvo mutacija ili R202Q polimorfizma *MEFV* gena.

Ukupna aktivnost SOD u plazmi ispitanika

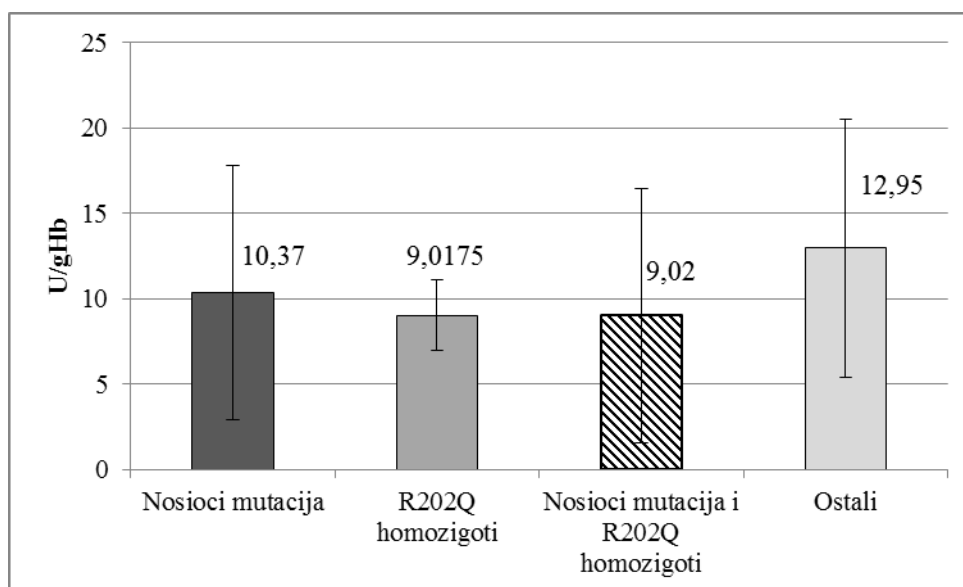
Plazmatska aktivnost SOD je bila značajno viša u grupi ispitanika sa mutacijama i R202Q/R202Q ($3,71 \pm 0,479$ U/ml) u odnosu na osobe bez navedenih promena ($2,92 \pm 0,96$ U/ml) za $p=0,049$ i $U=58,5$. Takođe, R202Q homozigoti ($4,12 \pm 0,46$ U/ml) su imali značajno više vrednosti aktivnosti SOD u plazmi u odnosu na ispitanike bez navedenih promena ($p=0,001$). Vrednosti plazmatske aktivnosti nosioca mutacija su iznosile $3,62 \pm 0,77$ U/ml i one samostalno nisu pokazivale značajnu razliku u odnosu na vrednosti kod drugih ispitanika (Slika 16).



Slika 16. Ukupna aktivnost SOD u plazmi ispitanika u odnosu na prisustvo mutacija ili R202Q polimorfizma. * $p=0,001$ i ** $p=0,049$ u odnosu na osobe bez navedenih genskih promena.

Ukupna aktivnost SOD u eritrocitima ispitanika

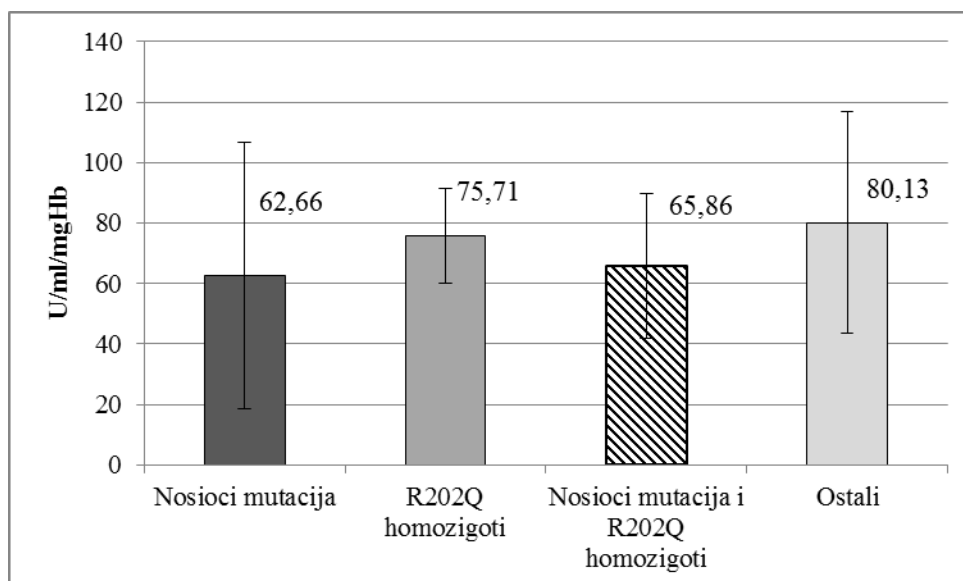
Ukupna aktivnost SOD u eritrocitima nosioca mutacija je iznosila $10,37 \pm 7,44$ U/gHb, kod R202Q homozigota $9,018 \pm 2,09$ U/gHb, kod nosioca mutacija zajedno sa R202Q homozigotima $9,02 \pm 7,44$ U/gHb i kod osoba bez navedenih promena $12,95 \pm 7,54$ U/gHb. Iako su vrednosti aktivnosti SOD u eritrocitima bile niže kod osoba sa navedenim genskim promenama ove razlike nisu bile statistički značajne ($p=0,439$, $U=117$ za razliku od nosioca mutacija i R202Q homozigota u odnosu na ostale) (Slika 17).



Slika 17. Ukupna aktivnost SOD u eritrocitima ispitanika u odnosu na prisustvo mutacija ili R202Q polimorfizma.

Ukupna aktivnost katalaze u eritrocitima ispitanika

Ukupna aktivnost katalaze u eritrocitima nosioca mutacija su iznosile $62,66 \pm 44,04$ U/ml/mgHb, kod R202Q homozigota $75,7 \pm 15,66$ U/ml/mgHb, kod nosioca mutacija zajedno sa R202Q homozigotima $65,86 \pm 23,98$ U/ml/mgHb i kod osoba bez navedenih promena $80,13 \pm 36,76$ U/ml/mgHb. Iako su vrednosti aktivnosti katalaze u eritrocitima bile niže kod osoba sa navedenim genskim promenama ove razlike nisu bile statistički značajne ($p=0,439$, $U=108,5$ za razliku nosioca mutacija i R202Q homozigota u odnosu na ostale) (Slika 18).



Slika 18. Ukupna aktivnost katalaze u eritrocitima ispitanika u odnosu na prisustvo mutacija ili R202Q polimorfizma *MEFV* gena.

Vrednosti određenih parametara oksidativnog stresa u odnosu na ispitivani *MEFV* genotip su sumirane u Tabeli 7.

Tabela 7. Vrednosti parametara oksidativnog stresa kod ispitivanih osoba

Oksidativni parametar	Nosiooci mutacija	R202Q homozigoti	Nosiooci mutacija i R202Q homozigoti	Ostali
TBARS u plazmi ($\mu\text{mol/L}$)	$2,36 \pm 0,15$	$2,21 \pm 0,12$	$2,327 \pm 0,125$	$2,33 \pm 0,46$
TBARS u eritrocitima (nmol/gHb)	$124,79 \pm 46,41$	$132,09 \pm 94,96$	$130,79 \pm 168,86^*$	$82,46 \pm 34,16$
AOPP ($\mu\text{mol/L}$)	$40,15 \pm 29,63$	$27,55 \pm 17,59$	$32,63 \pm 14,57$	$22,49 \pm 20,24$
SOD u plazmi (U/ml)	$3,62 \pm 0,77$	$4,12 \pm 0,46^{**}$	$3,71 \pm 0,48^*$	$2,92 \pm 0,96$
SOD u eritrocitima (U/gHb)	$10,37 \pm 7,44$	$9,017 \pm 2,09$	$9,02 \pm 7,44$	$12,95 \pm 7,54$
Katalaza u eritrocitima (U/ml/mgHb)	$62,66 \pm 44,04$	$75,71 \pm 15,66$	$65,86 \pm 23,98$	$80,13 \pm 36,76$

Vrednosti su izražene kao srednja vrednost \pm standardna devijacija ili medijana \pm interkvartilna razlika; TBARS – tiobarbiturne reagujuće supstance, AOPP – uznapredovali oksidativni proteinski produkti, SOD – superoksid dizmutaza; * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

Vrednosti merenih parametara oksidativnog stresa se nisu statistički značano razlikovale između osoba sa heterozigotnim R202Q polimorfizmom i osoba bez ovog polimorfizma i bez mutacija (Tabela 8). Najveću razliku su pokazivale vrednosti AOPP ($p=0,177$), SOD u plazmi ($p=0,261$) i SOD u eritrocitima ($p=0,084$).

Tabela 8. Srednje vrednosti parametara oksidativnog stresa u odnosu na R202Q heterozigotni polimorfizam kod ispitivanih osoba bez mutacija

Oksidativni parametar	R202Q heterozigoti	Bez R202Q polimorfizma
TBARS u plazmi ($\mu\text{mol/L}$)	$2,236 \pm 0,32$	$2,36 \pm 0,53$
TBARS u eritrocitima (nmol/gHb)	$82,46 \pm 24,62$	$76,685 \pm 37,85$
AOPP ($\mu\text{mol/L}$)	$24,51 \pm 30,39$	$19,81 \pm 10,92$
SOD u plazmi (U/ml)	$3,4103 \pm 0,948$	$2,861 \pm 1,324$
SOD u eritrocitima (U/gHb)	$11,206 \pm 8,32$	$14,962 \pm 6,13$
Katalaza u eritrocitima (U/ml/mgHb)	$83,024 \pm 32,49$	$77,047 \pm 41,67$

Vrednosti su izražene kao srednja vrednost \pm standardna devijacija ili medijana \pm interkvartilna razlika; TBARS – tiobarbiturne reagujuće supstance, AOPP – uznapredovali oksidativni proteinski produkti, SOD – superoksid dizmutaza.

Korelacije vrednosti određivanih parametara oksidativnog stresa kod ispitanika

U grupi ispitanika sa mutacijama *MEFV* gena i R202Q homozigotnim polimorfizmom postoji jaka negativna korelacija između nivoa AOPP-a i plazmatske aktivnosti SOD ($r_s = -0,709$, $p=0,074$), međutim ove vrednosti nisu bile statistički signifikantne (Tabela 9).

Takođe, postoji srednje jaka pozitivna korelacija između vrednosti AOPP i eritrocitnih TBARS ($r_s=0,643$, $p=0,086$), kao i plazmatske vrednosti TBARS i plazmatske aktivnosti SOD ($r_s=0,509$, $p=0,243$); kao i srednje jaka negativna korelacija između eritrocitne aktivnosti SOD i oba tipa TBARS ($r_s = -0,493$, $p=0,321$ (plazma) i $r_s = -0,522$, $p=0,288$ (eritrociti)). Međutim, sve ove vrednosti nisu pokazale statističku značajnost (Tabela 9).

Slaba pozitivna korelacija je nađena između eritrocitne i plazmatske vrednosti TBARS kod osoba sa navedenim promenama *MEFV* gena ($r_s = 0,283$, $p=0,073$) (Tabela 9).

Korelacija parametara oksidativnog stresa kod osoba bez *MEFV* mutacija i R202Q homozigotnog polimorfizma nije bila statistički značajna. Vrednosti Spearmanovog koeficijenta korelacije parametara oksidativnog stresa kod ovih osoba prikazane su u Tabeli 10.

Posebno ispitivanje korelacija ispitivanih parametara oksidativnog stresa kod osoba sa *MEFV* mutacijama nije otkrilo značajnu povezanost, kao ni kod osoba sa R202Q homozigotnim polimorfizmom (Tabele 11 i 12).

Vrednosti eritrocitnih TBARS su bile više kod osoba sa mutacijama i R202Q homozigota koji su navodili ponovljene temperature, u odnosu na nosioce promena bez navedene tegobe, iako na granici statističke značajnosti ($p=0,05$). Aktivnost eritrocitne SOD je bila niža kod osoba sa navedenim promenama gena koje su u anamnezi navodile bolove u više od 5 zglobova (poliartralgija) ($p=0,05$). Takođe, osobe sa mutacijama i R202Q/R202Q koje su navele čestu malaksalost su imale nižu vrednost plazmatske SOD, isto na granici značajnosti ($p=0,05$).

Statistički značajna pozitivna korelacija je utvrđena između vrednosti eritrocitne TBARS i aktivnosti katalaze kod osoba koje su imale ponovljene temperature ($r_s=0,478$, $p=0,028$). Takođe, nivo eritrocitna TBARS je korelisao sa AOPP kod ovih osoba ($r_s = 0,391$, $p=0,065$) (Tabela 13).

Tabela 9. Vrednosti Spearmanovog koeficijenta korelacije parametara oksidativnog stresa kod nosioca mutacija i R202Q homozigota

Oksidativni parametri	TBARS u eritrocitima	AOPP	SOD u plazmi	SOD u eritrocitima	Katalaza
TBARS pl.	- 0,060	- 0,168	0,509	- 0,493	0,286
TBARS er.		0,643	- 0,270	- 0,522	- 0,036
AOPP			- 0,709	- 0,147	0,393
SOD pl.				- 0,282	- 0,277
SOD er.					0,126

rs; NS. pl.-plazma, er.-eritrociti

Tabela 10. Vrednosti Spearmanovog koeficijenta korelacije parametara oksidativnog stresa kod osoba bez mutacija i R202Q homozigotnog polimorfizma

Oksidativni parametri	TBARS u eritrocitima	AOPP	SOD u plazmi	SOD u eritrocitima	Katalaza
TBARS pl.	0,283	0,377	- 0,037	- 0,266	- 0,015
TBARS er.		0,165	0,205	- 0,101	0,137
AOPP			0,004	0,258	0,201
SOD pl.				- 0,120	0,190
SOD er.					- 0,055

rs; NS. pl.-plazma, er.-eritrociti

Tabela 11. Vrednosti Spearmanovog koeficijenta korelacije parametara oksidativnog stresa kod nosioca mutacija *MEFV* gena

Oksidativni parametri	TBARS u eritrocitima	AOPP	SOD u plazmi	SOD u eritrocitima	Katalaza
TBARS pl.	-0,236	-0,543	-0,177	0,754	-0,086
TBARS er.		-0,029	0,273	-0,328	0,471
AOPP			0,618	-0,551	-0,600
SOD pl.				-0,316	-0,706
SOD er.					-0,058

rs; NS. pl.-plazma, er.-eritrociti

Tabela 12. Vrednosti Spearmanovog koeficijenta korelacije parametara oksidativnog stresa kod R202Q homozigota

Oksidativni parametri	TBARS u eritrocitima	AOPP	SOD u plazmi	SOD u eritrocitima	Katalaza
TBARS pl.	-0,371	0,391	-0,638	0,232	0,174
TBARS er.		0,600	-0,429	0,638	-0,754
AOPP			-0,647	0,257	0,600
SOD pl.				0,029	-0,116
SOD er.					-0,058

rs; NS. pl.-plazma, er.-eritrociti

Tabela 13. Vrednosti Spearmanovog koeficijenta korelacije parametara oksidativnog stresa kod osoba sa rekurentnim epizodama povišene temperature

Oksidativni parametri	TBARS u eritrocitima	AOPP	SOD u plazmi	SOD u eritrocitima	Katalaza
TBARS pl.	0,265	0,352	- 0,07	0,373	- 0,079
TBARS er.		0,391	0,335	- 0,140	0,478 *
AOPP			0,081	0,063	0,057
SOD pl.				- 0,192	0,216
SOD er.					0,055

rs; * p=0,028. pl.-plazma, er.-eritrociti

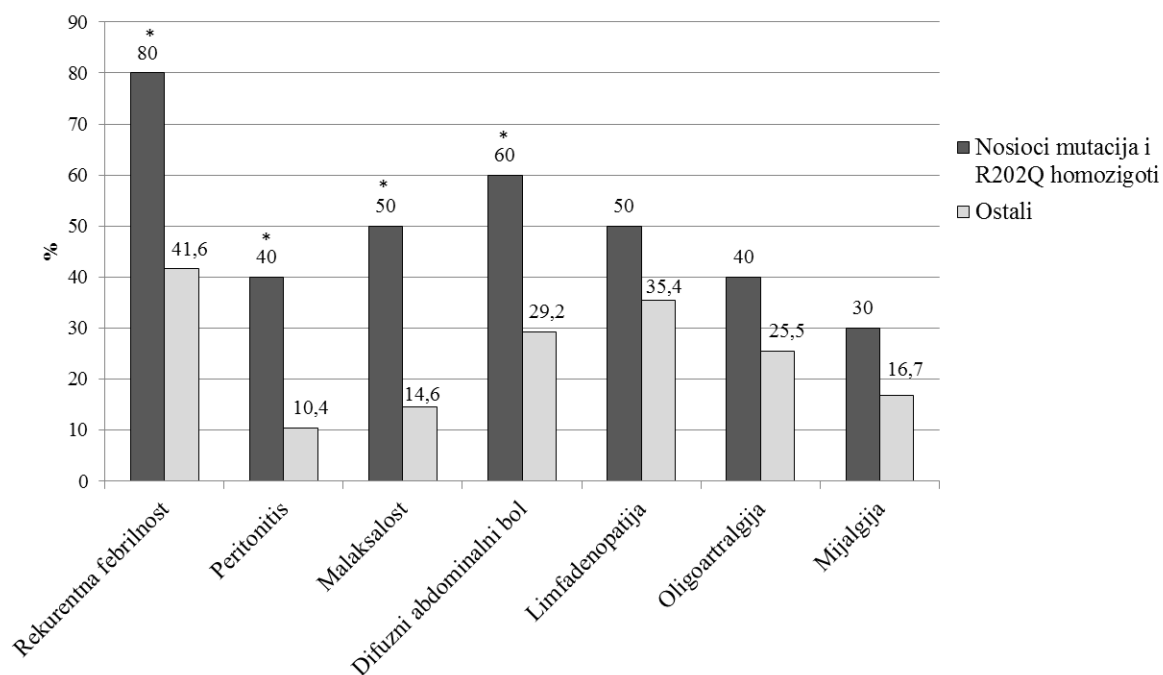
Od ostalih kliničkih manifestacija, osobe koje su imale difuznu ospu su imale nižu vrednost plazmatske aktivnosti SOD (11,32 vs. 19,21, U=58,5, p=0,023) i nižu aktivnost katalaze u eritrocitima (15,54 vs. 23,54, U=111, p=0,047).

Takođe, plazmatski nivoi TBARS su bili značajno povećani kod osoba koje su navodile limfadenopatiju (p=0,003, U=140,5) i malaksalost (p=0,035, U=117,5).

5.5. Rezultati prisustva kliničkih manifestacija zapaljenja

U ovom istraživanju, osobe sa mutacijama *MEFV* gena zajedno sa osobama sa R202Q homozigotnim polimorfizmom su u odnosu na osobe bez navedenih promena *MEFV* gena, značajno češće navodile:

- rekurentne febrilne epizode nepoznatog uzroka (p=0,027, Phi=0,290),
- difuzni abdominalni bol (p=0,015, Phi=0,321),
- peritonitis (p=0,019, Phi= 0,309) i
- malaksalost (p=0,012, Phi=0,330) (Slika 19).

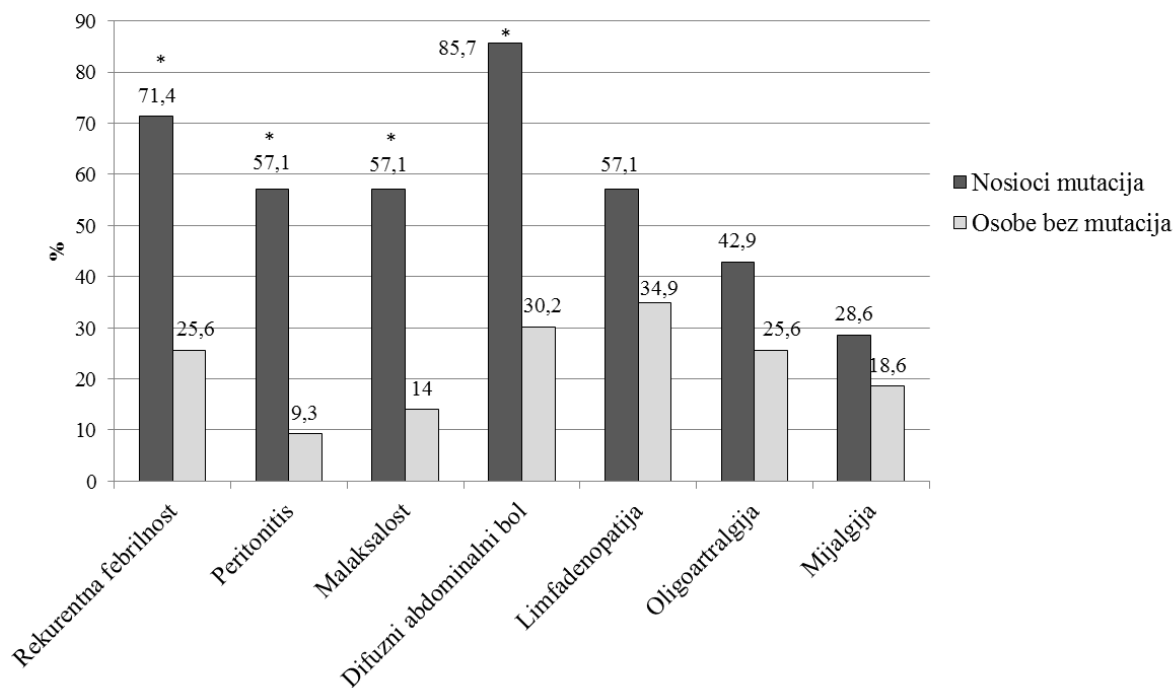


Slika 19. Prisustvo zapaljenskih manifestacija kod nosioca mutacija i R202Q homozigota *MEFV* gena; * $p < 0,03$

Rezultati pokazuju srednje jaku korelaciju između pojave začajno češćih manifestacija zapaljenja (rekurentne visoke temperature, peritonitisa, difuznog abdominalnog bola i malaksalosti) i utvrđenih heterozigotnih mutacija *MEFV* gena i R202Q homozigotnog polimorfizma.

Zdrave osobe sa mutacijama *MEFV* gena u odnosu na osobe bez mutacija i R202Q homozigotnog polimorfizma su češće navodile:

- rekurentne febrilne epizode nepoznatog uzroka ($p=0,048$, $\Phi=0,341$),
- difuzni abdominalni bol ($p=0,017$, $\Phi=0,397$),
- peritonitis ($p=0,008$, $\Phi=0,453$) i
- malaksalost ($p=0,032$, $\Phi=0,375$) (Slika 20).



Slika 20. Prisustvo zapaljenskih manifestacija kod nosioca mutacija *MEFV* gena; * $p < 0,05$

Dvadesetiosam ispitanika je navelo kao podatak ponovljenu epizodu povišene temperature nejasnog uzroka.

Značajno viša frekvencija prisustva mutacija *MEFV* gena zajedno sa R202Q homozigotnim polimorfizmom ($p=0,027$, $\Phi=0,290$) je postojala kod osoba koje su imale epizode ponovljene visoke temperature, u odnosu na osobe koje nisu navele prisustvo ponovljene febrilnosti. Takođe, kod ovih osoba je detektovana značajno veća frekvencija R202Q homozigotnog polimorfizma ($p=0,032$, $\Phi=0,28$). Prisustvo R202Q heterozigota je bilo približno jednako u ove dve grupe ispitanika ($p=0,284$).

Srednje vreme trajanja epizode febrilnosti kod svih ispitanika iznosilo je $3,64 \pm 1,26$ dana. Epizode su se javljale na prosečno $3,1 \pm 1,2$ meseca.

Kod osoba sa mutacijama i R202Q/R202Q srednje vreme trajanja epizoda febrilnosti je iznosilo $3,786 \pm 1,38$ dana, a javljale su se na $3,13 \pm 1,02$ meseca. Međutim, vreme pojave febrilnosti je bilo iregularno i bez tačno utvrđenih pokretačkih faktora.

U najčešće i značajne kliničke manifestacije koje su se udruženo javljale sa epizodama povišene temperature kod svih ispitanika, nezavisno od prisustva promena na *MEFV* genu, bile su: abdominalni bol (60%, $p=0,000$, $\Phi=0,493$), limfadenopatija (42,8%, $p=0,001$, $\Phi=0,454$), oligoartralgija (39,3%, $p=0,064$, $\chi^2=0,245$), urtikarijalna ospa (39,3%, $p=0,024$, $\Phi=0,296$), glavobolja (39,3%, $p=0,054$), mijalgija (35,7%, $p=0,002$, $\chi^2=0,413$), malaksalost (32,1%, $p=0,038$, $\chi^2=0,273$), peritonitis (28,6%, $p=0,008$, $\Phi=0,348$) i drugo.

Kod malog broja osoba je klinički bio utvrđen peritonitis (n=9). Peritonitis je bio značajno udružen sa mutacijama *MEFV* gena i R202Q homozigotnim polimorfizmom (p=0,01), kao i pojavom povišene temperature (p=0,008).

Nespecifični abdominalni bol je trajao od nekoliko sati do 2 ili 3 dana, obično jačeg intenziteta u početku tegoba, ponekad praćen povraćanjem, ali je uvek prolazio bez posledica. Kao najčešći uzrok za ove tegobe su se smatrale nepotvrđene virusne infekcije gastrointestinalnog trakta ili trovanje hranom.

Limfadenopatija je podrazumevala uvećane i bolne limfne žlezde na vratu, tonzilitis i/ili apendicitis. Nije bilo značajne razlike u broju izvedenih apendektomija kod osoba sa *MEFV* mutacijama i R202Q/R202Q, u odnosu na osobe bez navedenih promena gena.

Četiri osobe su imale apendicitis praćen operativnim uklanjanjem apendiksa, ali bez značajne povezanosti sa mutacijama i R202Q/R202Q (p=0,072).

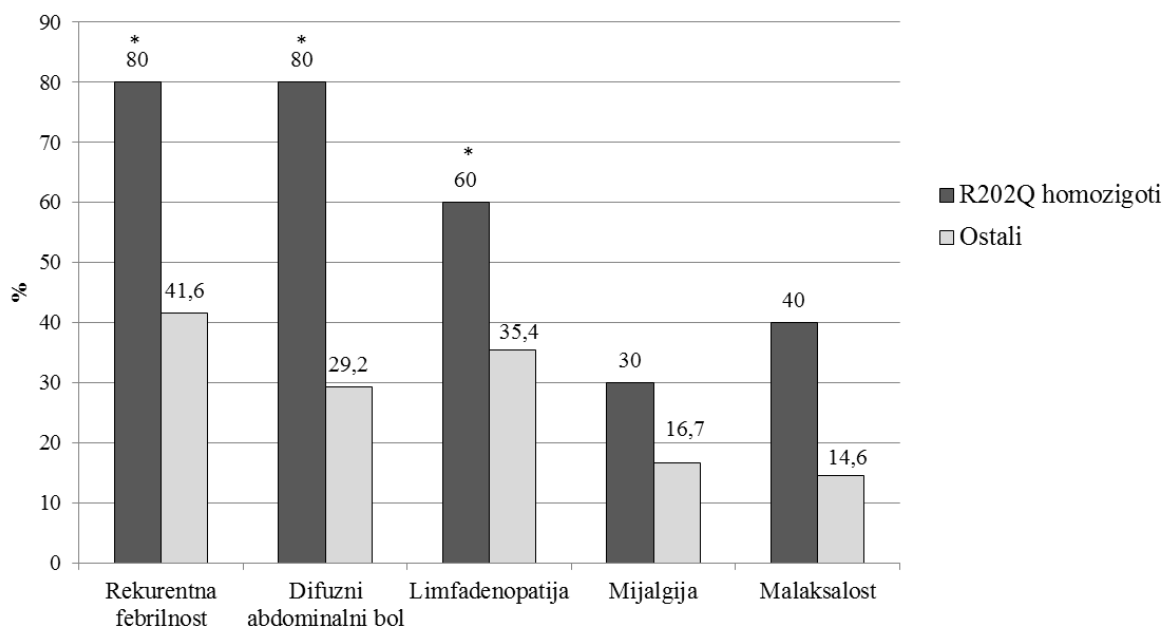
Ni jedna osoba nije navela prisustvo erizipeloidne ospe. Dve osobe sa mutacijama su navele prisustvo difuzne eritematozne ospe koja je pratila pojavu temperature. Ospa je bila prisutna na prednjoj strani grudnog koša ili ekstenzornim stranama ruku i nogu.

Ni jedna osoba nije imala genito-urinarnu infekciju. Time je isključen jedan od mogućih uzroka javljanja ponovljene temperature. Takođe, nije zabeležen gubitak telesne težine ni kod jedne osobe.

Prisustvo čestih febrilnosti u užoj porodici je navelo 37.5% ispitanika sa utvrđenim mutacijama i R202Q/R202Q, ali ovo nije bilo statistički značajno u odnosu na osobe bez navedenih genskih promena (25%).

Osobe sa R202Q homozigotnim polimorfizmom su u odnosu na osobe bez ovih promena značajno češće navodile:

- ponovljene epizode povišene temperature (p=0,022, Phi=0,419),
- difuzni bol u abdomenu (p=0,009, Phi=0,479) i
- limfadenopatiju (p=0,035, Phi=0,385) (Slika 21).



Slika 21. Prisustvo zapaljenskih manifestacija kod R202Q homozigota *MEFV* gena; * $p < 0,04$

Frekvence kliničkih simptoma se nisu značajno razlikovale između nosioca mutacija *MEFV* gena i osoba sa R202Q homozigotnim polimorfizmom.

Prema rezultatima kondicionalne logističke regresione analize ni mutacije ni R202Q alteracije nisu značajno predviđale razvoj najčešće zabeleženih kliničkih manifestacija zapaljenja kod ovih osoba.

5.5.1. Analiza elemenata krvne slike i biohemijske analize krvi

Inflamatorni markeri u krvi se nisu značajno razlikovali između nosioca mutacija i R202Q homozigota *MEFV* gena u odnosu na osobe bez navedenih promena. Kod nosioca mutacija i R202Q homozigotnog polimorfizma vrednosti sedimentacije eritrocita su iznosile $6,66 \pm 3,77$, CRP-a $1,14 \pm 1,004$ mg/L, dok je broj leukocita bio $5,63 \pm 1,43 \cdot 10^9/L$. Kod osoba bez navedenih genskih promena vrednosti sedimentacije eritrocita iznosile su $9,5 \pm 10$, CRP-a $1,2 \pm 2,37$ mg/L i broj leukocita $7,8 \pm 6,11 \cdot 10^9/L$ ($p=0,338$, $p=0,233$ i $p=0,536$ u odnosu na osobe sa promenama *MEFV* gena) (Tabela 14).

Ispitanici nisu imali poremećaje stečenog imuniteta, povećanje titra antitela niti autoantitela. Takođe, vrednosti komponenti komplementa su bile u normalnim granicama.

Tabla 14. Kompletna krvna slika i biohemijske analize krvi

	Nosioci mutacija i R202Q homozigoti	Ostali
Broj leukocita (*10 ⁹ /L)	5,63 ± 1,427	7,8 ± 6,11
Broj eritrocita (*10 ¹² /L)	4,551±0,30	4,466±0,18
Broj trombocita (*10 ⁹ /L)	379,25±91,96	292,5±53,77
SE (mm/h)	6,66 ± 3,77	9,5 ± 10,0
CRP (mg/L)	1,14 ± 1,004	1,2 ± 2,37
Hemoglobin (g/L)	130,17 ± 1,53	130,39 ± 0,99
Hematokrit	35,45±2,68	35,75±1,5
Albumini (g/L)	49,0 ± 5,0	47,0 ± 6,0

SE – sedimentacija eritrocita, CRP – C reaktivni protein

Upoređivanjem parametara oksidativnog stresa sa laboratorijskim inflamatornim pokazateljima, brojem leukocita, sedimentacijom eritrocita i CRP-om, kod osoba sa mutacijama i R202Q/R202Q dobili smo sledeće rezultate:

Tabela 15. Vrednosti Spearmanovog koeficijenta korelacije i vrednost statističke verovatnoće između parametara oksidativnog stresa i biohemijskih pokazatelja zapaljenja kod osoba sa mutacijama *MEFV* gena i R202Q/R202Q polimorfizma

Oksidativni parametri	TBARS u plazmi	TBARS u eritrocitima	AOPP	SOD u plazmi	SOD u eritrocitima	Katalaza
Broj leukocita	rs = 0,407 p = 0,317	rs = 0,838 p = 0,009	rs = - 0,143 p = 0,736	rs = 0,491 p = 0,217	rs = -0,700 p = 0,08	rs = - 0,419 p = 0,301
SE	rs = 0,705 p = 0,051	rs = 0,468 p = 0,289	rs = - 0,383 p = 0,349	rs = 0,798 p = 0,031	rs = - 0,603 p = 0,205	rs = - 0,270 p = 0,558
CRP	rs = 0,543 p = 0,266	rs = - 0,143 p = 0,787	rs = - 0,486 p = 0,329	rs = 0,432 p = 0,333	rs = 0,371 p = 0,468	rs = 0,571 p = 0,180
Albumini	rs = 0,177 p = 0,738	rs = 0,187 p = 0,824	rs = - 0,736 p = 0,096	rs = 0,789 p = 0,035	rs = - 0,116 p = 0,827	rs = -0,543 p = 0,205

SE – sedimentacija eritrocita, CRP – C reaktivni protein

Broj leukocita je značajno i jako pozitivno korelisao sa vrednostima eritrocitne TBARS ($r_s=0,838$, $p=0,009$). Postojala je i značajna jaka pozitivna korelacija između sedimentacije eritrocita i vrednosti SOD u plazmi ($r_s=0,798$, $p=0,031$). Vrednosti sedimentacije eritrocita i plazmatske TBARS su jako pozitivno korelisale, ali su bile na granici statističke značajnosti ($r_s=0,705$, $p=0,051$) (Tabela 15).

Zanimljiv rezultat je jaka negativna korelacija između vrednosti AOPP i albumina ($r_s= - 0,736$, $p=0,096$) iako ne statistički značajna (Tabela 15).

U grupi ispitanika bez mutacija i R202Q homozigotnog polimorfizma zabeležena je značajna pozitivna korelacija vrednosti CRP-a sa katalaznom vrednosti ($r_s=0,479$, $p=0,018$).

6. DISKUSIJA

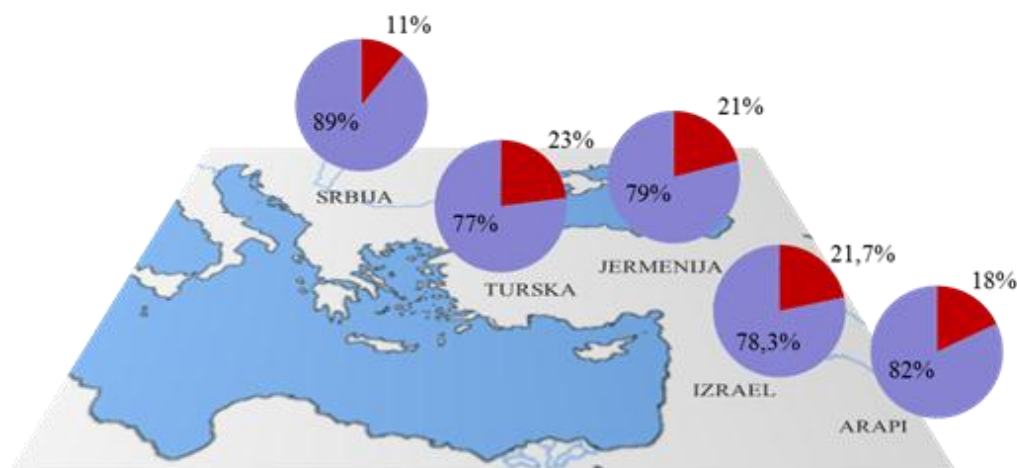
Prevalenca mutacija *MEFV* gena

Funkcija urođenog imunskog sistema predstavlja prvu liniju odbrane organizma od različitih patogena i značajno potpomaže aktivaciju specifične imunske odbrane. Disregulacija urođenog imunskog odgovora uzrokovana različitim faktorima može dovesti do razvoja autoinflamacije, odnosno neregulisane aktivacije ćelija urođenog imuniteta koja prolongira zapaljenje i oštećuje tkiva. *MEFV* gen ima osnovnu ulogu u regulaciji sistemskog inflamatornog odgovora i njegovi poremećaji su opisani u većem broju AIB.

Mutacije *MEFV* gena su predominantno zastupljene u populacijama koje naseljavaju istočni mediteranski basen, odnosno kod Jevreja, Turaka, Arapa i Jermena (82, 83). Međutim, razvojem i mogućnošću primene genetskih testova mutacije se sve češće detektuju i u zemljama izvan ovog regiona, kao što su Grčka, Italija, Nemačka, Poljska, Australija, Kuba, Belgija, Brazil, Egipat i druge zemlje (236, 237). Upotrebom genetskih testova otkriva se sve više bolesnika u populacijama za koje se smatralo da imaju nisku prevalencu mutacija (Slika 22).

Utvrđena frekvenca nosioca mutacija *MEFV* gena od 11% je neočekivana i relativno visoka za zdravu populaciju u Srbiji. *MEFV* mutacije nisu prepoznate u našoj populaciji kao etiološki faktori razvoja bolesti, a FMF se smatra jako retkom za ovo područje. Odsustvo najčešćih mutacija povezanih sa nastankom FMF (M694V, M680I) samo potvrđuje ovu činjenicu. U ispitivanom uzorku srpske populacije utvrđeno je da je 5% ispitanika heterozigotno za mutaciju K695R, dok je 6% imalo heterozigotnu E148Q mutaciju *MEFV* gena.

Različite *MEFV* mutacije dominiraju u različitim populacijama. Distribucija mutiranih alela se razlikuje i među različitim religijskim grupama za koje se zna da se nisu mešale kroz istoriju zbog geografske izolacije i socijalnih običaja (238). Na primer, analizom mutacija u studiji Gerishon i sar. (90) kod Aškenazi Jevreja (istočna Evropa) su utvrđene samo V726A i E148Q, dok su kod marokanskih Jevreja otkrivene samo M694V i E148Q mutacije. Osobe muslimansko-arapskog porekla imaju sve česte *MEFV* mutacije, odnosno M694V, V726A, M680I, M694I i E148Q.



Slika 22. Stope nosioca mutacija *MEFV* gena u zemljama istočnog Mediterana i Srbiji

■ nosioци mutacija ■ osobe bez mutacija

Sa evolutivnog stanovišta Jevreji su se verovatno rano odvojili od ostalih mediteranskih naroda, koji su formirali tri različite populacijske grupe: malo-azijsku (Turci, Jermeni, Sirijci), istočno-evropsku (Arapi, Grci, Italijani) i zapadno-evropsku (Sefardi, Francuzi, Tunižani) (92).

Izraelsko populaciono istraživanje navodi frekvencu nosioca mutacija *MEFV* gena od 22% kod severno-afričkih Jevreja, 39% kod iračkih Jevreja, 21% kod Aškenazi i 6% kod iranskih Jevreja (148). Frekvencija nosioca mutacija među Aškenazi Jevrejima je procenjena na 21% u SAD, sa najvećim procentom E148Q mutacija. Takođe, pokazano je da ova mutacija, zajedno sa P369S i K695R ima redukovanu penetrantnost u ovoj populaciji (239).

Prema epidemiološkim ispitivanjima prevalenca FMF u turskoj populaciji je 1:20 (91). Yilmaz i sar. (91) navode da su najčešće mutacije *MEFV* gena kod FMF bolesnika u Turskoj: M694V (51,5%), M680I (9,2%), E148Q (3,6%), V726A (2,9%) i M694I (0,4%), dok Yalcinkaya i sar. (240) navode sledeće frekvence mutacija: M694V (43,5%), M680I (13,0%), V726A (11,1%) i M694I (2,8%) (Slika 23).

U studiji sa 66 heterozigotnih FMF bolesnika u Turskoj (241) najčešća mutacija bila je M694V kod 32% bolesnika, zatim E148Q sa 20,6%, V726A sa 17% i M680I sa 14,5% mutacija. Najčešća retka zabeležena mutacija bila je P369S (8%), dok su frekvence ostalih retkih mutacija bile: R761H (3%), F479L (3%), A744S (1,5%) i K695R (0,7%). U navedenoj studiji je pokazano da su mutacije E148Q i V726A češće nego je ranije smatrano i uglavnom su bile povezane sa mutacijom M694V.

Pojedini autori naglašavaju da se u turskoj populaciji javljaju teži oblici bolesti sa relativno visokom incidencijom amiloidoze u odnosu na druge etničke grupe. I upravo je FMF najčešći uzrok amiloidoze AA kod Turaka (96, 242).

Pored toga, u studiji Yilmaz i sar. (91) utvrđena je visoka stopa nosioca mutacija u zdravoj populaciji Turske, čak 20%. Distribucija mutacija među zdravom populacijom (M694V 3%, M680I 5%, V726A 2%, M694I 0% i E148Q 12%) se značajno razlikovala od one detektovane kod FMF bolesnika (M694V 51,6%, M680I 9,22%, V726A 2,88%, M694I 0,44% i E148Q 3,55%). E148Q je bila veoma česta u opštoj populaciji (12%), a samo u 3,55% kod FMF bolesnika. Za razliku od toga, M694V mutacija je bila jako česta kod FMF bolesnika (52%) i retka u opštoj populaciji (3%).

Mutacije *MEFV* gena i FMF su smatrane retkim u Grčkoj do nedavno kada su se pojavile studije sa serijama bolesnika (od n=62 (133) i n=26 (19)). U svakodnevnoj kliničkoj praksi FMF se retko dijagnostikuje, međutim smatra se da postoje nedijagnostikovani i pogrešno dijagnostikovani slučajevi bolesti. Takođe, migracija susednih etničkih grupa sa visokom prevalencijom mutacija svakako vrši genetski uticaj na grčku populaciju (100).

Prema studiji Giaglis-a i sar. (92) najčešće mutacije kod bolesnika u grčkoj populaciji su: M694V (38,1%), M680I (19,7%), V726A (12,2%), E148Q (10,9%), E230K (6,1%), K695R (3,4%) i M694I (2,7%). Od retkih mutacija identifikovane su A744S, M680L, R761S i E167D, u heterozigotnom, a E148V i T67I u homozigotnom obliku (Slika 23).

Međutim, od 152 ispitana grčka bolesnika, koji su ispunjavali kliničke dijagnostičke kriterijume za FMF, 16,4% nije imalo ni jednu mutaciju *MEFV* gena iako je ispitana cela sekvenca gena; 40,8% je imalo pojedinačnu mutaciju, dok je 42,8% imalo dva mutirana alela bilo homozigotna ili u složenom heterozigotnom obliku (92).

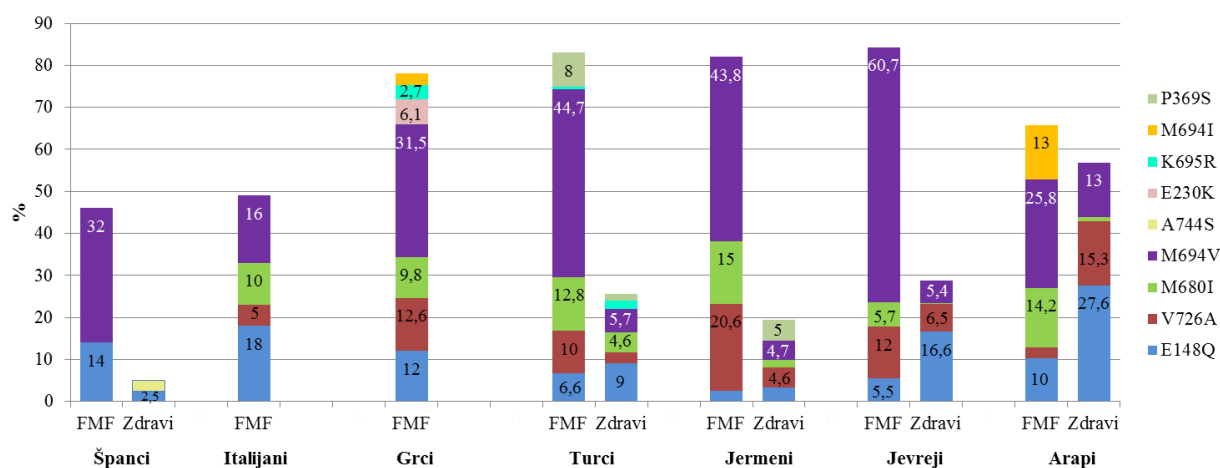
Iako je Italija mediteranska zemlja, sa čestim migracijama stanovništva tokom istorije, postoji generalno mišljenje da su mutacije *MEFV* gena retke i da su Italijani slabo ugroženi sa AIB. Međutim u novije vreme sumnja se da su AIB zastupljenije nego se inače smatra (133). U studiji La Regina i sar. (133) utvrđeno je da je raširenost FMF veća u južnim delovima zemlje i da se često ne dijagnostikuje. Pet najčešćih FMF udruženih mutacija u navedenoj studiji su: M694V, V726A, M680I, M694I i E148Q. M694V je bila najzastupljenija (16%) a potom su sledile E148Q i M680I sa po 14%. Zbog različitog genotipsko/fenotipskog odnosa pretpostavlja se da postoji uticaj i drugih genetskih i/ili modifikujućih faktora spoljašnje sredine u ovoj populaciji.

U istraživanju Cerquaglia i sar. (243) M694V mutacija je bila najčešća u italijanskoj populaciji (41%), zatim su sledile M680I (21%), M694I (20%), E148Q (19%), V726A (13%), R761H (7%) i M680I G>A (5%). Relativno visoku frekvencu su pokazivale mutacija M694I i retka forma M680I (G>A) koje su inače karakteristične za narode Severne Afrike (Magreba).

Prema najnovijim istraživanjima zastupljenosti *MEFV* mutacija u centralnoj Evropi i Balkanu ustanovljena je neočekivano visoka frekvencija mutacija, od 4% do 16%: u Mađarskoj (V726A (1%), K695R (3%)), Sloveniji (V726A (1%), K695R (5%) i E148Q (1%)), Bosni (V726A (1%), K695R (6%) i F756C (1%)), i u Makedoniji (E148Q (8%), K695R (7%) i M694V (1%)). Zanimljivo je da je više od polovine (60%) svih nosioca mutacija u ovim populacijama imalo K695R mutaciju (244).

Značaj mutacija prilično varira među različitim populacijama. Tako je kod Grka prisustvo i pojedinačne mutacije, sa blagim simptomima, jednako dijagnozi FMF-a. Dok nasuprot tome, zbog jako visoke stope nosioca mutacija u populacijama sa najvećom frekvencom bolesti (Jevreji, Arapi, Jermeni i Turci) detekcija mutacija nije obavezno dovoljna za dijagnozu FMF, čak i kada se one nalaze u homozigotnom i složenom heterozigotnom obliku. Takođe, mutacije u egzonu 10 su značajno češće kod FMF bolesnika u odnosu na zdrave osobe (84, 92).

Ipak još jednom se mora naglasiti da mutacije *MEFV* gena nisu striktno vezane za razvoj FMF i da one postoje u više inflamatornih bolesti, odnosno prevladava mišljenje da je posledica mutacija izmenjen rad ćelija urođenog imunskog sistema u pravcu autoinflamacije. *MEFV* mutacije su posebno često udružene sa HSP, ulcerativnim kolitisom, BD i *Crohnovom* bolesti i dr (110, 111).



Slika 23. Zastupljenost mutacija *MEFV* gena kod FMF bolesnika i zdravih u odnosu na populaciju

Prevalenca E148Q mutacije MEFV gena

Genetika vezana za pojavu autoinflamacije je kompleksnija nego se u početku smatralo. Studije u kojima je upoređivan fenotip sa genotipom *MEFV* ukazuju da su neke mutacije „patogenije“ od drugih, ali da klinička ekspresija bolesti široko varira i među bolesnicima sa istim mutacijama. Čak je u određenim studijama frekvencija kliničkih manifestacija bolesti bila viša kod nosilaca složenih heterozigotnih mutacija nego onih koji imaju homozigotni oblik tih istih mutacija (241, 245).

Fenotipska varijabilnost bolesti je bar delimično uslovljena različitošću alela. Mutacije M694V i kompleks V726-E148Q su udružene sa teškim oblikom bolesti, što znači ranim početkom tegoba, visokom učestalošću artritisa i ospe, kao i razvojem amiloidoze (245). Mutacija M680I indukuje umerenu formu bolesti (162), dok mutacije E148Q, K695R, i V726A imaju redukovanu penetrantnost i mnoge osobe koje su homozigotne ili imaju složenu heterozigotnu mutaciju ostaju asimptomatske (90, 239). Redukovana penetrantnost mutacija delimično objašnjava razliku između pretpostavljene frekvence alela, zasnovane na osnovu prevalencije bolesti i ispitanih frekvencija alela u određenoj populaciji.

E148Q je rasprostranjena mutacija *MEFV* gena, koja se često sreće u različitim etničkim grupama sa frekvencom alela od 0,5-21% (133, 239, 246). Ova mutacija je najmanje penetrantna *MEFV* mutacija i izaziva blage efekte autoinflamacije. Češća je u generalnoj populaciji zdravih osoba nego kod FMF bolesnika (84, 246).

U studiji Booth i sar. (86) E148Q mutacija je bila najčešća kako kod RA bolesnika (11,7%) tako i kod zdravih kontrola (12,6%). Ova mutacija je česta i kod BD bolesnika. U studiji Tasliyurt i sar. (119) bila je prisutna kod 14,5% BD bolesnika, a u studiji Touitou i sar. (110) kod 5,2% bolesnika, s tim da je bila zastupljenija kod BD bolesnika u odnosu na FMF bolesnike iz zemalja sa visokom stopom FMF.

Visoka frekvencija E148Q (4-12%) je utvrđena u nekoliko etničkih grupa koje imaju nisku prevalenciju FMF (247). Frekvencija mutantnih alela u generalnoj populaciji Izraela nadmašuje onu pretpostavljenu na osnovu raširenosti bolesti i ukazuje da većina osoba sa ovom genetskom promenama ostaje zdrava. Ovo se najviše pripisuje visokoj frekvenciji mutacija niske penetrantnosti i delimično ulozi modifikujućih faktora (248).

Inter-populacione varijacije E148Q mutacije kod FMF bolesnika u turskoj populaciji se kreću od 3,2-3,9%, srednje vrednosti 5,5%, dok se frekvencija nosilaca ove mutacije procenjuje na 6% (249). Prema drugoj studiji, E148Q je veoma česta u opštoj populaciji Turske (12%), a samo u 3,55% kod FMF bolesnika (91). Prema studiji Giaglis-a i sar. (92)

E148Q spada u najčešće mutacije kod FMF bolesnika u grčkoj populaciji sa zastupljenošću od 10,9%. Interesantno je da je prisutna kod 21% i 15% zdravih Pandžabi Indijaca i Kineza, dve populacije u kojima je klasična forma AIB retka (246).

Može se reći da prisustvo E148Q mutacije u Srbiji odgovara njenoj širokoj rasprostranjenosti u svetu, a da stopa nosilaca mutacija od 6% približno odgovara, odnosno malo je niža, u odnosu na susedne mediteranske narode (Turke i Grke).

Prevalenca K695R mutacija MEFV gena

Malo je literaturnih podataka o K695R mutaciji *MEFV* gena. Za razliku od E148Q, K695R se smatra retkom mutacijom, koja je utvrđena u malom broju FMF bolesnika u različitim etničkim grupama (92, 111, 250).

Kao i mutacije E148Q i V726A, i K695R ima redukovanu penetrantnost, a mnoge osobe koje su homozigoti ili imaju složeni heterozigotni oblik sa ovom mutacijom ostaju asimptomatske (4). Kao i za mutaciju E148Q, redukovana, odnosno nekompletna, penetrantnost K695R je verovatno uzrok da se procenjene frekvence na osnovu prevalencije bolesti i stvarna zastupljenost razlikuju.

K695R mutaciji se pripisuju blage ili srednje teške tegobe kod bolesnika (94, 144, 239). K695R je nađena kao jedina mutacija kod FMF bolesnika, ali i kod asimptomatskih individua. U studiji Kone-Paut i sar. (144) 4% FMF bolesnika mediteranskog porekla je imalo heterozigotnu K695R mutaciju. U studiji Giaglis-a i sar. (92) u grčkoj populaciji K695R je bila retka mutacija sa zastupljenošću od 0,7% kod bolesnika. Takođe, K695R je postojala u 15,6% mutiranih hromozoma kod FMF bolesnika u Španiji (93). U malom procentu je zabeležena kod bolesnika u Italiji (243) i Libanu (238).

K695R je identifikovana kod bolesnika sa ulcerativnim kolitisom koji su imali teže napade ove bolesti (251), kao i kod bolesnika sa MS, posebno onih sa bar jednim simptomom autoinflamacije. Relativno visoka frekvencija K695R alela je utvrđena kod bolesnika sa palindromnim reumatizmom, sa ukupno 6,25% alela (124).

Za razliku od većine ispitivanih populacija K695R je dosta česta kod Jevreja (84). U studiji Aksentijevich i sar. (239) K695R je bila "prekomerno" zastupljena u opštoj populaciji Aškenazi Jevreja (12% hromozoma nosioca) za razliku od FMF bolesnika (5%), te je zaključeno da se radi o redukovanoj penetrantnosti mutacije. Isto tako, bila je prisutna kod 0,5% FMF bolesnika Jevreja severno-afričkog porekla (148).

Utvrđeno je i da je K695R mutacija veoma česta na Balkanu i centralnoj Evropi, gde je činila čak 60% svih mutacija kod zdravih nosilaca (244).

U zdravoj populaciji Turske K695R je identifikovana kod 2% zdravih osoba i 1,2% FMF bolesnika (0,8% kao pojedinačna mutacija i 0,4% u složenom heterozigotnom obliku: E148Q/P369S/K695R i V726A/K695R) (143). U drugoj studiji, frekvencija K695R heterozigotne mutacije je bila 0,7% kod turskih FMF bolesnika (241).

U ovom istraživanju srpske populacije frekvencija K695R (5%) je dosta visoka u odnosu na dostupne podatke drugih populacija, ali je u skladu sa višom prevalencom ove mutacije na Balkanskom poluostrvu.

Prevalenca R202Q polimorfizma MEFV gena

U ovom istraživanju utvrđena je jako visoka stopa nosioca heterozigotnog R202Q polimorfizma (45%), kao i R202Q homozigotnog polimorfizma kod zdravih osoba (10%) u srpskoj populaciji u odnosu na druge studije.

U istraživanju Giaglis i sar. (92) homozigoti za R202Q alteraciju su identifikovani kod 9,2% FMF bolesnika (n=152) i 0,7% zdravih kontrola ($p < 0,001$) u grčkoj populaciji. Heterozigotna R202Q alteracija je bila prisutna kod 31,6% FMF bolesnika i 33,6% zdravih kontrola. Prema ovim istraživačima R202Q homozigotnost je dovoljna za razvoj AIB i može se smatrati bolešću kod Grka. Utvrđeno je da je penetrantnost R202Q homozigotne promene jako visoka (92,3%), s obzirom da je postojao samo jedan homozigot u grupi zdravih kontrola. Relativno odsustvo R202Q homozigota kod zdravih osoba reflektuje potencijalni dozno-zavisni efekat koji je povezan sa razvojem bolesti. *Hardy-Weinbergov* princip je pokazivao jaku devijaciju, ali samo u grupi FMF bolesnika.

U studiji Ritis i sar. (158) homozigotna R202Q promena je detektovana kod 15,5% FMF bolesnika negativnih za mutacije u egzonu 2 i 10, u grčkoj populaciji. Takođe, ni jedna zdrava osoba nije bila homozigot za R202Q, što je bilo statistički značajno u odnosu na FMF bolesnike. U turskoj studiji Ozturk i sar. (161) R202Q homozigoti nisu identifikovani u kontrolnoj grupi ispitanika (n=121) dok je postojala visoka frekvencija R202Q heterozigota. U istraživanju populacije Japanaca čak 95,8% zdravih kontrola je imalo heterozigotnu R202Q promenu i ni jedan homozigotnu (162). Na osnovu slične frekvence alela u kontrolnoj i grupi FMF bolesnika zaključeno je da R202Q promena nije udružena sa nastankom bolesti u španskoj populaciji (93).

U nekim istraživanjima se ovaj polimorfizam nalazio u gametskoj neravnoteži sa M694V mutacijom. Međutim, u drugim studijama, kao što je studija Akar i sar. (157), R202Q

nije bila u gametskoj neravnoteži sa M694V što znači da može samostalno biti udružena sa FMF kod određenih bolesnika (158, 161).

Niska frekvenca R202Q recesivnog fenotipa možda je uporediva sa albinizmom i cističnom fibrozom, autozomnim recesivnim retkim stanjima sa niskom frekvencom recesivnog fenotipa, gde su potrebna dva mutantna alela da bi došlo do ispoljavanja bolesti (252, 253).

Oksidativni stres kod osoba sa promenama *MEFV* gena

Oksidativni stres predstavlja ozbiljni disbalans između produkcije reaktivnih kiseoničnih/azotnih vrsta i nivoa antioksidativne zaštite, a koji izaziva oksidativno oštećenje u ćelijama, tkivima i/ili organima. Produkcija reaktivnih vrsta kiseonika je fiziološki proces, ali njihovo povećanje i disbalans koji stvaraju oksidativni stres utiču i menjaju različite biološke funkcije. Oksidativni stres je često prisutan i važan element u patogenezi inflamatornih i metaboličkih bolesti, kao i ishemijsko-reperfuzione povrede (240, 254).

Pored tipičnih inflamatornih manifestacija u AIB istovremeno postoji i povišen oksidativni stres i to kako tokom perioda akutnog napada, tako i u remisiji bolesti (240).

U skladu sa periodičnom prirodom hronične inflamacije kod bolesnika sa *MEFV* mutacijama, postoje periodične promene u aktivaciji monocita i neutrofila. Neutrofili pokazuju jasnu periodičnost aktivacije, kao i spontane i indukovane oksidativne eksplozije, dok je ova periodičnost kod monocita slabije izražena. Pojačana fagocitna aktivnost i oksidativna eksplozija sa povećanom produkcijom RVK je uočena tokom remisije bolesti dok je stišavanje procesa prisutno u akutnom pogoršanju bolesti (255).

Generalno je dokazano da kod bolesnika sa mutacijama *MEFV* gena, odnosno FMF-om, postoji povećani oksidativni stres kako u napadu tako i u remisiji bolesti (130, 172, 202, 205, 250). Postoji povećanje lipidne peroksidacije i oštećenje antioksidativne zaštite. Serumske vrednosti LP i MDA su povišene, dok su serumske koncentracije α -tokoferola (vitamina E) i b-karotena snižene kod aktivnih FMF bolesnika u odnosu na zdrave osobe (173, 256). Takođe, u periodu akutizacije bolesti rastu markeri oksidativne modifikacije proteina (tiolne i karbonilne grupe), dok se smanjuje aktivnost antioksidativnih enzima (CuZn-SOD, KAT i GPx). Oksidativni markeri oštećenja lipida, proteina i DNK se ne razlikuju značajno u napadu i remisiji kod bolesnika (130, 205).

Totalni anti-oksidantni status (TAS) je niži ili jednak kod bolesnika u remisiji i kontrola. Međutim, totalni oksidantni status i faktor inhibicije migracije makrofaga (MIF) su značajno povišeni, nezavisno od prisustva M694V mutacije. MIF je plejotropni citokin uključen u inflamatorne procese urođenog i stečenog imunskog odgovora. Vrednosti totalnog oksidantnog statusa i MIF pozitivno korelišu što upućuje na agonistički efekat RVK na MIF, dok nepromenjena vrednost TAS možda reflektuje povećani napor protektivnog anti-oksidativnog odgovora kod ovih osoba (130, 205, 257).

Zbog povećanog oksidativnog stresa i uloge RVK u samoj patogenezi bolesti razmatra se upotreba agenasa koji bi blokirali ili kupirali dejstvo RVK ili inhibirali RVK posredovanu produkciju hemokina kod ovih osoba (13).

Tiobarbiturne reagujuće supstance u autoinflamaciji

Kada produkcija slobodnih radikala nadmaši mogućnosti endogenih antioksidantnih sistema dolazi do značajnih oštećenja i smrti ćelija. Pošto je poluživot slobodnih radikala veoma kratak kao mera njihovog prisustva se uzimaju oksidativne promene koje su izazvali na drugim stabilnijim molekulima. Sve vrste molekula su ugrožene dejstvom RVK, međutim lipidi su posebno podložni ovim procesima (175, 191, 205).

Postoji više dijagnostičkih testova za kvantifikovanje krajnjih produkata lipidne peroksidacije, a najčešće upotrebljavani test je test određivanja tiobarbiturnih reaktivnih susptanci (TBARS), odnosno malondialdehida i drugih tiobarbiturnih reagujućih susptanci. Malondialdehid je jedan od krajnjih produkata lipidne peroksidacije. Pošto se ne stvara isključivo kroz proces LP smatra se opštim indikatorom oksidativnog stresa (54, 77).

Plazmatska MDA potiče od peroksidacije plazmatskih lipida, trombocita, endotelnih i drugih ćelija. Njene vrednosti služe kao indirektni pokazatelj tkivne LP, jer produkti LP difunduju iz oštećenih tkiva i ognjišta zapaljenja u cirkulaciju (77, 181, 258). Produkti LP se često nalaze u inflamatornim, autoinflamatornim i autoimunskim bolestima i pokazuju značajno više vrednosti u akutnom periodu bolesti u odnosu na remisiju (77, 259, 260).

Jedan od često korišćenih modela za proučavanje efekata oksidativnog stresa i LP su membrane eritrocita (182). Cirkulišući eritrociti imaju sposobnost da uklanjaju O_2^- i H_2O_2 posredstvom svojih intracelularnih enzimskih mehanizama. Eritrociti efikasno uklanjaju RVK, a njihove membrane su pod stalnim i istovremenim uticajem slobodnih radikala, intracelularnog antioksidativnog sistema i plazmatskih antioksidanata. Za razliku od većine

ćelija eritrociti ne mogu zameniti oksidativno izmenjene lipide iz svojih membrana. Zbog svega toga se smatraju dobrim indikatorom stepena lipidne peroksidacije (66, 191, 205).

Rezultati većeg broja studija su pokazali da autoinflamacija kod bolesnika sa mutacijama *MEFV* gena može povećati lipidnu peroksidaciju (173, 205, 256, 261). Povećana aktivnost fagocita i prevelika produkcija RVK u FMF vodi povećanju nivoa LP, odnosno MDA (173).

Plazmatske vrednosti MDA su značajno povišene kod FMF bolesnika nego kod kontrola, takođe bolesnici sa oštećenjem bubrega (proteinurijom) imaju više vrednosti ovog parametra (261). U istraživanju Sahin i sar. (173) serumske i polimorfonuklearne vrednosti LP su bile povišene u akutnoj fazi kod FMF bolesnika u odnosu na zdrave osobe. Konjugovani dieni, takođe markeri LP, su značajno povišeni kod svih FMF bolesnika, bez obzira na period bolesti, u odnosu na kontrole. U studiji Ediz i sar. (130) nivo MDA je bio značajno povišen u serumu i punoj krvi FMF u akutnoj fazi u odnosu na kontrole i pozitivno je korelisao sa CRP-om.

Zapaženo je da FMF bolesnici imaju značajno više koncentracije TBARS i produkte spontane hemiluminiscencije u plazmi u odnosu na kontrolnu grupu zdravih. Vrednosti ovih parametara dramatično rastu u vreme krize bolesnika. Inače, dominantna reakcija u nastanku hemiluminiscencije humanih ćelija je peroksidacija polinezasićenih masnih kiselina koje najvećim delom potiču od membranskih fosfolipida (256).

Uz to, utvrđeno je da postoji značajna razlika u sastavu membranskih lipida eritrocita kod bolesnika u remisiji i zdravih kontrola. Naime, ovde dolazi do promene klase lipida membrana, sa porastom koncentracije lizofosfatidilholina, monofosfatidilinozitola, fosfatidinske kiseline i kardiolipina, kao i do smanjenja neutralnih fosfolipida. Većina ovih lipida predstavlja kisele fosfolipide i povećane vrednosti odražavaju povećani promet membranskih lipida koji se dešava kao posledica oksidativnog stresa (256). Lipidna peroksidacija utiče na samu patogenezu bolesti tako što indukuje fosfolipazu A2 koja menja funkcije receptora na ćelijskoj membrani, indukuje imunske ćelije i dovodi do sekrecije interleukina iz T ćelija, a može i ciklično povećati LP (262). Navedena istraživanja ukazuju da su FMF bolesnici izloženi povećanom oksidativnom stresu i u remisiji, što se vidi po promeni klasa lipida eritrocitne membrane, pojavom peroksidisanih lipida u plazmi i smanjenoj antioksidativnoj odbrani (256).

Reaktivne molekulske vrste produkovane od strane leukocita takođe učestvuju u patogenezi BD, još jedne bolesti sa često prisutnim mutacijama *MEFV* gena. RVK dovode do povećanog oksidativnog stresa i insuficijencije antioksidantne odbrane, što uz povećanje

fagocitne aktivnosti vodi nastanku teške inflamacije kod ovih osoba. Pokazano je da RVK u BD oštećuju membrane eritrocita i remete antioksidantne enzime (263, 264).

Povećana produkcija RVK kod BD bolesnika se ogleda u povišenim vrednostima plazmatske i eritrocitne MDA. Nivoi MDA u plazmi i eritrocitima su povišeni kod bolesnika u odnosu na kontrole, takođe MDA nivoi su značajno viši u aktivnom stadijumu bolesti u odnosu na remisiju kod BD bolesnika (263-266).

Plazmatske vrednosti TBARS u ovom istraživanju su bile slične između nosioca mutacija *MEFV* gena i R202Q homozigotnog polimorfizma i osoba bez navedenih promena, što ukazuje da generalno ne postoji značajno oštećenje tkiva kod ovih osoba.

Međutim, nosioci *MEFV* mutacija i R202Q homozigoti su imali značajno veće koncentracije eritrocitne TBARS, što sugeriše na postojanje oksidativnog oštećenja membrana ćelija, odnosno povećani uticaj RVK na eritrocite u cirkulaciji. Utvrđene vrednosti eritrocitne i plazmatske TBARS su pozitivno korelisale, kao i vrednosti AOPP sa eritrocitnim TBARS (iako ne statistički značajno: $p=0,073$ i $0,086$), što upućuje na povezanost oksidativnog oštećenja lipida i proteina kod ovih osoba. Značajna korelacija je postojala između eritrocitne TBARS i broja leukocita kod ovih osoba ($p=0,009$). Povećanje eritrocitnih TBARS možda delimično predstavlja rezultat insuficijencije ili potrošnje ćelijske antioksidativne zaštite, jer je utvrđeno da su aktivnosti SOD i katalaze u eritrocitima kod ovih osoba snižene.

Uznapredovali oksidativni proteinski produkti (AOPP)

Albumini predstavljaju veoma važnu antioksidativnu odbrambenu aktivnost u plazmi, posebno njihove tiolne grupe, koje štite ostale makromolekule od oksidativnih promena (267). Uznapredovali oksidativni proteinski produkti su biomarkeri oksidativnog stresa u plazmi i potiču najvećim delom od albumina, a u manjoj meri od fibrinogena i lipoproteina. Oni sadrže unakrsno povezane ditirozinske rezidue koje se formiraju oksidacijom aminokiselina putem RVK u plazmi (268). Normalno se formiraju u malim količinama i uklanjaju iz plazme uz pomoć mononuklearnog fagocitnog sistema u jetri i slezini. Njihove koncentracije postepeno rastu sa starošću osobe (217, 269, 270).

Uznapredovali oksidativni proteinski produkti se takođe smatraju i markerima inflamacije. Visoke vrednosti AOPP su nađene u bolestima kao što su dijabetes, hronična insuficijencija bubrega i druge (54, 269, 271). Utvrđeno je da su nivoi AOPP značajno viši u periodu napada inflamatornih bolesti nego u remisiji i kod kontrola (205, 270, 271).

Dokazano je da je neutrofilni oksidativni potencijal direktno uključen u formiranje AOPP u plazmi i to putem aktivnosti mijeloperoksidaze (MPO), koja je i najviše zastupljena u ovim ćelijama (269, 270). Formiranje AOPP je jasno povezano i doprinosi aktivaciji monocita. U ovom procesu su posebno značajni hlorisani oksidanti, koje stvaraju fagocitne ćelije *in vivo*, aktivnošću enzima MPO, jedinog enzima sposobnog da generiše hlorisane oksidante (241). Pored toga, formiranje AOPP je zavisno od molarnog odnosa albumina i HOCl, a što je opet uslovljeno aktivnošću fagocitne MPO (272).

Dakle, AOPP se smatraju novim markerima oksidativnog stresa i inflamacije. Prema dostupnoj literaturi, nivoi AOPP do sada nisu određivani kod bolesnika sa mutacijama *MEFV* gena niti dijagnostikovanim FMF. Međutim, kao upoređenje mogu poslužiti nivoi proteinskih karbonilnih grupa i slobodnih tiolnih grupa, za koje je utvrđeno da su značajno povišene, odnosno snižene, u akutnom zapaljenskom napadu kod FMF bolesnika (130, 205).

Tiolne (-SH) grupe proteina bivaju relativno brzo oksidisane mnogim RVK. Najveća količina slobodnih tiolnih grupa u plazmi potiče od albumina, a cisteinski bočni lanac je verovatno najpodložnije mesto za dejstvo radikala i može pretrpeti veliki broj različitih modifikacija. Vrednosti slobodnih tiolnih grupa uglavnom opadaju u bolestima sa povišenim oksidativnim stresom (271, 273).

Karbonilne grupe (aldehidi i ketoni) se pod dejstvom oksidanata stvaraju na bočnim lancima aminokiselina proteina (pre svega prolina, arginina, lizina i treonina). Proteinski karbonilni derivati se mogu stvoriti i oksidativnim cepanjem proteina bilo α -amidacionim putem ili oksidacijom glutamilnog bočnog lanca. Pošto mehanizam njihovog stvaranja nije specifičan, odnosno prisustvo karbonilnih grupa nije uvek indikativno za oksidaciju aminokiselina, one se moraju smatrati generalnim markerom oksidativnog stresa. Akumulacija karbonilnih grupa je zabeležena u više različitih bolesti, uključujući: psorijazu, RA, JIA, sistemska amiloidozu, hroničnu uremiju i druge (274).

Prema pojedinim autorima, AOPP imaju prednost u odnosu na druge markere oksidativnog stresa zbog svoje relativno rane formacije, veće stabilnosti i pouzdanosti, kao i dužeg opstanka u krvi (270). U *in vitro* studijama je pokazano da su karbonilne grupe, stvorene dejstvom RVK, stabilna hemijska jedinjenja sa relativno dužim poluživotom od LP produkata (205, 274).

Iako su nivoi AOPP bili povišeni kod nosioca mutacija i R202Q homozigota *MEFV* gena u odnosu na osobe bez navedenih promena u ovom istraživanju, razlike utvrđenih vrednosti AOPP nisu pokazale statističku značajnost. Međutim, pozitivna korelacija između AOPP i eritrocintih TBARS je logična i govori u prilog uticaja slobodnih radikala i

oksidativne promene različitih molekula. Postoji i jaka negativna korelacija između vrednosti AOPP i albumina ($p=0,096$), koja sugerše na potrošnju albumina u formiranju AOPP, odnosno na zaštitna i antioksidativna svojstva albumina.

U studiji Keskin i sar. (270) nivoi AOPP su bili značajno viši u aktivnom stadijumu HSP u odnosu na stadijum remisije i zdrave kontrole. Takođe, nivoi AOPP su bili slični u remisiji i kod zdravih kontrola. Pretpostavlja se da visoki nivoi AOPP u akutnoj fazi HSP imaju patogenetsku ulogu. Vrednosti AOPP su pozitivno korelisale sa bolom u truhu, artritismom, artralgijom, kao i brojem i aktivnošću leukocita i trombocita. Međutim, AOPP nije korelisao sa reaktantima akutne faze zapaljenja. Rezultati u navedenoj studiji su ukazali na povezanost stepena oksidativnog stresa sa prisustvom tegoba od strane GIT i zglobova.

U studiji Witko i sar. (183) AOPP su identifikovani kao markeri oksidativnog stresa u plazmi uremičnih pacijenata na hemodijalizi. U terminalnoj bubrežnoj bolesti kod bolesnika na hemodijalizi postoji hronično inflamatorno stanje. Ponovljene aktivacije neutrofila i monocita u ovoj situaciji rezultuju masivnom produkcijom RVK (O_2^- , H_2O_2 , 1O_2 i OH) i hloriniranih oksidanata kao što je HOCl, kao i povećane produkcije citokina (IL- 1β i TNF- α).

Srednje vrednosti plazmatskog nivoa markera aktivacije monocita (neopterina) i koncentracije AOPP su značajno rasle sa gubitkom bubrežne funkcije. Značaj AOPP u monocitima posredovanom inflamatornom sindromu u uremiji je dokazan postojanjem značajno visoke korelacije između AOPP i markera monocitne aktivacije, uključujući neopterin, IL-1R antagonist, TNF- α i TNF solubilni receptor R55 i R75 (183).

AOPP su sposobni da izazovu oksidativnu eksploziju humanih monocita u kulturi ćelija tako što stimulišu aktivaciju monocitne NADPH oksidaze koja vodi produkciji superoksidnog anjona. AOPP deluju kao medijatori oksidativnog stresa i monocitne oksidativne eksplozije, što pokazuje da su monociti i ciljne i efektorne ćelije imunske disregulacije u hroničnoj uremiji. Prema navedenim autorima (183), akumulacija AOPP sa smanjenjem nivoa GPx ali stabilnom koncentracijom MDA podržava mišljenje da su AOPP precizniji markeri oksidativnog stresa od produkata lipidne peroksidacije (233).

Hlorisani oksidanti neutrofilnog porekla mogu dovesti do oksidativnog stresa i oksidacije proteina i tako uticati na patogenezu BD, ankilozantnog spondilitisa i RA (271, 273, 275). Plazmatska aktivnost MPO i nivoi AOPP su značajno povišeni, dok su slobodne tiolne grupe snižene kod BD bolesnika u odnosu na kontrole, kao i kod akutizacije bolesti u odnosu na remisiju. AOPP se mogu smatrati korisnim markerima monitoringa progresije i težine BD (271). Slično tome, plazmatska aktivnost MPO i AOPP je bila viša, a nivoi slobodnih tiolnih grupa niži, kod AS bolesnika u odnosu na kontrole. Ove razlike su postojale

i između aktivne grupe bolesnika i onih sa perifernim zahvatanjem zglobova u odnosu na inaktivne bolesnike i one sa pretežno spinalnim tegobama. MPO je negativno korelirala sa odnosom tiol/albumini (273). Serumska aktivnost MPO, nivoi AOPP i MDA su bili značajno viši kod RA bolesnika u odnosu na kontrole, dok su vrednosti AOPP i MDA bili značajno viši kod aktivnih RA bolesnika u odnosu na neaktivne. Smatra se da oksidacija proteina može imati značajniju ulogu u patogenezi RA kao što ima i LP (275).

Superoksid dizmutaza

Ćelijska odbrana od oksidativnog stresa se pored hemijskih antioksidanata sastoji i od većeg broja interaktivnih antioksidantnih enzima. Tako na primer, O_2^- prvo biva konvertovan u H_2O_2 i O_2 dejstvom superoksid dizmutaze, a zatim dalje redukovano do vode dejstvom katalaze i različitih peroksidaza.

Protektivni antiksidativni mehanizmi ograničavaju oksidativna oštećenja ćelija. U inflamatornim bolestima RVK mogu izazvati oštećenja leukocita reagujući sa biomolekulima, kao i smanjenjem enzimskih i/ili neenzimskih antioksidanata (173). U akutnoj fazi inflamatornih bolesti antioksidativni enzimi se troše kao kompenzacija u zaštiti od oštećujućih efekata povećane koncentracije RVK (270). Međutim, slobodni kiseonični radikali koji se postepeno ili epizodično oslobađaju tokom inflamacije povećavaju kapacitet antioksidativne zaštite putem indukcije enzimskih odbrambenih sistema koji se potom bolje suprotstavljaju efektima RVK (276). Tako na primer, dodavanje H_2O_2 traheobronhijalnim epitelnim ćelijama *in vitro* izaziva dozno-zavisno povećanje količine iRNK katalaze, GPx i SOD. Ove ćelije odgovaraju na različite oksidativne agense selektivnom indukcijom različitih antioksidantnih enzima (175, 277).

Međutim, suprotni događaji postoje u produženoj i kontinuiranoj inflamaciji, kakva postoji u hroničnim bolestima, gde se ukupni antioksidativni kapacitet, nakon inicijalne indukcije, iscrpljuje i smanjuje usled prevelike potrošnje (276). Ekscesivno oslobađanje RVK od strane mitohondrija, aktiviranih leukocita i endotelnih ćelija u hroničnim inflamatornim stanjima konačno rezultuje teškim oštećenjem ćelija i tkiva, koji nadalje mogu promovisati inflamaciju. Tako na primer, dokazano je da prolongirano oslobađanje RVK u koži kod psorijaznih bolesnika pogoršava inflamatorna oštećenja i promoviše hroničnu inflamaciju. U ovom slučaju antioksidantni sistem se iscrpljuje i nastaje prolongirano stanje oksidativnog stresa (201).

Kao što je već navedeno, postoje tri izoenzima SOD (citoplazmatska SOD1, mitohondrijalna SOD2 i ekstracelularna EC-SOD ili SOD3) (185, 186). U ovom istraživanju ispitivana je ukupna plazmatska i eritrocitna aktivnost SOD, pri čemu je utvrđeno da su plazmatske vrednosti aktivnosti SOD značajno povišene kod nosioca mutacija *MEFV* gena i R202Q homozigota ($p < 0,05$), kao i posebno R202Q homozigota ($p = 0,001$), dok su eritrocitne vrednosti aktivnosti bile snižene u odnosu na osobe bez navedenih promena *MEFV* gena, ali bez statističke značajnosti.

Glavnu SOD u plazmi predstavlja ekstracelularna izoforma enzima. EC-SOD sadrži jedinstveni heparin vezujući domen sa visokim afinitetom za heparan sulfat proteoglikane locirane u glikokaliksu endotelnih ćelija i matriksu vezivnog tkiva, što omogućava lokalizaciju EC-SOD u ekstracelularnom matriksu. Heparin vezujući domen može biti proteolitički uklonjen čime se oslobađa aktivni enzim u ekstracelularnu tečnost. EC-SOD ima relativno dugi poluživot (20h) i jedini je antioksidantni enzim koji se oslobađa ekstracelularno i tu specifično i efikasno uklanja O_2^- . Uklanjanjem superoksida EC-SOD štiti bioaktivnost NO, jer bi u suprotnom O_2^- rapidno reagovao sa NO, smanjio njegovu aktivnost i formirao bi se jaki oksidant – peroksinitrit (ONOO⁻). Inače, NO ima značajnu anti-inflamatornu, antikoagulacionu i vazodilatatornu funkciju (278-280).

Visoka ekspresija i koncentracija EC-SOD postoje u endotelnim ćelijama, alveolarnim tip II ćelijama, plućnim makrofagima, glatkim mišićnim ćelijama, fibroblastnim ćelijskim linijama i dr (188, 189, 278). EC-SOD je prisutna i u fagocitnim ćelijama (neutrofilima i makrofagima) u vezikulama vezanim za ćelijsku membranu (199). Pored ekstracelularne tečnosti, EC-SOD je zastupljena u određenim tkivima uključujući krvne sudove, srce, pluća, bubrege i placentu. Ima ulogu u regulaciji vaskularne kontrakcije, delimično kroz modulaciju endotelne funkcije i to kontrolom nivoa ekstracelularnog O_2^- i NO, jer O_2^- produkovan inflamatornim ćelijama značajno doprinosi oksidativnom stresu vaskularnog zida (279).

Zanimljivo je da se, za razliku od drugih antioksidantnih enzima, indukcija i regulacija EC-SOD primarno dešavaju pod uticajem citokina, a ne njenim supstratom (O_2^-) ili drugim oksidantima. Proinflamatorni cikokini TNF- α , INF- γ i IL-1 su potentni indukujući agensi ekspresije EC-SOD, najverovatnije preko NF- κ B signalnog puta (175, 278, 281).

Pored zaštite od superoksidom posredovanog oštećenja, EC-SOD učestvuje u modulaciji imunskog odgovora na bakterijske infekcije i odstranjivanju bakterija tako što promoviše fagocitozu makrofaga, dok njen nedostatak remeti funkciju makrofaga (199). Navedene karakteristike EC-SOD pokazuju da se ovaj enzim nalazi između interaktivnih

puteva inflamatornog odgovora, oksido-reduktivnih procesa i endotelne funkcije, što samo potvrđuje da su ovi procesi nerazdvojni.

U više studija je pokazano da EC-SOD poseduje „zaštitnu” ulogu, u smislu modulacije oksidativne povrede i inflamacije, na primer kod kardiovaskularnih i plućnih bolesti, oštećenja mozga, hipoksičnog oštećenja bubrega, artritisa (199, 278, 280, 282). EC-SOD modulira oksidativni stres, inflamaciju i fibrozu pluća tako što stišava inflamaciju i neutrofilni influks. Jedan od mogućih mehanizama je njena interakcija sa kolagenom ekstracelularnog matriksa čime se smanjuje produkcija kolagenih fragmenata a koji predstavljaju neutrofilne hemoatraktante (281).

EC-SOD ublažava inflamatorni artritis kod animalnih modela bolesti. Životinje kod kojih je postojala veća ekspresija EC-SOD su imale značajno manju infiltraciju inflamatornih ćelija sinovijalne membrane, otok zglobova i aktivnost gelatinaze (280). S druge strane, nedostatak EC-SOD dovodi do razvoja težeg oblika kolagen-indukovanog artritisa, sa povećanom produkcijom proinflamatornih citokina u zglobovima: IFN- γ , TNF- α , IL-1 β ; i smanjenom produkcijom antiinflamatornih citokina: IL-1Ra (282).

Efikasna modulacija inflamacije posredovana sa EC-SOD, sa smanjenjem neutrofilne infiltracije već za 4h, može se objasniti mehanizmima smanjenja makrofagnog oslobađanja citokina i uklanjanjem superoksida. Naime, teška neutrofilna inflamacija pluća postoji kod EC-SOD deficijentnih miševa, sa većom koncentracijom TNF- α i MIP-2 i većom ekspresijom interćelijskog adhezionog molekula 1 (ICAM1), vaskularnog ćelijskog adhezionog molekula 1 (VCAM1) i p-selektina u plućima. Dok se kod onih sa prekomernom ekspresijom EC-SOD inflamacija pluća stišavala sa padom svih navedenih parametara (281).

U *in vitro* uslovima, EC-SOD je inhibirala oslobađanje citokina u ćelijskoj liniji makrofaga, međutim nije uticala na ekspresiju adhezionih molekula u kulturi endotelnih ćelija. Poznato je da u ekspresiji adhezionih molekula učestvuju RVK, tako što povećavaju endotelnu ekspresiju ICAM-1 i agiotenzin II indukovanu ekspresiju VCAM-1, dok je superoksid specifično uključen u regulaciju ekspresije selektina. Pokazano je da NADPH oksidaza stvoreni RVK doprinose TNF- α posredovanoj aktivaciji NF- κ B i ekspresiji vaskularnih adhezionih molekula (283). Pošto LPS ne izaziva značajnu produkciju O₂⁻ iz endotelnih ćelija *in vitro*, verovatno da ovaj molekul potiče iz drugih ćelija tkiva pluća, odnosno fagocita (281). Tako da pored smanjenja produkcije citokina, EC-SOD otežava infiltraciju neutrofila uklanjanjem O₂⁻ makrofaga i sprečavanjem formiranja drugih RVK, a koji su neophodni za ekspresiju adhezionih molekula na endotelu.

EC-SOD deficijenti miševi pokazuju preveliku, IL-23 posredovanu, inflamaciju kože nalik psorijazi, sa povećanom infiltracijom imunskih ćelija i visokim nivoima proinflamatornih citokina. Takođe, smanjena ekspresija EC-SOD postoji kod bolesnika sa psorijazom (201, 278).

Porast nivoa ekspresije EC-SOD u različitim eksperimentalnim modelima bolesti (hemijski indukovanom dijabetesu, hipertenziji i inflamatornom artritisu) je smanjio oksidativni stres, poboljšao stanje i postavio EC-SOD kao centralni terapijski cilj (279).

Takođe, opisano je da povišene plazmatske vrednosti ukupne i EC-SOD aktivnosti kod kancerskih bolesnika odražavaju odgovor organizma na povišeni oksidativni stres i pokazale su se kao senzitivni marker inflamatornog procesa (284, 285).

U istraživanju BD, bolesnicima su utvrđene povišene serumske aktivnosti SOD i GPx, kao i nivoa MDA, u odnosu na zdrave osobe. Bolesnici sa aktivnim okularnim tegobama su imali značajno više vrednosti serumske SOD u odnosu na bolesnike bez ovih tegoba (286). Međutim, u studiji Yildirim i sar. (287) nisu nađene značajne razlike između serumskih vrednosti CuZn-SOD, MDA, SE kao i CRP kod stabilnih FMF bolesnika na terapiji kolhicinom u odnosu na zdrave kontrole.

Nasuprot porastu vrednosti EC-SOD u plazmi, u određenim istraživanjima se kao razlog porasta aktivnosti ovog enzima navodi SOD1, pre svega zbog akutnog zapaljenja i hiperprodukcije enzima, kao i oštećenja tkiva te oslobađanja intracelularne forme enzima (285, 288, 289).

Povećane ukupne serumske vrednosti SOD su zabeležene kod različitih bolesti (neoplazme, primarne bilijarne ciroze i adultnog respiratornog distres sindroma) (290). Bolesnici sa sistemskom sklerozom i/ili Rejnovim fenomenom imaju posebno visoku plazmatsku aktivnost SOD. Mikrovaskularno oštećenje slobodnim radikalima učestvuje u patogenezi sistemske skleroze. Oštećene endotelne ćelije oslobađaju citokine koji podstiču fibrozu, dok se zbog ishemije ksantin dehidrogenaza konvertuje u oksidazu i produkuje velike količine O_2^- . Povećani RVK se smatraju odgovornim za indukciju antioksidantne odbrane, odnosno povećanje vrednosti antioksidantnih enzima pa i SOD u plazmi (290).

Povišena aktivnost plazmatske SOD je nađena u teškim formama akutnog apendicitisa i indikovala je povećanu neutrofilnu infiltraciju tkiva i inflamaciju. Naime, produžena aktivacija leukocita dovodi do intenzivne produkcije RVK, a istovremeno sinteza SOD je stimulisana kao adaptivni odgovor ćelija. Međutim, veruje se da kada antioksidativni sistem

nije više u stanju da neutrališe RVK, membrane leukocita se oštećuju i SOD počinje da se povećano oslobađa u ekstracelularni prostor (288).

Trenutno nema velikog broja istraživanja vezanih za plazmatske koncentracije ili aktivnost SOD u AIB, kod FMF bolesnika ili nosioca *MEFV* mutacija. S obzirom da uklanja ekstracelularni O_2^- i stišava inflamaciju (smanjuje otpuštanje citokina iz makrofaga i remeti adheziju leukocita) značajno povišena plazmatska aktivnost SOD kod nosioca *MEFV* mutacija i R202Q homozigota u ovom istraživanju je možda rezultat povećane indukcije EC-SOD kao adaptivnog odgovora, pošto ćelije sa izmenjenom funkcijom pirina, odnosno disregulacijom inflamazoma, spontano produkuju veće količine O_2^- i brže oslobađaju IL-1 β . Takođe, pošto je IL-1 β potentni induktor ekspresije EC-SOD, moguće je da kod osoba sa promenama *MEFV* gena postoji produžena stimulacija ove ekspresije.

Veće oslobađanje intracelularne SOD je manje verovatni mehanizam povećanja plazmatske aktivnosti SOD u ovom slučaju, jer se broj leukocita nije značajno razlikovao kod osoba sa i bez navedenih promena *MEFV* gena.

Citozolna Cu/Zn-SOD ili SOD1 je glavni enzim koji uklanja O_2^- u ćelijama. Ekspresija SOD1 raste kao odgovor na veći broj različitih stimulusa, kao što su joni metala, HSP90 (*heat shock* proteini), UVB i X zračenje, H_2O_2 , NO i dr. Tako na primer, povećanje SOD1 u makrofagima nastaje oksidativnim stresom uzrokovanim UVB radijacijom i hiperoksijom. Za razliku od EC-SOD, SOD1 ima kratki poluživot i negativno naelektrisanje koje onemogućava njeno vezivanje za spoljašnju površinu ćelije i kretanje kroz intersticijalni prostor (281, 291). Povećani nivo SOD1 utiče na potencijal ćelije da se izbori sa povećanom produkcijom superoksidnog radikala. Ovo ne znači da se oksido-reduktivni status ćelije menja već se povećava sposobnost za održanje stabilnog stajna oksido-reduktivne ravnoteže usled povećane produkcije O_2^- (291).

Promene u aktivnosti SOD1 utiču na inflamatorni odgovor. U fiziološkim uslovima, nakon aktivacije makrofaga postoji pozitivna povratna sprega između TNF- α i SOD1, koja omogućava optimalnu efikasnost ovih ćelija. Naime, aktivatori makrofaga (LPS) indukuju ekspresiju i SOD1 i TNF- α , TNF- α indukuje SOD1 i produkciju RVK, dok povećanje SOD1 omogućava aktiviranim makrofagima da se suprotstave povećanom oksidativnom stresu i kao rezultat povećaju sekreciju TNF- α (281, 291).

Veliki broj istraživanja ukazuje da familija SOD enzima smanjuje inflamaciju *in vivo*. Pokazano je da SOD1 i 2 štite od inflamacije pluća indukovane hiperoksijom kod animalnih

modela bolesti. Takođe, neuroprotektivno svojstvo SOD1 se pripisuje modifikaciji ili stišavanju moždane inflamacije i povrede (176, 281).

Stabilna prekomerna ekspresija SOD1 izaziva značajno smanjenje produkcije O_2^- i NO, a povećanje H_2O_2 , u *in vitro* mikroglijalnim ćelijama nakon stimulacije. Aktivacija NF- κ B i oslobađanje TNF- α i IL-6 su takođe značajno smanjeni. Suprotno tome, akutna inhibicija aktivnosti SOD1 je bila udružena sa povećanjem NO i oslobađanjem citokina i povećanjem neurotoksičnosti. Sve ovo ukazuje na centralnu ulogu O_2^- u usmeravanju redoks senzitivnih inflamatornih signalnih puteva (176).

Međutim, postoje kontradiktorni rezultati studija sa peritonealnim makrofagima i intestinalnim neutrofilima koji samo potvrđuju da je uloga RVK kompleksna i verovatno zavisna od tipa ispitivanih ćelija kao i uslova mikrosredine (281, 291).

Aktivnost eritrocitne CuZn-SOD kod BD bolesnika u različitim studijama je bila povišena, snižena ili bez značajnih promena (263, 286, 292). Povećanje aktivnosti SOD u eritrocitima je utvrđeno kod BD bolesnika u aktivnoj fazi bolesti ili kod novo dijagnostikovanih slučajeva, verovatno kao inicijalni kompenzatorni odgovor na prekomernu produkciju O_2^- (66, 263). Dok u prilog vremenskog iscrpljenja funkcije ovog enzima govore rezultati studije Harzallah i sar. (266) u kojoj su snižene vrednosti eritrocitne SOD kod BD bolesnika negativno korelisale sa dužinom i aktivnošću bolesti.

U više studija je utvrđeno da FMF bolesnici imaju značajno snižene aktivnosti intraćelijske CuZn-SOD u periodu napada bolesti. U studiji Guzel i sar. (205) snižena aktivnost SOD je pozitivno korelisala sa nivoom lipidnih hidroperoksida (130, 173, 205).

Slično našim rezultatima u studiji Gurbuz i sar. (261) vrednosti aktivnosti eritrocitne SOD kod FMF bolesnika su bile niže nego u grupi zdravih kontrola ali ne statistički značajno.

I kod RA bolesnika su, pored ostalih antioksidanata, nivoi CuZn SOD značajno smanjeni. Kod onih sa većom aktivnošću bolesti postoji povećan stepen oksidacije različitih molekula (lipida, proteina i DNK) verovatno usled iscrpljenja antioksidativne zaštite (205).

Pored navedenih AIB, smanjenje intraćelijske antioksidativne aktivnosti ili totalnog antioksidativnog kapaciteta krvi je zabeleženo kod bolesnika sa psorijazom i bolesnika sa kancerom (želuca, cerviksa uterusa, malignog limfoma) (191, 201, 260, 264, 265).

Snižene vrednosti eritrocitne SOD aktivnosti kod nosioca mutacija *MEFV* gena i R202Q homozigota u ovom istraživanju su u skladu sa drugim istraživanjima inflamatornih bolesti i moguće je da su posledica utroška enzima, odnosno "iscrpljenja" antioksidativne zaštite.

Katalaza

Katalaza je antioksidativni enzim, široko zastupljen u aerobnim ćelijama, a koji katalizuje razgradnju H_2O_2 , visoko reaktivnog nusprodukta metabolizma. H_2O_2 je završni produkt više oksidaznih i superoksid dizmutaznih reakcija. Njegova prekomerna produkcija može biti smrtonosna za ćelije, jer nagomilavanje H_2O_2 dovodi do oštećenja putem oksidacije lipida, proteina i DNK ili mutageneze (293, 294). Uloga H_2O_2 u bolestima sa oksidativnim stresom (inflamacija, kancer, dijabetes, kardiovaskularne bolesti, anemija, neurodegenerativne bolesti) je značajna i veliki broj istraživanja se bavio ovim problemom (191, 293, 295).

Katalaza direktno učestvuje u procesima uklanjanja RVK i zbog visoke aktivnosti u eritrocitima smatra se da značajno doprinosi zaštiti ovih ćelija od oksidativnog stresa, pre svega lipidne peroksidacije (178, 190). Smanjena aktivnost katalaze kod kancerskih bolesnika koreliše sa povećanom lipidnom peroksidacijom (191).

Kao i ostali antioksidativni enzimi katalaza učestvuje u adaptivnom odgovoru ćelije na oksidativni stres pa se njena koncentracija i aktivnost povećavaju u ovim stanjima (175). U animalnom modelu artritisa životinje sa veštački prekomernom ekspresijom katalaze su imale manju infiltraciju inflamatornim ćelijama sinovijalne membrane i manji otok kolenog zgloba, što je ukazivalo na smirivanje bolesti (280). Međutim, u određenim uslovima postoji smanjenje funkcije katalaze kod inflamatornih bolesti, moguće zbog prevelikog utroška ili prevelike koncentracije H_2O_2 koja inhibira KAT i GPx (130, 205).

Utvrđeno je da FMF bolesnici imaju značajno niže aktivnosti katalaze u periodu napada bolesti (130, 205). Jedno od objašnjenja je inaktivacija enzima zbog jako visoke koncentracije H_2O_2 . Pored toga, utvrđene su značajno niže aktivnosti ovog enzima kod bolesnika sa BD i RA u odnosu na kontrole (130, 260, 292). Smanjenje aktivnosti katalaze kod BD bolesnika se objašnjava uticajem RVK produkovanih od strane neutrofila u aktivnoj fazi bolesti, kao i uticajem ostalih toksičnih oksidantnih produkata (292).

Slično eritrocitnoj SOD, aktivnost katalaze je bila snižena kod nosioca *MEFV* mutacija i R202Q homozigota u ovom istraživanju ali ne statistički značajno.

Sveukupno gledano, nosioci E148Q i K695R mutacija, kao i R202Q homozigoti, imaju blage promene parametara oksidativnog stresa (povećanje AOPP i eritrocitnih TBARS, povećanje aktivnosti plazmatske SOD i smanjenje eritrocitnih SOD i KAT). U dugoročnom periodu ovo bi mogao biti jedan od faktora rizika češćeg razvoja inflamatornih i imunskih bolesti kod ovih osoba.

Kliničke zapaljenske manifestacije kod osoba sa mutacijama i R202Q polimorfizmom *MEFV* gena

Klinički spektrom udužen sa mutacijama *MEFV* gena obuhvata slučajev tipičnih manifestacija autoinflamacije u potpuno razvijenoj bolesti do asimptomatskih stanja. Zbog jako šarolike kliničke prezentacije molekularna analiza *MEFV* gena pruža značajnu praktičnu pomoć. Međutim, dijagnoza AIB se još uvek bazira na kliničkim zapaljenskim manifestacijama, zbog toga što genetska analiza nije dostupna svima i jer se u određenom broju bolesnika ne mogu utvrditi ove mutacije.

Tel Hashomer kriterijumi se najčešće koriste za postavljanje kliničke dijagnoze FMF i dele se u grupu glavnih (major) i sporednih (minor) kriterijuma (75). U glavne kriterijume spada tipični napad bolesti definisan kao febrilna ($\geq 38^{\circ}\text{C}$) rekurentna epizoda (≥ 3 iste vrste) kratkog trajanja (od 12h do 3 dana). Visoka temperatura može biti jedina manifestacija inflamatorne epizode, ali se često javljaju i inflamacije sinovijalnih i seroznih membrana, odnosno peritonitis, pleuritis ili perikarditis i monoartritis (kuk, koleno, skočni zglob). U poseban glavni kriterijum spada inkompletni abdominalni napad koji podseća na akutni abdomen. U grupu sporednih (minor) kriterijuma se ubrajaju inkompletni napadi akutnog zapaljenja u grudnom košu ili zglobovima, bol u mišićima nogu izazvan naprezanjem, kao i pozitivan odgovor na terapiju kolhicinom. Za dijagnozu je potrebno da bude ispunjeno više od 1 glavnog kriterijuma ili više od 2 sporedna (13, 296). Međutim, ovi kriterijumi imaju određena ograničenja posebno ako se koriste u zemljama sa slabom prevalencom bolesti. Dijagnoza bi trebalo da se uzme u obzir kod bolesnika sa etničkim poreklom iz zemalja istočnog Mediterana i rekurentnim inflamatornim epizodama. Dijagnostički test sa tretmanom kolhicinom je deo ispitivanja bolesnika sa atipičnim simptomima. Genetska ispitivanja atipičnih slučajeva verifikuju dijagnozu, međutim negativan test na mutacije ne isključuje postojanje bolesti jer su mutacije u oba alela *MEFV* gena prisutne u najviše 2/3 FMF bolesnika (13).

Iako se Tel Hashomer kriterijumima uspešno postavlja dijagnoza kod odraslih bolesnika specifičnost kriterijuma je mala kod dece (54,6%). Razlog ovome je što se ispoljavanje tegoba, koje su definisane kao kriterijumi, može drugačije manifestovati kod dece (296).

Predloženi novi pedijatrijski kriterijumi za dijagnozu FMF kod dece podrazumevaju povišenu temperaturu, abdominalni bol, bol u grudima, artritis i porodičnu istoriju FMF bolesti. Prisustvo dva ili više elementa ovog kriterijuma postavlja dijagnozu FMF kod dece sa

senzitivnošću od 86,5% i specifičnošću od 93,6%. Međutim, navedeni kriterijumi nisu validirani u populacijama sa manjom učestalošću bolesti (296).

Klinički početak FMF je u preko 80% slučajeva pre 20 godine života (297). Dijagnoza bolesti kod dece nije uvek jednostavna. Postoje teškoće u razlikovanju početka naslednih periodičnih febrilnih sindroma od PFAPA sindroma ili od rekurentnih respiratornih infekcija, pa čak i od primarnih imunodeficijencija. Prema studiji Padeh-a i sar. (298) najčešći simptomi na početku bolesti su abdominalni bol, artritis i bol u grudnom košu. Glavni diferencijalno dijagnostički problem može biti inflamatorna bolest creva, što naglašava značaj intestinalnih simptoma u kliničkoj slici (299). Kao udružene bolesti mogu se javiti: HSP, Kawasaki sindrom, aftozni stomatitis, glavobolja i anemija (133).

Srednje vreme kašnjenja postavljanja prave dijagnoze je oko 11,5 godina u Grčkoj čime se ove osobe stavljaju pod rizik nepotrebnih operacija ili letalnih komplikacija posledica amiloidoze (92).

Uticao dodatnih, još uvek nedovoljno poznatih faktora, na ispoljavanje bolesti se ogleda u širokoj intra- i inter- familijarnoj varijabilnosti među osobama sa identičnim genotipom, kao i činjenici da među osobama koje nose "blage" mutacije neke nemaju simptome dok se kod drugih javljaju nespecifične zapaljenske manifestacije (239).

Tipične zapaljenske manifestacije kod bolesnika sa MEFV mutacijama

Povišena temperatura je važan adaptivni mehanizam u borbi protiv infekcija. Međutim u stanjima u kojima postoji poremećaj rada urođenog imunskog sistema, sa spontanom aktivnošću inflamazoma, produženo ili često javljanje temperature i inflamacije može izazvati oštećenje ćelija i tkiva (202).

Najčešće kliničke manifestacije bolesnika sa *MEFV* mutacijama za vreme akutizacije bolesti su povišena temperatura i bol u abdomenu zbog peritonitisa (13, 45). Ovi simptomi su prisutni ne samo kod homozigota sa najčešćim mutacijama već i kod nosioca složenih heterozigotnih kompleksa (92, 241). Tako na primer u studiji Yilmaz i sar. (91) skoro svi FMF bolesnici su imali povišenu temperaturu u periodu napada bolesti, dok je zastupljenost ostalih kliničkih karakteristika bila sledeća: peritonitis kod 92%, artritis 75,2%, bol u grudima 37,9% i vaskulitisa ospa kod 11,67% bolesnika.

U kliničkoj slici akutne epizode FMF bolesnika grčke populacije (n=127) dominirao je abdominalni bol (92,1%), potom povišena temperatura (85,8%), monoartritis (18,1%), bol u grudima (11%) i drugi. Amiloidoza je zabeležena u 3,1% slučajeva (92).

U istraživanju FMF u italijanskoj populaciji (n=71) simptomi napada bolesti su bili veoma raznovrsni, nisu se uvek isto prezentovali u smislu određenih simptoma, učestalosti i trajanja kod istog bolesnika. 92% bolesnika je imalo povišenu temperaturu tokom napada, dok je 8,5% imalo inflamatorni napad bez povišene temperature. Drugi najčešći znak bio je abdominalni bol kod 91% bolesnika. Bolove u zglobovima je navodilo 63,5%, a bol u grudima, pleuralni ili perikardijalni, je bio prisutan kod 52% bolesnika. Kod 60% bolesnika, abdominalni, torakalni i artikularni bol se javljao istovremeno u periodu napada (133).

U drugoj studiji italijanskih bolesnika (243) polovina bolesnika je imala umereni fenotip bolesti, trećina blagi i samo 15% teški oblik bolesti.

Redi simptomi FMF su erizipeloidni eritem, najčešće na stopalima i nogama, kao i vežbanjem izazvana mijalgija (300). Povremeni simptomi bolesti kod FMF bolesnika su mogući u „mirnom“ periodu. Neke osobe doživljavaju tešku mijalgiju izazvanu vežbanjem koja im remeti kvalitet života (133), dok drugi imaju subkliničku inflamaciju i povišen oksidativni stres tokom perioda remisije (130, 131, 173, 205). Specifični element kliničke sumnje na AIB je rana apendektomija bez prestanka napada “akutnog abdomena” (133).

U toku napada bolesti kod FMF bolesnika sa mutacijama *MEFV* gena postoji povećanje koncentracije parametara akutnog odgovora organizma (87,154, 205, 301). Kriza bolesti se karakteriše masivnim influsom polimorfonuklearnih leukocita u tkiva zahvaćena zapaljenjem. Standardni laboratorijski testovi ne daju puno podataka, osim visoke stope SE i broja leukocita. Međutim, tokom i odmah nakon napada dolazi do pada koncentracije albumina i porasta koncentracije fibrinogena, CRP-a, beta2 i alfa2 globulina, haptoglobina i lipoproteina (104, 154, 237, 300). Postoji pozitivna korelacija vrednosti SE i broja leukocita, kao i fibrinogena i oksidativnog oštećenja proteina (205). Pored toga, opisana je pojava imunoloških abnormalnosti tokom napada, među kojima je smanjenje aktivnosti supresornih T-ćelija, povećanje ukupne aktivnosti komplementa i povećanje IgG, IgA i IgM (154, 237). Na primer u studiji Medlej-Hashim i sar. (300) 23% bolesnika je imalo povišen IgA, 13% IgM, 17% IgG i 13% IgD. Sekretija proinflamatornih citokina je pojačana tokom napada, dok u remisiji može biti ista ili blago povišena u odnosu na zdrave osobe (302).

Kod oko 25% bolesnika sa FMF zabeleženo je postojanje subkliničke inflamacije u periodima između napada bolesti. Visok nivo SE i CRP kod nekih bolesnika u remisiji se upravo povezuje sa postojanjem ove kontinuirane inflamacije (131, 257, 302, 303). Takođe, pretpostavlja se da je niski stepen inflamacije prisutan pre nastanka tipične krize (130). U studiji Notarnicola i sar. (302) nivoi TNF- α , IL-1 β , IL-6 i IL-8 u leukocitima su bili značajno

povišeni kod bolesnika sa mutacijama *MEFV* gena u remisiji u odnosu na zdrave kontrole. Takođe, nivoi iRNK ovih citokina su bili značajno viši i nisu se razlikovali u odnosu na tip prisutne mutacije, odnosno genotip. Pretpostavlja se da postoji disregulacija transkripcije citokina u mirovanju kod nosioca mutacija i da ovo stanje predstavlja “predaktivaciju” koja progredira u akutnu inflamaciju nakon odgovarajuće stimulacije.

Zapaljenske manifestacije kod bolesnika sa heterozigotnim MEFV mutacijama

U uvodu je istaknuto da se razvoj autoinflamacije može javiti kod homozigota i heterozigota za mutacije *MEFV* gena, a da čak do 40% FMF bolesnika ima heterozigotnu mutaciju. Međutim, heterozigotne mutacije postoje i kod zdravih osoba – nosioca mutacija (143).

U studiji FMF bolesnika sa složenim heterozigotnim mutacijama utvrđeno je da je čak 96,5% imalo ponovljene febrilnosti, 98,5% abdominalni bol, 85% artralgiiju, 45,5% bol u grudima i 23% erizipeloidnu leziju. Ni jedan bolesnik nije razvio amiloidozu bubrega. Pored toga, frekvencija pojave groznice, abdominalnog bola, bola u grudima, artralgiije, artritisa i mijalgije je bila veća kod osoba sa složenim heterozigotnim genotipom nego onih koji su imali istovetne mutacije u homozigotnom obliku (241).

I u studiji Marek-Yagel i sar. (118) prominentne manifestacije prisutne kod svih heterozigotnih FMF bolesnika (M694V, V726A, P369S) bile su povišena temperatura i abdominalni bol. Artritis i erizipeloidna ospa su bili retki i nije bilo amiloidoze. Simptomi bolesti su bili blagi kod većine bolesnika.

FMF bolesnici sa pojedinačnom mutacijom nisu fenotipski homogena grupa. Moguće je da se klinička slika sastoji od kratkih retkih napada (jednom godišnje) pa do prolongiranih napada svakog drugog meseca sa produženom febrilnom mijalgijom, što je zabeleženo kod bolesnika sa E148Q mutacijom (127).

Pored najčešće visoke temperature i peritonitisa heterozigotni FMF bolesnici u studiji Kone-Paut i sar. (304) su imali artralgiiju skočnog ili kolenog zgloba (53%), vežbanjem indukovanu mijalgiju (27%) i bol u grudima (25%). Ospa je bila prisutna kod 20% bolesnika (od toga 27% erizipeloidna), hronični abdominalni bol kod 12% i cervikalna limfadenopatija kod 9%. Glavne tegobe ovih bolesnika su bile slične kao kod bolesnika sa homozigotnim mutacijama, ali neke karakteristike su bile manje tipične. Napadi groznice su trajali preko 3 dana u 37% slučajeva, erizipeloidna ospa je bila prisutna u trećini slučajeva svih ospi i 10%

bolesnika je imalo limfadenopatiju od kojih je četvero imalo simptome tipične za PFAPA sindrom.

Zapaljenske manifestacije kod nosioca MEFV mutacija

Mutacije *MEFV* gena postoje i kod zdravih osoba i prema nekim autorima mogu predstavljati predispoziciju za razvoj autoinflamacije. Takođe, dokazano je da mogu modifikovati određene bolesti u smislu dodatnog štetnog efekta kod inflamatornih i autoimunskih poremećaja kao što su RA, MS, vaskulitisi, *Crohnova* i BD (127). Češće epizode povišene temperature i pleuritis su zabeležene kod nosioca *MEFV* mutacija sa SLE (126). Visoka prevalenca ovih mutacija postoji kod bolesnika sa rekurentnim abdominalnim bolom (305), kao i onih sa pogrešno dijagnostikovanom reumatskom groznicom (82).

Prema studiji Jeru i sar. (146) heterozigotni nosioci mutacija imaju povećani rizik za razvoj autoinflamacije (relativni rizik između 2,16 i 5,86) u odnosu na osobe bez mutacija (relativni rizik između 6,8 i 8,1). Utvrđeno je da heterozigotnost nije direktno odgovorna za pojavu klasične forme FMF, ali predstavlja faktor podložnosti za klinički manifestnu AIB. Procena relativnog rizika za razvoj bolesti kod Turaka za heterozigote je $2,1 \cdot 10^{-3}$ u odnosu na osobe bez mutacija od $3,3 \cdot 10^{-4}$, dok ovaj rizik kod Jevreja Sefarda iznosi $5,8 \cdot 10^{-3}$, odnosno $7,2 \cdot 10^{-4}$.

U prilog ulozi heterozigotnosti na razvoj autoinflamacije govore i činjenice da heterozigotni roditelji dece sa FMF češće navode inflamatorne manifestacije u anamnezi od kontrola (100), dok je ekspresija *MEFV* gena povećana i slična kod bolesnika sa jednom ili dve mutacije (140). Nosioci mutacija mogu periodično imati inflamatorne simptome ali obično ne u toj meri da bi se radila lekarska evaluacija ili genetska dijagnoza (39).

Lokacija razvoja zapaljenja kod nosioca mutacija *MEFV* gena je ista kao i kod FMF bolesnika za vreme akutnog napada. To su pre svega zglobovi (artralgije i artritis) i peritoneum sa abdominalnim bolom, jer su ove serozne membrane verovatno podložnije infiltraciji fagocitima (11, 140).

Pretpostavku da neke mutacije *MEFV* gena mogu nespecifično podstaći inflamatorni odgovor podržava i činjenica da su reaktanti akutne faze povišeni kod asimptomatskih individua sa jednom (306) ili dve *MEFV* (123) mutacije. Takođe, mutacije *MEFV* gena mogu voditi nastanku proinflamatornog stanja koje rezultuje subkliničkom inflamacijom kod asimptomatskih nosioca (127).

Slično našem istraživanju u studiji Kalyoncu i sar. (100) ispitivano je da li nosioci *MEFV* mutacija ispoljavaju kliničke zapaljenske manifestacije u turskoj populaciji. Utvrđeno je značajno češće prisustvo febrilnih epizoda (više od 4 puta godišnje), artralgiya, ranija dijagnoza akutne reumatske groznica i RA kod nosioca mutacija u odnosu na kontrole. Zaključeno je da pojedinačna mutacije može promotivno uticati na inflamaciju ili subkliničku inflamaciju, što je vidljivo prema većoj frekvenci inflamatornih simptoma. Doduše, mutacije u ovom istraživanju su se razlikovale od mutacija u srpskoj populaciji, odnosno bilo je 65% M694V, 16% M680I, 12% V726A i 7% E148Q.

I u većem broju drugih studija utvrđeno je da nosioci *MEFV* mutacija imaju tendenciju za razvoj febrilnih epizoda i češću pojavu reumatskih bolesti u odnosu na zdravu populaciju. Takođe, oni su imali i povišene nivoe reaktanata akutne faze zapaljenja (CRP, SAA) (87, 97, 118, 142, 301, 306). U studiji Ozen i sar. (301) potvrđeno je da nosioci mutacija mogu imati jači akutno fazni odgovor i veću učestalost reumatskih bolesti. Intenzivniji akutno fazni odgovor možda odražava proinflamatorno stanje kod ovih osoba. Jači inflamatorni odgovor kod nosioca mutacija je verovatno evolutivno odgovarao većoj otpornosti na određeni infektivni agens (97), ali isti taj odgovor može stvoriti predispoziciju za razvoj hroničnih inflamatornih stanja (100).

Najčešće zapaljenske manifestacije kod nosioca mutacija i R202Q homozigota *MEFV* gena u ovom istraživanju su ponovljene febrilnosti i nespecifični abdominalni bol, što je u skladu sa napred navedenim istraživanjima. Ove tegobe su najzastupljenije u najvećem broju istraživanja autoinflamatornih stanja sa mutacijama *MEFV* gena. Nespecifične zapaljenske tegobe sugerišu na postojanje modifikovanog imunskog odgovora kod osoba sa heterozigotnim E148Q i K695R mutacijama i nosioca R202Q homozigotnog polimorfizma.

Prisustvo kliničkih manifestacija zapaljenja kod nosioca mutacija je do sada ispitivano u populacijama u kojima je raširenost mutacija, kao i FMF, mnogo veća.

Za razliku od navedenih studija gde su nosioci mutacija imali povećanu tendenciju za razvoj reumatskih tegoba, naši nosioci mutacija nisu značajno navodili prisustvo ovih tegoba.

Međutim, ni jedna utvrđena mutacija kao ni R202Q/R202Q nisu mogli statistički značajno da predvide pojavu inflamatornih manifestacija u ovom istraživanju. Ove osobe su imale povremene zdravstvene probleme koji se ne mogu značajno povezati sa prisustvom navedenih promena gena. Tako da, kao i u napred navedenim studijama, može se zaključiti da su mutacije jedan od više faktora koji doprinose razvoju nespecifične inflamacije.

Takođe, za razliku od drugih studija, u ovom istraživanju su se biohemijski parametri inflamacije (CRP, SE, broj leukocita) nalazili u granicama normalnih fizioloških vrednosti te

možemo reći da nosioci E148Q i K695R mutacija u srpskoj populaciji nemaju subkliničku inflamaciju. Ove osobe imaju suptilne promene oksidativnog stresa koje su bile udružene sa nekim kliničkim manifestacijama (povišenom temperaturom, poliartralgijom i malaksalošću) i biohemijskim pokazateljima (broj leukocita sa eritrocitnim TBARS i SE i SOD u plazmi).

Kliničke zapaljenske manifestacije i E148Q mutacija

Postoje suprotstavljeni stavovi i studije o značaju E148Q mutacije za razvoj autoinflamacije i AIB. Opisani su slučajevi simptomatskih i asimptomatskih osoba, kao i homozigotnih i složenih heterozigotnih mutacija sa E148Q kod FMF bolesnika (133, 144, 239).

Prema rezultatima studija Tchernitchko i sar. (307) i Aksentijevich i sar. (239) frekvenca E148Q je bila slična kod bolesnika i njihovih asimptomatskih rođaka, čak je i M694V/E148Q složeni genotip pokazivao sličnu distribuciju. Opšta frekvenca mutacija V726A i E148Q kod Aškenazi i iračkih Jevreja kao i Arapa ukazuje da velika većina osoba sa genetskom definicijom FMF ostaje asimptomatska za E148Q (7,46%, 7% i 6,54%) i V726A mutaciju (7,4%, 12,8% i 7,3%) (90).

U određenim studijama frekvenca E148Q alela bila je slična u kontrolnoj grupi i među bolesnicima (148, 251). Navodi se da je E148Q funkcionalni polimorfizam, odnosno česta varijanta gena u populaciji koja ne izaziva bolest, ali da njeni biološki efekti mogu nositi selekcionu prednost (247). U tom slučaju je fenotipski efekat E148Q ograničen na složeno heterozigotno stanje sa mutacijama prisutnim u težim oblicima bolesti, kao što je M694V (251). U nekim populacijama zabeleženi su asimptomatski homozigotni nosioci E148Q do čak kod 55% slučajeva (84, 123, 239, 251).

Nasuprot ovim istraživanjima, osobe sa E148Q mutacijom u Grčkoj i Turskoj izgleda imaju podložnost nespecifičnom inflamatornom fenotipu (113, 308).

U studiji Federici i sar. (250) i Tchernitchko i sar. (309) pojedinačna E148Q mutacija bila je prisutna kod 15% FMF bolesnika, što je više u odnosu na prevalencu od oko 4% u generalnoj populaciji Francuske.

U Italiji je frekvenca E148Q kod FMF bolesnika bila 19%, homozigoti su imali blagi fenotip bolesti (skor težine 5) od heterozigota za istu mutaciju (skor 6,9) (252).

U istraživanju prevalencije *MEFV* mutacija u Španiji E148Q mutacija je bila češća kod FMF bolesnika i nosila je relativni rizik od 16,4 puta za razvoj bolesti (93).

Frekvencija alela E148Q mutacije od 18,7% je nađena kod osoba sa palindromnim reumatizmom. Mutacija se nalazila i u kompleksnom alelu E148Q-P369S-R408Q kod ovih osoba. Prisustvo mutacija u ovom slučaju se tumači kao još jedan od predisponirajućih faktora razvoja bolesti (124).

Bolesnici sa RA, nosioci E148Q mutacije, su imali teži klinički i radiološki progres bolesti (značajno veći broj deformiteta zglobova, viši CRP nivo, duže trajanje jutarnje ukočenosti, veći DAS-28 skor) u odnosu na RA bolesnike bez mutacija. Mutacije *MEFV* gena nisu faktor podložnosti razvoja RA, ali mogu biti faktor koji pogoršava težinu RA (86).

Slično tome, iako nije bilo očiglednih razlika u oboljevanju između nosioca mutacija i osoba bez mutacija u populaciji Aškenazi Jevreja, nosioci mutacija V726A ili E148Q su imali značajno više febrilnih epizoda godišnje ($p < 0,02$ i $p < 0,05$) (97). Dok su u studiji La Regina i sar. (133) bolesnici sa E148Q mutacijom imali produžene febrilne mijalgije.

Nastanak bolesti kod osoba koje imaju slabo penetrantnu mutaciju u heterozigotnom obliku je možda moguće objasniti modifikujućim genima ili faktorima spoljašnje sredine koji utiču na ispoljavanje i ekspresivnosti gena (118).

Zbog svega gore navedenog, postoji pretpostavka da E148Q mutacija predstavlja predispoziciju ka nastanku inflamatornog stanja u kombinaciji sa drugim pro-inflamatornim faktorima (113, 308). U većini slučajeva, E148Q je udružena sa blagim inflamatornim fenotipom, pokazuje redukovanu penetrantnost i ne uzima se isključivo u obzir za dijagnozu FMF-a. Međutim, kada je prisutna u složenom heterozigotnom stanju sa M694V ili V716A alelom može uticati na pojavu težeg oblika bolesti i ne treba je smatrati benignom promenom (111, 133). Homozigoti za kompleksni alel V726A ± E148Q imaju teški oblik bolesti, sličan kao i osobe homozigotne za M694V, a često razvijaju i bubrežnu amiloidozu. Oboljevanje vezano za V726A ± E148Q značajno nadmašuje bolest vezanu za sam alel V726A, što dokazuje da E148Q mutacija nije polimorfizam (248).

Prema dosadašnjim istraživanjima amiloidoza nije utvrđena kod asimptomatskih osoba homozigotnih za E148Q, ali incidenca pojave amiloidoze raste ako se ova mutacija nalazi u kompleksu sa drugim mutacijama (pre svega V726A) (310). Povezanost mutacije E148Q sa AA amiloidozom i hroničnim inflamatornim bolestima ukazuje da ova varijanta može pojačati inflamaciju nespecifično, što je možda bio koristan efekat tokom evolucije, ali može takođe potencirati egzacerbaciju mnogih inflamatornih procesa (86, 255).

Rezultati ove studije su u skladu sa navedenim literaturnim zapažanjima proinflatarnog efekta E148Q mutacije. Zdravi nosioci E148Q mutacija u Srbiji su češće navodili tegobe u vidu difuznog abdominalnog bola nejasnog uzroka i ponovljene epizode

povišene temperature u odnosu na osobe bez promena *MEFV* gena. Može se reći da i u ovom slučaju E148Q ispoljava dodatni modifikujući efekat u smislu promocije razvoja inflamacije, ali u sadejstvu sa drugim faktorima koji su prisutni ili utiču na ove osobe.

Kliničke zapaljenske manifestacije i K695R mutacija

K695R mutacija *MEFV* gena se smatra retkom mutacijom. Identifikovana je kao jedina mutacija kod FMF bolesnika, ali i kod asimptomatskih individua.

Identifikovana je kod 2% zdrave populacije u Turskoj i 1,2% FMF bolesnika (0,8% kao pojedinačna mutacija i 0,4% u složenom heterozigotnom obliku: E148Q/P369S/K695R i V726A/K695R). U studiji Yigit i sar. (143) K695R je pored mutacija M694V, E148Q i retke mutacije P369S bila udružena sa razvojem amiloidoze, odnosno postojala je u heterozigotnom stanju (K695R/N) kod bolesnika koji je razvio amiloidozu (143).

Pojedinačne mutacije *MEFV* gena su izgleda mnogo češće nego se ranije smatralo. U studiji Caglayan i sar. (241) mutacija K695R je bila zastupljena kod 0,7% FMF bolesnika sa složenim heterozigotnim genotipom u Turskoj.

U studiji koja je ispitivala prisustvo *MEFV* mutacija u egejskom delu Turske (149) 1,28% FMF bolesnika je imao heterozigotnu K695R/N mutaciju, 0,4% u složenom heterozigotnom obliku (M680I (G/C)/K695R i E148Q/K695R) i 0,2% u kompleksnom genotipu (E148Q/M694V/K695R). K695R je ukupno činila 1,15% mutiranih alela u ovoj studiji.

Zbog svoje generalno slabe fenotipske prezentacije smatra se da K695R, kao i E148Q, predisponira blage inflamatorne promene (4, 92, 239, 308). U prilog proinflamatornog efekta K695R govori njeno prisustvo kod osoba sa težim oblikom ulcerativnog kolitisa, kao i onih sa inflamatornim manifestacijama u MS, relapsnim reumatskim tegobama i sindromom fibromijalgije (124, 125, 251). Tako je utvrđeno da alelna frekvenca K695R iznosi 6,25% kod bolesnika sa palindromnim reumatizmom (124).

Stopa nosioca K695R mutacije od 5% u našem uzorku srpske populacije je iznenađujuće visoka. Ove naizgled zdrave osobe su imale povremene epizode difuznog abdominalnog bola, kao i ponovljene epizode povišene temperature i malaksalost bez precizno postavljene dijagnoze. Kao i u slučaju E148Q mutacije, u statističkoj analizi prisustvo K695R mutacije nije predviđalo inflamatorni ishod kod ovih osoba.

Iako samo prisustvo heterozigotnih E148Q i K695R mutacija nije moglo da predvidi inflamatorne manifestacije, osobe sa navedenim *MEFV* promenama su u poređenju sa

osobama bez ovih promena značajno češće navodile febrilne epizode i ova dva parametra su bila u jakoj asocijaciji. Slična zapažanja postoje i za razvoj difuznog abdominalnog bola i osećaja slabosti sa nešto slabijim koeficijentom kontigencije (povezanosti).

Kliničke zapaljenske manifestacije i R202Q polimorfizam

R202Q promena *MEFV* gena u homozigotnom stanju je utvrđena kod FMF bolesnika i odgovara karakterističnom autoinflamatornom fenotipu, sa najčešćim manifestacijama: povišenom telesnom temperaturom, serozitisima i monoartritisom (92, 162).

U grčkoj populaciji homozigotna R202Q alteracija je bila značajno zastupljenija kod FMF bolesnika. Groznica, serozitis i monoartritis su bili češći kod R202Q homozigota u odnosu na abdominalni bol kod FMF bolesnika (30, 48).

U studiji Ozturk i sar. (161) u turskoj populaciji R202Q homozigoti nisu bili prisutni u kontrolnoj grupi zdravih, dok se klinička slika autoinflamatornog sindroma ispoljavala kod onih koji su imali R202Q u složenom heterozigotnom obliku sa drugim *MEFV* mutacijama.

Takođe, u drugoj studiji turske populacije R202Q homozigoti su bili značajno zastupljeniji u grupi FMF bolesnika nego zdravih kontrola ($p=0,0002$) i nije postojala značajna razlika među bolesnicima u odnosu na kliničke i demografske karakteristika. Frekvencija R202Q homozigota je iznosila 14,7% što je bilo više od frekvencije M694V mutacije. Zbog ovako visoke frekvencije i jake asocijacije R202Q homozigotnosti i FMF u Turskoj autori predlažu da analiza ove promene bude uključena u rutinsku molekularnu dijagnostiku ove bolesti (163).

Međutim, FMF bolesnici sa R202Q homozigotnim polimorfizmom imaju najmanji broj febrilnih epizoda godišnje u odnosu na druge bolesnike. Uprkos blagom inflamatornom fenotipu razvoj amiloidoze je utvrđen i kod ovih bolesnika (236).

U Italiji, 6,9% FMF bolesnika je imalo heterozigotnu R202Q promenu, dok je kod 4,2% njih R202Q bila udružena sa drugim mutacijama. Bolesnici su pokazivali umereni inflamatorni fenotip sa srednjim skorom težine bolesti od 6,4 i 7,6 (243).

S druge strane, u studiji Španske populacije R202Q promena nije bila udružena sa AIB i nije nosila predisponirajući rizik za razvoj bolesti (93).

Kod bolesnika sa periodičnom groznicom nepoznatog uzroka i FMF-om R202Q promena je bila prisutna kod 16% bolesnika, dok je kod genetski nedefinisanih FUI postojala kod 37,3% osoba, što je duplo više od očekivanog (160).

Povećana frekvencija homozigota za R202Q (6%) je utvrđena kod osoba sa sindromom fibromijalgije. Zanimljivo je da su svi nosioci R202Q polimorfizma imali značajno povišene koncentracije MCP-1 proteina ($p=0,004$), hemokina koji privlači monocite, memorijske T i dendritične ćelije na mesta zapaljenja i ima ulogu u patogenezi RA (162).

Vrsta i učestalost kliničkih manifestacija kod R202Q homozigota u ovom istraživanju nisu bili značajno različiti u odnosu na nosioce E148Q i K695R mutacija, što govori u prilog sličnom efektu ovih promena *MEFV* gena. Na osnovu rezultata može se reći da je prisutan dozno-zavisni efekat R202Q polimorfizma. Naime, R202Q heterozigotni polimorfizam je bio zastupljen kod 45% ispitivane zdrave populacije, a prisutni zdravstveni problemi se nisu značajno razlikovali u odnosu na osobe sa normalnom sekvencom gena, nasuprot značajno češćim inflamatornim manifestacijama kod R202Q homozigota. Osobe sa R202Q/R202Q su navodile epizode rekurentne febrilnosti, abdominalnog bola i limfadenopatiju češće od osoba sa normalnom sekvencom *MEFV* gena ($p<0.035$), što ide u prilog modifikovanoj funkciji izmenjenog pirinskog molekula.

Iako je R202Q homozigotnost nađena kod FMF bolesnika (158, 161), kao i prisustva inflamatornih manifestacija u ovom istraživanju, dijagnoza FMF se u ovom slučaju ne može postaviti. Prisutni simptomi i znaci su bili blagi, atipični i često bez prateće povišene temperature. Ovo je možda posledica nepotpune penetracije ili varijabilne ekspresivnosti R202Q promene u našoj populaciji ili pak posledica uticaja dodatnih genskih ili faktora spoljašnje sredine prisutnih u ovom regionu. Pored toga, frekvence alela i R202Q genotipova su bile u *Hardy–Weinbergovoj* ravnoteži, što znači da se ove promene mogu smatrati polimorfizmom.

Glavni doprinos ovog istraživanja je u utvrđivanju posebne predispozicije zdravih osoba ka proinflamatornom fenotipu, a koji je uslovljen prisutnim mutacijama ili R202Q polimorfizmom *MEFV* gena u srpskoj populaciji.

Pozitivan rezultat udruženosti navedenih alteracija *MEFV* gena i inflamatornih manifestacija pokazuje da one mogu biti odgovorne za suptilne promene u radu urođenog imunskog sistema, koje su dovoljne da ove osobe imaju češće epizode povišene temperature nejasnog uzroka i/ili druge manifestacije lokalizovane i/ili sistemske inflamacije.

Ovo je posebno važno za dečiji uzrast jer deca imaju veći broj infekcija tokom godine, praćenih povišenom temperaturom; drugo, AIB se intenzivnije manifestuju u njihovom uzrastu. Ako nema drugog objašnjenja febrilnosti i udružene inflamacije kod

deteta, nakon detaljnog i obimnog pregleda i dijagnostičkih procedura, može se posumnjati na prisustvo mutacija gena koji učestvuju u kontroli urođenog imunskog sistema.

Posebno zanimljivo pitanje je uloga R202Q promene, njena visoka frekvencija u našoj populaciji i blaža fenotipska prezentacija u homozigotnom stanju u odnosu na druge studije.

Takođe, prema dosadašnjim literaturnim saznanjima, ne postoje podaci koji ukazuju da je prisustvo *MEFV* mutacija ili R202Q polimorfizma povezano sa povišenim parametrima oksidativnog stresa kod zdravih osoba. Nosioci E148Q i K695R mutacija, kao i R202Q homozigoti, imaju blage promene parametara oksidativnog stresa, što bi u dugoročnom periodu mogao biti jedan od faktora rizika češćeg razvoja inflamatornih i imunskih bolesti kod ovih osoba. Prisustvo suptilnih pokazatelja povišenog oksidativnog stresa je koristan podatak u smislu preduzimanja mera za njegovu prevenciju u određenim situacijama.

7. ZAKLJUČCI

1. Mutacije *MEFV* gena su prisutne kod 11% zdravih osoba u Srbiji.
2. Prisutne heterozigotne mutacije *MEFV* gena u populaciji Srbije su E148Q (6%) i K695R (5%).
3. U zdravoj populaciji Srbije utvrđeno je 10% homozigota za R202Q polimorfizam *MEFV* gena, dok je 45% heterozigotni nosilac ovog polimorfizma.
4. Osobe sa E148Q i K695R heterozigotnim mutacijama *MEFV* gena i R202Q homozigotnim polimorfizmom češće imaju epizode visoke temperature nepoznatog uzroka, kao i druge nespecifične manifestacije koje upućuju na zapaljenje: peritonitis, difuzni abdominalni bol neutvrđenog uzroka i malaksalost.
5. Osobe sa E148Q i K695R heterozigotnim mutacijama *MEFV* gena u odnosu na osobe bez navedenih mutacija češće imaju epizode povišene temperature nepoznatog uzroka, nespecifični bol u abdomenu, peritonitis i malaksalost.
6. Osobe sa homozigotnim R202Q polimorfizmom *MEFV* gena u odnosu na osobe bez ovog polimorfizma češće imaju epizode povišene temperature, difuzni nespecifični bol u abdomenu i limfadenopatiju.
7. Češća pojava nespecifičnih opštih manifestacija zapaljenja kod nosilaca mutacija i R202Q homozigota ukazuje da navedene promene *MEFV* gena predstavljaju jednu od predispozicija ovih osoba za razvoj zapaljenja.
8. Nosioци *MEFV* mutacija i R202Q homozigotnog polimorfizma imaju značajno više vrednosti eritrocitnih TBARS, kao i plazmatsku aktivnost SOD, u odnosu na osobe bez navedenih genskih promena.
9. Nosioци *MEFV* mutacija i R202Q homozigotnog polimorfizma sa epizodama povišene temperature imaju više vrednosti eritrocitnih TBARS u odnosu na nosioce promena bez navedene tegobe. Takođe, postoji udruženost poliartralgijske i nižih vrednosti eritrocitne SOD aktivnosti, kao i malaksalosti i niže plazmatske aktivnosti SOD, ali na granici statističke značajnosti.
10. Dobijeni rezultati parametara oksidativnog stresa upućuju na postojanje blagog oksidativnog stresa i stimulaciju urođenog imunskog ćelijskog odgovora na stres uz moguće specifične promene funkcije leukocita kod osoba sa navedenim promenama *MEFV* gena.

8. LITERATURA

1. Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J. AceView: a comprehensive cDNA-supported gene and transcripts annotation. *Genome Biology* 2006;7(Suppl 1):S12.
2. McDermott MF, Aksentjevich I. The autoinflammatory syndromes. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2002;2(6):511-6.
3. Chetrit BE, Levy M. Familial Mediterranean fever. *Lancet* 1998;351:659-64.
4. French FMF Consortium. A candidate gene for familial Mediterranean fever. The French FMF Consortium. *Nat Genet* 1997;17(1):25-31.
5. Centola M, Wood G, Frucht DM, Galon J, Aringer M, Farrell C, et al. The gene for familial Mediterranean fever, MEFV, is expressed in early leukocyte development and is regulated in response to inflammatory mediators. *Blood* 2000; 95(10): 3223-31.
6. Infevers: an online database for autoinflammatory mutations [Internet]. Touitou I, ed. Australia: Human genome variation society. 2002 - [cited 2014 Feb 10]. Available from: <http://fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/infevers/>
7. Grandemange S, Aksentjevich I, Jeru I, Gul A, Touitou I. The regulation of MEFV expression and its role in health and familial Mediterranean fever. *Genes Immun* 2011;12(7):497-503.
8. International FMF Consortium. Ancient missense mutations in a new member of the RoRet gene family are likely to cause familial Mediterranean fever. *Cell* 1997; 90:797-807.
9. Matzner Y, Abedat S, Shapiro E, Eisenberg S, Bar-Gil-Shitrit A, Stepensky P, et al. Expression of the familial Mediterranean fever gene and activity of the C5a inhibitor in human primary fibroblast cultures. *Blood* 2000;96:727-31.
10. Chae JJ, Cho YH, Lee GS, Cheng J, Liu PP, Feigenbaum L, et al. Gain-of-function Pyrin mutations induce NLRP3 protein-independent interleukin-1 β activation and severe autoinflammation in mice. *Immunity* 2011; 34(5): 755-68.
11. Diaz A, Hu C, Kastner DL, Schaner P, Reginato AM, Richards N, et al. Lipopolysaccharide induced expression of multiple alternatively spliced MEFV transcripts in human synovial fibroblasts: a prominent splice isoform lacks the C-terminal domain that is highly mutated in familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum* 2004;50(11):3679-89.
12. Omenetti A, Carta S, Delfino L, Martini A, Gattorno M, Rubartelli A. Increased NLRP3-dependent interleukin 1 β secretion in patients with familial Mediterranean fever: correlation with MEFV genotype. *Ann Rheum Dis* 2014;73(2):462-9.
13. Chae JJ, Aksentjevich I, Kastner DL. Advances in the understanding of familial Mediterranean fever and possibilities for targeted therapy. *Br J Haematol* 2009; 146(5): 467-78.
14. Jeru I, Papin S, L'Hoste S, Duquesnoy P, Cazeneuve C, Camonis J, et al. Interaction of pyrin with 14.3.3 in an isoform-specific and phosphorylation-dependent manner regulates its translocation to the nucleus. *Arthritis Rheum* 2005;52:1848-57.
15. Mansfield E, Chae JJ, Komarow HD, Brotz TM, Frucht DM, Aksentjevich I. The familial Mediterranean fever protein, pyrin, associates with microtubules and colocalizes with actin filaments. *Blood* 2001;98(3):851-9.
16. Kastner D, Brydges S, Hull KM. Periodic fever syndromes. In: Ochs HD, Smith CIE, Puck JM, eds. *Primary immunodeficiency diseases: a molecular and genetic approach*. 2nd ed. Oxford: University Press; 2007:367-90.
17. Liepinsh E, Barbals R, Dahl E, Sharipo A, Staub E, Otting G. The death-domain fold of the ASC PYRIN domain, presenting a basis for PYRIN/PYRIN recognition. *J Mol Biol* 2003;332(5):1155-63.

18. Faustin B, Lartigue L, Bruey JM, Luciano F, Sergienko E, Bailly-Maitre B, et al. Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation. *Molecular Cell* 2007;25:713–24.
19. Agostini L, Martinon F, Burns K, McDermott MF, Hawkins PN, Tschopp J. NALP3 forms an IL-1 β processing inflammasome with increased activity in Muckle–Wells autoinflammatory disorder. *Immunity* 2004;20:319–25.
20. Grutter C, Briand C, Capitani G, Mittl PR, Papin S, Tschopp J, et al. Structure of the PRYSPRY domain: implications for autoinflammatory diseases. *FEBS Letters* 2006;580:99–106.
21. Rhodes DA, de Bono B, Trowsdale J. Relationship between SPRY and B30.2 protein domains. Evolution of a component of immune defence? *Immunology* 2005;116:411–7.
22. Flajnik MF, Du Pasquier L. Evolution of innate and adaptive immunity: can we draw a line? *Trends Immunol* 2004;25:640–4.
23. Chae JJ, Centola M, Aksentijevich I, Dutra A, Tran M, Wood G, et al. Isolation, genomic organization, and expression analysis of the mouse and rat homologs of MEFV, the gene for familial mediterranean fever. *Mamm Genome* 2000;11:428–35.
24. Ozato K, Shin DM, Chang TH, Morse HC 3rd. TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2008;8(11):849–60.
25. Khare S, Luc N, Dorfleutner A, Stehlik C. Inflammasomes and their activation. *Crit Rev Immunol* 2010;30(5):463–87.
26. Yu JW, Fernandes-Alnemri T, Datta P, Wu J, Juliana C, Solorzano L, et al. Pyrin activates the ASC pyroptosome in response to engagement by autoinflammatory PSTPIP1 mutants. *Mol Cell* 2007;28:214–27.
27. Papin S, Cuenin S, Agostini L, Martinon F, Werner S, Beer HD, et al. The SPRY domain of Pyrin, mutated in familial Mediterranean fever patients, interacts with inflammasome components and inhibits proIL-1 β processing. *Cell Death Differ* 2007;14:1457–66.
28. Grütter C, Briand C, Capitani G, Mittl PR, Papin S, Tschopp J, et al. Structure of the PRYSPRY-domain: implications for autoinflammatory diseases. *FEBS Lett* 2006; 580(1):99–106.
29. Richards N, Schaner P, Diaz A, Stuckey J, Shelden E, Wadhwa A, et al. Interaction between pyrin and the apoptotic speck protein (ASC) modulates ASC-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2001 19;276(42):39320–9.
30. Chae JJ, Wood G, Masters SL, Richard K, Park G, Smith BJ, et al. The B30.2 domain of pyrin, the familial Mediterranean fever protein, interacts directly with caspase-1 to modulate IL-1 β production. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:9982–7.
31. Harton JA, Linhoff MW, Zhang J, Ting JP. Cutting edge: CATERPILLER: a large family of mammalian genes containing CARD, pyrin, nucleotide-binding, and leucine-rich repeat domains. *J Immunol* 2002;169:4088–93.
32. Inohara N, Nunez G. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol* 2003;3:371–82.
33. Martinon F, Tschopp J. Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell Death Differ* 2007;14:10–22.
34. Ting JP, Kastner DL, Hoffman HM. CATERPILLERs, pyrin and hereditary immunological disorders. *Nat Rev Immunol* 2006;6:183–95.
35. Touitou I, Koné-Paut I. Autoinflammatory diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2008; 22(5): 811–29.
36. Burckstummer T, Baumann C, Bluml S, Dixit E, Durnberger G, Jahn H, et al. An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. *Nature Immunology* 2009;10:266–272.
37. Fernandes-Alnemri T, Yu JW, Datta P, Wu J, Alnemri ES. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature* 2009;458:509–13.

38. Savic S, Dickie LJ, Wittmann M, McDermott MF. Autoinflammatory syndromes and cellular responses to stress: pathophysiology, diagnosis and new treatment perspectives. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2012;26(4):505-33.
39. Masters SL, Simon A, Aksentijevich I, Kastner DL. Horror autoinflammaticus: the molecular pathophysiology of autoinflammatory disease. *Annu Rev Immunol* 2009;27:621-68.
40. Martinon F, Gaide O, Pétrilli V, Mayor A, Tschopp J. NALP inflammasomes: a central role in innate immunity. *Semin Immunopathol* 2007;29(3):213-29.
41. Goldbach-Mansky R. Immunology in clinic review series; focus on autoinflammatory diseases: update on monogenic autoinflammatory diseases: the role of interleukin (IL)-1 and an emerging role for cytokines beyond IL-1. *Clin Exp Immunol* 2012;167(3):391-404.
42. Huang H, Smart NG, Beutler B. Record for ND1 [Internet], [updated Feb 22, 2013] [cited 19 Nov 2013] MUTAGENETIX (TM), B. Beutler and colleagues, Department of Genetics, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA. Available from: https://mutagenetix.utsouthwestern.edu/phenotypic/phenotypic_pdf.cfm/mutagenetix-ND1.pdf?pk=482
43. Bauernfeind F, Bartok E, Rieger A, Franchi L, Nunez G, Hornung V. Cutting edge: reactive oxygen species inhibitors block priming, but not activation, of the NLRP3 inflammasome. *J Immunol* 2011;187(2):613-7.
44. Andrei C, Dazzi C, Lotti L, Torrisi MR, Chimini G, Rubartelli A. The secretory route of the leaderless protein interleukin 1beta involves exocytosis of endolysosome-related vesicles. *Mol Biol Cell* 1999;10:1463-75.
45. Berg S, Fasth A. Autoinflammatory disorders. In: Rezaei N, Aghamohammadi A, Notarangelo LD, eds. *Primary Immunodeficiency Diseases*. Verlag Berlin Heidelberg: Springer; 2008: 215-35.
46. Mariathasan S. ASC, Ipaf and Cryopyrin/Nalp3: bona fide intracellular adapters of the caspase-1 inflammasome. *Microbes Infect* 2007;9(5):664-71.
47. Drenth JP, Cuisset L, Grateau G, Vasseur C, van de Velde-Visser SD, de Jong JG, et al. Mutations in the gene encoding mevalonate kinase cause hyper-IgD and periodic fever syndrome. International Hyper-IgD Study Group. *Nat Genet* 1999;22:178-81.
48. Hesker PR1, Nguyen M, Kovarova M, Ting JP, Koller BH. Genetic loss of murine pyrin, the Familial Mediterranean Fever protein, increases interleukin-1 β levels. *PLoS One* 2012;7(11):e51105.
49. Yu JW, Wu J, Zhang Z, Datta P, Ibrahim I, Taniguchi S, et al. Cryopyrin and pyrin activate caspase-1, but not NF κ B, via ASC oligomerization. *Cell Death Differ* 2006; 13: 236-49.
50. Shoham NG, Centola M, Mansfield E, Hull KM, Wood G, Wise CA, et al. Pyrin binds the PSTPIP1/CD2BP1 protein, defining familial Mediterranean fever and PAPA syndrome as disorders in the same pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:13501-6.
51. Chae JJ, Wood G, Richard K, Jaffe H, Colburn NT, Masters SL, et al. The familial Mediterranean fever protein, pyrin, is cleaved by caspase-1 and activates NF- κ B through its N-terminal fragment. *Blood* 2008;112:1794-803.
52. Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol* 2002;30(6):620-50.
53. Chae JJ, Komarow HD, Cheng J, Wood G, Raben N, Liu PP, et al. Targeted disruption of pyrin, the FMF protein, causes heightened sensitivity to endotoxin and a defect in macrophage apoptosis. *Molecular Cell* 2003;11(3): 591-604.
54. Witko-Sarsat V, Gausson V, Descamps-Latscha B. Are advanced oxidation protein products potential uremic toxins? *Kidney Int Suppl* 2003; (84): S11-4.

55. Rossi-Semerano L, Koné-Paut I. Is Still's disease an autoinflammatory syndrome? *Int J Inflam* 2012; 2012:480373.
56. Brough D, Le Feuvre, RA, Wheeler RD, Solovyova N, Hilfiker S, Rothwell NJ, et al. Ca²⁺ stores and Ca²⁺ entry differentially contribute to the release of IL-1 beta and IL-1 alpha from murine macrophages. *J Immunol* 2003;170: 3029-36.
57. Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol* 2009;7:99–109.
58. Yeretssian G, Labbe K, Saleh M. Molecular regulation of inflammation and cell death. *Cytokine* 2008;43:380–90.
59. Miao EA, Leaf IA, Treuting PM, Mao DP, Dors M, Sarkar A, et al. Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. *Nat Immunol* 2010;11:1136–42.
60. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 2009;27:519–50.
61. Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: Guardians of the body. *Annu Rev Immunol* 2009;27:229–65.
62. Piccini A, Carta S, Tassi S, Lasiglié D, Fossati G, Rubartelli A. ATP is released by monocytes stimulated with pathogen-sensing receptor ligands and induces IL-1beta and IL-18 secretion in an autocrine way. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(23):8067–72.
63. Rubartelli A, Cozzolino F, Talio M, Sitia R. A novel secretory pathway for interleukin-1 beta, a protein lacking a signal sequence. *EMBO J* 1990; 9: 1503-10.
64. MacKenzie A, Wilson HL, Kiss-Toth E, Dower SK, North RA, Surprenant A. Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *Immunity* 2001;15: 825-35.
65. Cruz CM, Rinna A, Forman HJ, Ventura AL, Persechini PM, Ojcius DM. ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. *J Biol Chem* 2007;282(5):2871–9.
66. Dostert C, Petrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT, Tschopp J. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* 2008;320:674–7.
67. Hewinson J, Moore SF, Glover C, Watts AG, MacKenzie AB. A key role for redox signaling in rapid P2X7 receptor-induced IL-1 beta processing in human monocytes. *J Immunol* 2008;180(12):8410–20.
68. Tassi S, Carta S, Vené R, Delfino L, Ciriolo MR, Rubartelli A. Pathogen-induced interleukin-1beta processing and secretion is regulated by a biphasic redox response. *J Immunol* 2009;183(2):1456–62.
69. Carta S, Tassi S, Pettinati I, Delfino L, Dinarello CA, Rubartelli A. The rate of interleukin-1beta secretion in different myeloid cells varies with the extent of redox response to Toll-like receptor triggering. *J Biol Chem* 2011;286(31):27069-80.
70. Tassi S, Carta S, Delfino L, Caorsi R, Martini A, Gattorno M, et al. Altered redox state of monocytes from cryopyrin-associated periodic syndromes causes accelerated IL-1beta secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107(21):9789-94.
71. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 2011;469(7329):221-5.
72. Kamata H, Honda S, Maeda S, Chang L, Hirata H, Karin M. Reactive oxygen species promote TNFalpha-induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell* 2005;120(5):649-61.
73. Bulua AC, Simon A, Maddipati R, Pelletier M, Park H, Kim KY, et al. Mitochondrial reactive oxygen species promote production of proinflammatory cytokines and are elevated in TNFR1-associated periodic syndrome (TRAPS). *J Exp Med* 2011;208(3):519-33.

74. Swaan PW, Knoell DL, Helder F, Wewers MD. Sequential processing of human ProIL-1 β by caspase-1 and subsequent folding determined by a combined in vitro and in silico approach. *Pharm Res* 2001;18:1083–90.
75. Hou CC, Lin H, Chang CP, Huang WT, Lin MT. Oxidative stress and pyrogenic fever pathogenesis. *Eur J Pharmacol* 2011; 667(1-3): 6-12.
76. Meissner F, Molawi K, Zychlinsky A. Superoxide dismutase 1 regulates caspase-1 and endotoxic shock. *Nature Immunol* 2008; 9: 866–72.
77. Gürel A, Armutçu F, Damatoğlu S, Unalacak M, Demircan N. Evaluation of erythrocyte Na⁺, K⁺ -atpase and superoxide dismutase activities and malondialdehyde level alteration in coal miners. *Eur J Gen Med* 2004; 1(4): 22-8.
78. Russel PJ. *iGenetics: A molecular approach*. 3rd ed. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings; 2010.
79. McDermott MF, Aksentijevich I, Galon J, McDermott EM, Ogunkolade BW, Centola M, et al. Germline mutations in the extracellular domains of the 55 kDa TNF receptor, TNFR1, define a family of dominantly inherited autoinflammatory syndromes. *Cell* 1999;97:133–44.
80. Lobito AA, Kimberley FC, Muppidi JR, Komarow H, Jackson AJ, Hull KM, et al. Abnormal disulfide-linked oligomerization results in ER retention and altered signaling by TNFR1 mutants in TNFR1-associated periodic fever syndrome (TRAPS). *Blood* 2006;108:1320–7.
81. Rego-Pérez I, Fernández-Moreno M, Blanco FJ. Gene polymorphisms and pharmacogenetics in rheumatoid arthritis. *Curr Genomics* 2008; 9(6):381–93.
82. Sohar E, Gafni J, Pras M, Heller H. Familial Mediterranean fever. A survey of 470 cases and review of the literature. *Am J Med* 1967;43(2):227–53.
83. Turkish FMF Study Group. Familial Mediterranean Fever (FMF) in Turkey results of a nationwide multicenter study. *Medicine* 2005;84(1):1–11.
84. Touitou I. The spectrum of familial Mediterranean fever (FMF) mutations. *Eur J Hum Genet* 2001; 9:473–83.
85. Dode C, Pecheux C, Cazeneuve C, Cattani D, Dervichian M, Goossens M, et al. Mutations in the MEFV gene in a large series of patients with a clinical diagnosis of familial Mediterranean fever. *Am J Med Genet* 2000;92:241–246.
86. Booth DR, Lachmann HJ, Gillmore JD, Booth SE, Hawkins PN. Prevalence and significance of the familial Mediterranean fever gene mutation encoding pyrin Q148. *QJM* 2001;94:527-31.
87. Lachmann HJ, Sengul B, Yavuzsen TU, Booth DR, Booth SE, Bybee A, et al. Clinical and subclinical inflammation in patients with familial Mediterranean fever and in heterozygous carriers of MEFV mutations. *Rheumatology (Oxford)* 2006; 45:746–50.
88. Daniels M, Shohat T, Brenner-Ullman A, Shohat M. Familial Mediterranean fever: high gene frequency among the non-Ashkenazic and Ashkenazic Jewish populations in Israel. *Am J Med Genet* 1995;55(3):311–4.
89. Rogers DB, Shohat M, Petersen MG, Bickal J, Congleton J, Schwabe AD, et al. Familial Mediterranean fever in Armenians: autosomal recessive inheritance with high gene frequency. *Am J Med Genet* 1989;34(2):168–72.
90. Gershoni-Baruch R, Shinawi M, Leah K, Badarnah K, Brik R. Familial Mediterranean fever: prevalence, penetrance and genetic drift. *Eur J Hum Genet* 2001;9(8):634–7.
91. Yilmaz E, Ozen S, Balci B, Duzova A, Topaloglu R, Besbas N, et al. Mutation frequency of familial Mediterranean fever and evidence for a high carrier rate in the Turkish population. *Eur J Hum Genet* 2001;9:553–5.

92. Giaglis S, Papadopoulos V, Kambas K, Doumas M, Tsironidou V, Rafail S, et al. MEFV alterations and population genetics analysis in a large cohort of Greek patients with familial Mediterranean fever. *Clin Genet* 2007;71(5):458-67.
93. Aldea A, Calafell F, Arostegui JI, Lao O, Rius J, Plaza S, et al. The west side story: MEFV haplotype in Spanish FMF patients and controls, and evidence of high LD and a recombination "hot-spot" at the MEFV locus. *Hum Mutat* 2004;23:399.
94. Bernot A, da Silva C, Petit JL, Cruaud C, Caloustian C, Castet V, et al. Non-founder mutations in the MEFV gene establish this gene as the cause of familial Mediterranean fever (FMF). *Hum Mol Genet* 1998;7(8):1317-25.
95. Schaner P, Richards N, Wadhwa A, Aksentijevich I, Kastner D, Tucker P, et al. Episodic evolution of pyrin in primates: Human mutations recapitulate ancestral amino acid states. *Nat Genet* 2001;27:318-21.
96. Ozen S, Balci B, Ozkara S, Ozcan A, Yilmaz E, Besbas N, et al. Is there a heterozygote advantage for familial Mediterranean fever carriers against tuberculosis infections: speculations remain? *Clin Exp Rheumatol* 2002;20(4 Suppl 26):S57-8.
97. Kogan A, Shinar Y, Lidar M, Revivo A, Langevitz P, Padeh S, et al. Common MEFV mutations among Jewish ethnic groups in Israel: high frequency of carrier and phenotype III states and absence of a perceptible biological advantage for the carrier state. *Am J Med Genet* 2001;102(3):272-6.
98. Rabinovitch E, Harats D, Yaron P, Luvish T, Lidar M, Kedem R, et al. Familial Mediterranean fever gene and protection against asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2007;99(6):517-21.
99. Taniuchi S, Nishikomori R, Iharada A, Tuji S, Heike T, Kaneko K. MEFV variants in patients with PFAPA syndrome in Japan. *Open Rheumatol J* 2013;7:22-5.
100. Kalyoncu M, Acar BC, Cakar N, Bakaloglu A, Ozturk S, Dereli E, et al. Are carriers for MEFV mutations "healthy"? *Clin Exp Rheumatol* 2006;24(5 Suppl 42):S120-2.
101. Sackesen C, Bakaloglu A, Sekerel BE, Ozaltin F, Besbas N, Yilmaz E, et al. Decreased prevalence of atopy in paediatric patients with familial Mediterranean fever. *Ann Rheum Dis* 2004;63(2):187-90.
102. Majeed HA. Differential diagnosis of fever of unknown origin in children. *Curr Opin Rheumatol* 2000; 12(5): 439-44.
103. Notarnicola C, Didelot MN, Kone'-Paut I, Seguret F, Demaille J, Touitou I. Reduced MEFV messenger RNA expression in patients with familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum* 2002;46:2785-93.
104. Ozen S, Uckan D, Baskin E, Besbas N, Okur H, Saatci U, et al. Increased neutrophil apoptosis during attacks of familial Mediterranean fever. *Clin Exp Rheumatol* 2001;19(5 Suppl 24):S68-71.
105. Rezaei N, Aghamohammadi A, Notarangelo LD, eds. *Primary Immunodeficiency Diseases*. Verlag Berlin Heidelberg: Springer; 2008: 215-35.
106. Yazici A, Cefle A, Savli H. The frequency of MEFV gene mutations in Behcet's disease and their relation with clinical findings. *Rheumatol Int* 2012; 32(10): 3025-30.
107. Kümpfel T, Gerdes LA, Wacker T, Blaschek A, Havla J, Krumbholz M, et al. Familial Mediterranean fever-associated mutation pyrin E148Q as a potential risk factor for multiple sclerosis. *Mult Scler* 2012; 18(9): 1229-38.
108. Ozen S. Mutations/polymorphisms in a monogenetic autoinflammatory disease may be susceptibility markers for certain rheumatic diseases: lessons from the bedside for the benchside. *Clin Exp Rheumatol* 2009; 27(2 Suppl 53):S29-31.

109. Akyuz F, Besisik F, Ustek D, Ekmekçi C, Uyar A, Pinarbasi B, et al. Association of the MEFV gene variations with inflammatory bowel disease in Turkey. *J Clin Gastroenterol* 2013;47(3):e23-7.
110. Touitou I, Magne X, Molinari N, Navarro A, Quéllec AL, Picco P, et al. MEFV mutations in Behçet's disease. *Hum Mutat* 2000;16:271-2.
111. Giaglis S, Mimidis K, Papadopoulos V, Thomopoulos K, Sidiropoulos P, Rafail S, et al. Increased frequency of mutations in the gene responsible for familial Mediterranean fever (MEFV) in a cohort of patients with ulcerative colitis: evidence for a potential disease-modifying effect? *Dig Dis Sci* 2006;51:687-92.
112. Unal A, Dursun A, Emre U, Tascilar NF, Ankarali H. Evaluation of common mutations in the Mediterranean fever gene in Multiple Sclerosis patients: is it a susceptibility gene? *J Neurol Sci* 2010;294(1-2):38-42.
113. Livneh A, Aksentijevich I, Langevitz P, Torosyan Y, G-Shoham N, Shinar Y, et al. A single mutated MEFV allele in Israeli parents suffering from familial Mediterranean fever and Behçet's disease (FMF-BD). *Europ J Hum Genet* 2001;9:191-6.
114. Dogan CS, Akman S, Koyun M, Bilgen T, Comak E, Gokceoglu AU. Prevalence and significance of the MEFV gene mutations in childhood Henoch-Schönlein purpura without FMF symptoms. *Rheumatol Int* 2013;33(2):377-80.
115. Ozçakar ZB, Yalçinkaya F, Cakar N, Acar B, Kasapçopur O, Ugüten D, et al. MEFV mutations modify the clinical presentation of Henoch-Schönlein purpura. *J Rheumatol* 2008;35(12):2427-9.
116. Kolnik M, Toplak N, Debeljak M, Avčin T. Prevalence of Mefv gene mutations and their association with clinical phenotypes in 102 caucasian children with Henoch-Schonlein purpura. *Hereditary Genet* 2012;1(3): 1000112.
117. Yildirim B, Tuncer C, Kan D, Tunc B, Demirag MD, Ferda Percin E, Haznedaroglu S, et al. MEFV gene mutations and its impact on the clinical course in ulcerative colitis patients. *Rheumatol Int* 2011;31(7):859-64.
118. Marek-Yagel D, Berkun Y, Padeh S, Abu A, Reznik-Wolf H, Livneh A, et al. Clinical disease among patients heterozygous for familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum* 2009;60:1862-6.
119. Tasliyurt T, Yigit S, Rustemoglu A, Gul U, Ates O. Common MEFV gene mutations in Turkish patients with Behçet's disease. *Gene* 2013;530(1):100-3.
120. Ayesh S, Abu-Rmaileh H, Nassar S, Al-Shareef W, Abu-Libdeh B, Muhanna A, et al. Molecular analysis of MEFV gene mutations among Palestinian patients with Behçet's disease. *Scand J Rheumatol* 2008;37(5):370-4.
121. Ben-Chetrit E, Cohen R, Chajek-Shaul T. Familial Mediterranean fever and Behçet's disease — are they associated? *J Rheumatol* 2002;29:530-4.
122. Yigit S, Inanir A, Karakus N, Kesici E, Bozkurt N. Common Mediterranean fever (MEFV) gene mutations associated with ankylosing spondylitis in Turkish population. *Dis Markers* 2012;33(3):113-8.
123. Tunca M, Akar S, Hawkins PN, Booth SE, Sengül B, Yavuzşen TU, et al. The significance of paired MEFV mutations in individuals without symptoms of familial Mediterranean fever. *Eur J Hum Genet* 2002;10(12):786-9.
124. Cañete JD, Arostegui JI, Queiró R, Gratacós J, Hernández MV, Larrosa M, et al. An unexpectedly high frequency of MEFV mutations in patients with anti-citrullinated protein antibody-negative palindromic rheumatism. *Arthritis Rheum* 2007;56(8):2784-8.
125. Feng J, Zhang Z, Li W, Shen X, Song W, Yang C, et al. Missense mutations in the MEFV gene are associated with fibromyalgia syndrome and correlate with elevated IL-1beta plasma levels. *PloS* 2009; 4(12):e8480.

126. Shinar Y, Kosach E, Langevitz P, Zandman-Goddard G, Pauzner R, Rabinovich E, et al. Familial Mediterranean FeVer gene (MEFV) mutations as a modifier of systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2012;21(9):993-8.
127. Berkun Y, Levy R, Hurwitz A, Meir-Harel M, Lidar M, Livneh A, et al. The familial Mediterranean fever gene as a modifier of periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, and adenopathy syndrome. *Semin Arthritis Rheum* 2011;40(5):467-72.
128. Kirino Y, Zhou Q, Ishigatsubo Y, Mizuki N, Tugal-Tutkun I, Seyahi E, et al. Targeted resequencing implicates the familial Mediterranean fever gene MEFV and the toll-like receptor 4 gene TLR4 in Behçet disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110(20):8134-9.
129. Tunca M, Akar S, Onen F, Ozdogan H, Kasapcopur O, Yalcinkaya F, et al. Familial Mediterranean fever (FMF) in Turkey: results of a nationwide multicenter study. *Medicine (Baltimore)* 2005;84:1-11.
130. Ediz L, Ozkol H, Tekeoglu I, Tuluçe Y, Gulcu E, Koyuncu I. Increased oxidative stress in patients with familial Mediterranean fever during attack period. *Afr Health Sci* 2011;11Suppl1:S6-13.
131. Korkmaz C, Ozdogan H, Kasapcopur O, Yazici H. Acute phase response in familial Mediterranean fever. *Ann Rheum Dis* 2002;61:79-81.
132. Matzner Y, Ayesh S, Hochner-Celniker D, Ackerman Z, Ferne M. Proposed mechanism of the inflammatory attacks in familial Mediterranean fever. *Arch Intern Med* 1990;150(5):1289-91.
133. La Regina M, Nucera G, Diaco M, Procopio A, Gasbarrini G, Notarnicola C, et al. Familial Mediterranean fever is no longer a rare disease in Italy. *Eur J Hum Genet* 2003;11(1):50-6.
134. Guz G, Kanbay M, Ozturk MA. Current perspectives on familial Mediterranean fever. *Curr Opin Infect Dis* 2009;22:309-15.
135. Freitas M, Lima JL, Fernandes E. Optical probes for detection and quantification of neutrophils' oxidative burst. A review. *Anal Chim Acta* 2009;649:8-23.
136. Ozyilkan E, Simsek H, Telatar H. Tumor necrosis factor in familial Mediterranean fever. *Am J Med* 1992;92:579-80.
137. Rozenbaum M, Katz R, Rozner I, Pollack S. Decreased interleukin I activity released from circulating monocytes of patients with familial Mediterranean fever during in vitro stimulation by lipopolysaccharide. *J Rheumatol* 1992;19(3):416-18.
138. Duzova A, Bakkaloglu A, Besbas N, Topaloglu R, Ozen S, Ozaltin F, et al. Role of A-SAA in monitoring subclinical inflammation and in colchicine dosage in familial Mediterranean fever. *Clin Exp Rheumatol* 2003;21:509-14.
139. Rigante D. The protean visage of systemic autoinflammatory syndromes: a challenge for inter-professional collaboration. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2010; 14(1): 1-18.
140. Booty MG, Chae JJ, Masters SL, Remmers EF, Barham B, Le JM, et al. Familial Mediterranean fever with a single MEFV mutation: where is the second hit? *Arthritis Rheum* 2009;60:1851-61.
141. Chetrit EB, Peleg H, Amar S, Heyman SN. The spectrum of MEFV clinical presentations- is it familial Mediterranean fever only? *Rheumatol* 2009; 48:1455-9.
142. Ozen S. Changing concepts in familial Mediterranean fever: Is it possible to have an autosomal-recessive disease with only one mutation? *Arthritis Rheum* 2009;60:1575-7.
143. Yigit S, Bagci H, Ozkaya O, Ozdamar K, Kuddusi C, Akpolat T. MEFV mutations in patients with familial mediterranean fever in the Black Sea region of Turkey. *J Rheumatol* 2008; 35(1):106-13.
144. Koné-Paut I, Hentgen V, Guillaume-Czitrom S, Compeyrot-Lacassagne S, Tran TA, Toutou I. The clinical spectrum of 94 patients carrying a single mutated MEFV allele. *Rheumatology (Oxford)* 2009;48:840-2.
145. Nadeau JH. Modifier genes in mice and humans. *Nat Rev Genet* 2001;2(3):165-74.

146. Jéru I, Hentgen V, Cochet E, Duquesnoy P, Le Borgne G, Grimprel E, et al. The risk of familial Mediterranean fever in MEFV heterozygotes: a statistical approach. *PLoS One* 2013;8(7):e68431.
147. De Sanctis S, Nozzi M, Del Torto M, Scardapane A, Gaspari S, de Michele G, et al. Autoinflammatory syndromes: diagnosis and management. *Italian Journal of Pediatrics* 2010;36:57.
148. Stoffman N, Magal N, Shohat T, Lotan R, Koman S, Oron A, et al. Higher than expected carrier rates for familial Mediterranean fever in various Jewish ethnic groups. *Eur J Hum Genet* 2000;8(4):307–10.
149. Akin H, Onay H, Turker E, Cogulu O, Ozkinay F. MEFV mutations in patients with familial mediterranean fever from the Aegean region of Turkey. *Mol Biol Rep* 2010;37(1):93-8.
150. Livneh A, Langevitz P, Shinar Y, Zaks N, Kastner DL, Pras M, et al. MEFV mutation analysis in patients suffering from amyloidosis of familial Mediterranean fever. *Amyloid* 1999;6(1):1-6.
151. Touitou I, Picot MC, Domingo C, Notarnicola C, Cattan D, Demaille J. The MICA region determines the first modifier locus in familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum* 2001;44(1):163-9.
152. Shohat T, Shohat D, Tyan DB, Wang SJ, Sparkes RS, Schwabe AD, et al. Familial Mediterranean fever - linkage studies with genetic markers on chromosome 6. *Tissue Antigens* 1990; 36: 103-7.
153. Musabak U, Sengul A, Oktenli C, Pay S, Yesilova Z, Kenar L, et al. Does immune activation continue during an attack-free period in familial Mediterranean fever? *Clin Exp Immunol* 2004; 138: 526-33.
154. Kinikli G, Bektaş M, Misirlioğlu M, Ateş A, Turgay M, Tuncer S, et al. Relationship between HLA-DR, HLA-DQ alleles and MEFV gene mutations in familial Mediterranean fever (FMF) patients. *Turk J Gastroenterol* 2005;16(3):143-6.
155. Cazeneuve C, Ajrapetyan H, Papin S, Roudot-Thoraval F, Geneviève D, Mndjoyan E, et al. Identification of MEFV-independent modifying genetic factors for familial Mediterranean fever. *Am J Hum Genet* 2000;67(5):1136-43.
156. Gershoni-Baruch R, Brik R, Zacks N, Shinawi M, Lidar M, Livneh A. The contribution of genotypes at the MEFV and SAA1 loci to amyloidosis and disease severity in patients with familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum* 2003;48:1149–55.
157. Akar N, Ozturk A, Arslan C, Akar E, Castillo Taucher S, Passalacqua C. A novel MEFV gene mutation (A511V) in a Chilean FMF patient. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics* 2011; 12(1):21-4.
158. Ritis K, Giaglis S, Spathari N, Micheli A, Zonios D, Tzoanopoulos D, et al. Non-isotopic RNase cleavage assay for mutation detection in MEFV, the gene responsible for familial Mediterranean fever, in a cohort of Greek patients. *Ann Rheum Dis* 2004; 63(4): 438-43.
159. Naimushin A, Lidar M, Ben-Zvi I, Livneh A. The structural effect of the E148Q MEFV mutation on the pyrin protein: a study using a quantum chemistry model. *IMAJ* 2011;13:199-201.
160. Ancarani F, La Regina M, Diaco M, Vastola M, Campobasso E, Dalvai S, et al. Searching for genes of periodic fevers of unknown origin. FMF and Beyond. The Fourth International Congress on Systemic Autoinflammatory Diseases. 6-10 Nov 2005; Bethesda, USA.
161. Ozturk A, Ozcakar B, Ekim M, Akar N. Is MEFV gene Arg202Gln (605G>A) A disease-causing mutation? *Turk J Med Sci* 2008;38(3):205–8.
162. Shinawi M, Brik R, Berant M, Kasinetz L, Gershoni-Baruch R. Familial Mediterranean fever: high gene frequency and heterogeneous disease among an Israeli-Arab population. *J Rheumatol* 2000;27(6):1492-5.

163. Yigit S, Karakus N, Tasliyurt T, Kaya SU, Bozkurt N, Kisacik B. Significance of MEFV gene R202Q polymorphism in Turkish familial Mediterranean fever patients. *Gene* 2012;506(1):43-5.
164. Halliwell B, Gutteridge JM. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd ed. England, Midsomer Norton; Oxford University Press: 1999.
165. Rice-Evans CA, Burdon RH. *New Comprehensive Biochemistry: Free Radical Damage and its Control*. Amsterdam: Elsevier Science; 1994; 58.
166. Mahajan A, Tandon V. Antioxidants and rheumatoid arthritis. *J Indian Rheumatol Assoc* 2004;12:139-42.
167. Valko M, Leibfritz D, Moncola J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39(1):44-84.
168. Onen F. Familial Mediterranean fever. *Rheumatol Int* 2006;26:489-96.
169. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 4th ed. Oxford: Clarendon Press; 2007.
170. Mannaerts GP, Van Veldhoven PP, Casteels M. Peroxisomal lipid degradation via beta and alpha-oxidation in mammals. *Cell Biochem Biophys* 2000;32:73-87.
171. Manda G, Nechifo MT, Neagu TM. Reactive oxygen species, cancer and anti-cancer therapies. *Curr Chem Biol* 2009;3:342-66.
172. Kirkali G, Tunca M, Genc S, Jaruga P, Dizdaroglu M. Oxidative DNA damage in polymorphonuclear leukocytes of patients with familial Mediterranean fever. *Free Radic Biol Med* 2008;44:386-93.
173. Sahin M, Uğuz AC, Demirkan H, Nazıroğlu M. Colchicine modulates oxidative stress in serum and leucocytes from remission patients with Family Mediterranean fever through regulation of Ca²⁺ release and the antioxidant system. *J Membr Biol* 2011;240(1):55-62.
174. Devi GS, Prasad MH, Saraswathi I, Raghu D, Rao DN, Reddy PP. Free radicals antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different types of leukemias. *Clin Chim Acta* 2000;293:53-62.
175. Mates JM, Perez-Gomez C, De Castro IN. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 1999;32(8):595-603.
176. Dimayuga FO, Wang C, Clark JM, Dimayuga ER, Dimayuga VM, Bruce-Keller AJ. SOD1 overexpression alters ROS production and reduces neurotoxic inflammatory signaling in microglial cells. *J Neuroimmunol* 2007;182(1-2):89-99.
177. Halliwell B, Clement MV, Long LH. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett* 2000;486:10-13.
178. Pavlović D. *Biološka oksidacija*. U: Koraćević D, Bjelaković G, Đorđević V, Nikolić J, Pavlović D, Kocić G, eds. *Biohemija*. Beograd: Savremena administracija; 2006: 678-705.
179. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* 2006;97:1634-58.
180. Van Ginkel G, Sevanian A. Lipid peroxidation induced membrane structural alterations. *Methods Enzymol* 1994;233:273-88.
181. Kwiatkowska S, Piasecka G, Zieba M, Piotrowski W, Nowak D. Increased serum concentrations of conjugated dienes and malondialdehyde in patients with pulmonary tuberculosis. *Respir Med* 1999;93:272-6.
182. Eritsland J. Safety considerations of polyunsaturated fatty acids. *Am J Clin Nutr* 2000;71:197S-201S.
183. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen Khoa T, Capeillère-Blandin C, Nguyen AT, Canteloup S, et al. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol* 1998;161(5):2524-32.

184. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002;82:47–95.
185. Pavlović D, Đorđenić V, Kocić G. Ćelijska signalna transdukcija – modulacija slobodnim radikalima. *Jugoslav Med Biochem* 2002;21:69–84.
186. Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology & Medicine* 2002;33(3):337-49.
187. Marklund SL, Bjelle A, Elmquist LG. Superoxide dismutase isoenzymes of the synovial fluid in rheumatoid arthritis and in reactive arthritides. *Ann Rheum Dis* 1986;45:847–51.
188. Sandström J, Karlsson K, Edlund T, Marklund SL. Heparin-affinity patterns and composition of extracellular superoxide dismutase in human plasma and tissues. *Biochem J* 1993;294(Pt 3):853-7.
189. Adachi T, Ohta H, Yamada H, Futenma A, Kato K, Hirano K. Quantitative analysis of extracellular-superoxide dismutase in serum and urine by ELISA with monoclonal antibody. *Clin Chim Acta* 1992;212:89–102.
190. Deisseroth A, Dounce AL. Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. *Physiol Rev* 1970;50:319-75.
191. Kolanjiappana K, Manoharana S, Kayalvizhi M. Measurement of erythrocyte lipids, lipid peroxidation, antioxidants and osmotic fragility in cervical cancer patients. *Clinica Chimica Acta* 2002;326:143–9.
192. Zámocký M, Koller F. Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. *Prog Biophys Mol Biol* 1999;72:19-66.
193. Robinson JM. Reactive oxygen species in phagocytic leukocytes. *Histochem Cell Biol* 2008;130(2):281–97.
194. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2007;87(1):245-313.
195. Calder PC, Albers R, Antoine JM, Blum S, Bourdet-Sicard R, Ferns GA, et al. Inflammatory disease processes and interactions with nutrition. *Br J Nutr* 2009;101:1-45.
196. Fantone JC, Ward PA. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *APJ* 1982;107: 394-416.
197. Robinson JM, Badwey JT. The NADPH oxidase complex of phagocytic leukocytes: a biochemical and cytochemical view. *Histochemistry* 1995;103:163–80.
198. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BS. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:1620–4.
199. Manni ML, Tomai LP, Norris CA, Thomas LM, Kelley EE, Salter RD, et al. Extracellular superoxide dismutase in macrophages augments bacterial killing by promoting phagocytosis. *Am J Pathol* 2011;178(6):2752–9.
200. Đorđević BV, Pavlović DD, Kocić MG. Biohemija slobodnih radikala. Niš: Medicinski fakultet; 2000.
201. Wagener FA, Carels CE, Lundvig DMS. Targeting the redox balance in inflammatory skin conditions. *Int J Mol Sci* 2013;14(5):9126-67.
202. Sarkisian T, Emerit I, Arutyunyan R, Levy A, Cernjavski L, Filipe P. Familial Mediterranean fever: clastogenic plasma factors correlated with increased O₂(-) – production by neutrophils. *Human Genetics* 1997;101:238–42.
203. Bonizzi G, Piette J, Merville MP, Bours V. Cell type-specific role for reactive oxygen species in nuclear factor-kappaB activation by interleukin-1. *Biochem Pharm* 2000;59:7–11.

204. Dincer Y, Alademir Z, Hamuryudan V, Fresko I, Akcay T. Superoxide dismutase activity and glutathione system in erythrocytes of men with Behcet's disease. *Tohoku J Exp Med* 2002;198(3):191-5.
205. Guzel S, Andican G, Seven A, Aslan M, Bolayirli M, Guzel EC, et al. Acute phase response and oxidative stress status in familial Mediterranean fever (FMF). *Mod Rheumatol* 2012;22(3):431-7.
206. Ozen S, Frenkel J, Ruperto N, Gattorno M; Eurofever Project. The Eurofever Project: towards better care for autoinflammatory diseases. *Eur J Pediatr* 2011;170(4):445-52.
207. Long SS. Distinguishing among prolonged, recurrent, and periodic fever syndromes: approach of a pediatric infectious diseases subspecialist. *Pediatr Clin North Am* 2005; 52(3):811-35, vii.
208. John CC, Gilsdorf JR. Recurrent fever in children. *Pediatr Infect Dis J* 2002; 21:1071-80.
209. Knockaert DC. Recurrent fevers of unknown origin. *Infect Dis Clin N Am* 2007;21:1189-211.
210. Knockaert DC, Vanneste LJ, Bobbaers HJ. Recurrent or episodic fever of unknown origin. *Medicine* 1993;72:184-95.
211. Konstantopoulos K, Kanta A, Deltas C, Atamian V, Mavrogianni D, Tzioufas AG, et al. Familial Mediterranean fever associated pyrin mutations in Greece. *Ann Rheum Dis* 2003;62:479-81.
212. Padeh S. Periodic fever syndromes. *Pediatr Clin North Am* 2005;52:577-609, vii.
213. Touitou I, Sarkisian T, Medlej-Hashim M, Tunca M, Livneh A, Cattani D, et al. Country as the primary risk factor for renal amyloidosis in familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum* 2007;56:1706-12.
214. Drenth JP, Haagsma CJ, van der Meer JW. Hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever syndrome. The clinical spectrum in a series of 50 patients. International Hyper-IgD Study Group. *Medicine (Baltimore)* 1994;73:133-44.
215. Simon A, Cuisset L, Vincent MF, van der Velde-Visser SD, Delpech M, van der Meer JW, et al. Molecular analysis of the mevalonate kinase gene in a cohort of patients with the hyper-IgD and periodic fever syndrome: its application as a diagnostic tool. *Ann Intern Med* 2001;135:338-43.
216. D'Osualdo A, Picco P, Caroli F, Gattorno M, Giacchino R, Fortini P, et al. MVK mutations and associated clinical features in Italian patients affected with autoinflammatory disorders and recurrent fever. *Eur J Hum Genet* 2005;13:314-20.
217. Jain SK, McVie R, Duett J, Herbst JJ. Erythrocyte membrane lipid peroxidation and glycosylated hemoglobin in diabetes. *Diabetes* 1989;38:1539-43.
218. Yao Q, Furst DE. Autoinflammatory diseases: an update of clinical and genetic aspects. *Rheumatology* 2008;47:946-51.
219. Gattorno M, Federici S, Pelagatti MA, Caorsi R, Brisca G, Malattia C, et al. Diagnosis and management of autoinflammatory diseases in childhood. *J Clin Immunol* 2008;28:73-83.
220. Hull KM, Drewe E, Aksentijevich I, Singh HK, Wong K, McDermott EM, et al. The TNF receptor-associated periodic syndrome (TRAPS); emerging concepts of an autoinflammatory disorder. *Medicine* 2002;81:349-68.
221. Cassidy JT, Petty RE, Laxer RM, Lindsley CB. Periodic fever syndromes in children. In: *Textbook of pediatric rheumatology*. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005.
222. Stankovic K, Grateau G. Autoinflammatory syndromes: diagnosis and treatment. *Joint Bone Spine* 2007;74:544-50.
223. Lindor NM, Arsenault TM, Solomon H, Seidman CE, McEvoy MT. A new autosomal dominant disorder of pyogenic sterile arthritis, pyoderma gangrenosum, and acne: PAPA syndrome. *Mayo Clin Proc* 1997;72:611-5.
224. Wise CA, Gillum JD, Seidman CE, Lindor NM, Veile R, Bashiardes S, et al. Mutations in CD2BP1 disrupt binding to PTP PEST and are responsible for PAPA syndrome, an autoinflammatory disorder. *Hum Mol Genet* 2002;11:961-9.

225. Stojanov S, Hoffmann F, Kery A, Renner ED, Hartl D, Lohse P, et al. Cytokine profile in PFAPA syndrome suggests continuous inflammation and reduced anti-inflammatory response. *Eur Cytokine Netw* 2006;17:90–7.
226. Pascual V, Allantaz F, Arce E, Punaro M, Banchereau J. Role of interleukin-1 (IL-1) in the pathogenesis of systemic onset juvenile idiopathic arthritis and clinical response to IL-1 blockade. *J Exp Med* 2005;201:1479–86.
227. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:599–603.
228. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:603–6.
229. Lesage S, Zouali H, Cezard JP, the EPWG-IBD group, Colombel JF, the EPIMAD group, et al. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* 2002; 70:845-57.
230. Gul A. Behcet's disease as an autoinflammatory disorder. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005;4:81–3.
231. Xiao W, Oefner PJ. Denaturing high-performance liquid chromatography: A Review. *Human mutation* 2001;17:439-74.
232. Andreeva JL, Kozjemakin AL, Kiskun AA. Modifikacija metoda opredelnija perekisej lipidov testes tiobarbiturovoj kisloti. *Lab Delo* 1988;11:41-3. Ruski.
233. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int* 1996;49(5):1304-13.
234. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969;244(22):6049-55.
235. Thomas RD, Westengard JC, Hay KL, Bull BS. Calibration and validation for erythrocyte sedimentation tests: role of the International Committee on Standardization in Hematology reference procedure. *Arch Pathol Lab Med* 1993;117:719-23.
236. Ozturk A, Elsobky E, Elsayed S, Alhodhod M, Akar N. Mutational analysis of MEFV gene in Egyptian patients with familial Mediterranean fever. *Turk J Med Sci* 2009;39(2):229–34.
237. Eliakim M, Levy M, Ehrenfeld M. Laboratory examinations. In: Recurrent polyserositis (Familial Mediterranean Fever, periodic disease). Amsterdam: Elsevier; 1981.
238. Mansour I, Delague V, Cazeneuve C, Dodé C, Chouery E, Pêcheux C, et al. Familial Mediterranean fever in Lebanon: mutation spectrum, evidence for cases in Maronites, Greek orthodoxes, Greek catholics, Syriacs and Chiites and for an association between amyloidosis and M694V and M694I mutations. *Eur J Hum Genet* 2001;9(1):51-5.
239. Aksentijevich I, Torosyan Y, Samuels J, Centola M, Pras E, Chae JJ, et al. Mutation and haplotype studies of familial Mediterranean fever reveal new ancestral relationships and evidence for a high carrier frequency with reduced penetrance in the Ashkenazi Jewish population. *Am J Hum Genet* 1999; 64:949–62.
240. Yalcinkaya F, Cakar N, Misirlioglu N, Tümer N, Akar N, Tekin M, et al. Genotype–phenotype correlation in a large group of Turkish patients with familial Mediterranean fever: evidence for mutation-independent amyloidosis. *Rheumatology (Oxford)* 2000;39(1):67–72.
241. Caglayan AO, Demiryilmaz F, Ozyazgan I, Gumus H. MEFV gene compound heterozygous mutations in familial Mediterranean fever phenotype: a retrospective clinical and molecular study. *Nephrol Dial Transplant* 2010;25(8):2520-3.
242. Ensari C, Ensari A, Tumer N, Ertug E. Clinicopathological and epidemiological analysis of amyloidosis in Turkish patients. *Nephrol Dial Transplant* 2005;20(8):1721–5.
243. Cerquaglia C, La Regina M, Diaco M, D'Onofrio F, Pomponi G, Neri G, et al. Genotypic correlations in Italian people afflicted with familial mediterranean fever (FMF).

FMF and Beyond. The Fourth International Congress on Systemic Autoinflammatory Diseases. 6-10 Nov 2005; Bethesda, USA.

244. Debeljak M, Toplak N, Abazi N, Kolnik M, Szabados B, Mulaosmanovic V, et al. Carrier rate of MEFV gene mutations in Central European and Balkan healthy populations. ESID 15th Biennial Meeting. 3-6 Oct 2012; Florence, Italy.

245. Dewalle M, Domingo C, Rozenbaum M, Ben-Chétrit E, Cattan D, Bernot A, et al. Phenotype-genotype correlation in Jewish patients suffering from familial Mediterranean fever (FMF). *Eur J Hum Genet* 1998;6(1):95-7.

246. Hawkins PN, Gillmore JD, Booth SE, et al. Pylrin E148Q is prevalent globally and may upregulate the inflammatory response non-specifically. Abstracts of the familial Mediterranean fever II international conference. 3 - 7 May 2000; Antalya, Turkey. *Clin Exp Rheumatol* 2000;18:A-4.

247. Ryan JG, Goldbach-Mansky R. The spectrum of autoinflammatory diseases: recent bench to bedside observations. *Curr Opin Rheumatol* 2008;20(1):66-75.

248. Gershoni-Baruch R, Brik R, Shinawi M, Livneh A. The differential contribution of MEFV mutant alleles to the clinical profile of familial Mediterranean fever. *Eur J Hum Genet* 2002;10(2):145-9.

249. Gökçe I, Gökçe S, Kılıç A, Bozlar U, Kocaoğlu M, Ongürü O, et al. Familial Mediterranean fever with protein-losing enteropathy due to constrictive pericarditis. *World J Pediatr* 2011;7(4):365-7.

250. Federici L, Rittore-Domingo C, Kone-Paut I, Jorgensen C, Rodiere M, Le Quellec A, et al. A decision tree for genetic diagnosis of hereditary periodic fever in unselected patients. *Ann Rheum Dis* 2006;65:1427-32.

251. Ben-Chétrit E, Lerer I, Malamud E, Domingo C, Abeliovich D. The E148Q mutation in the MEFV gene: is it a diseasecausing mutation or a sequence variant? *Hum Mutat* 2000;15:385-6.

252. Oetting WS, King RA. Molecular basis of albinism: mutations and polymorphisms of pigmentation genes associated with albinism. *Hum Mutat* 1999;13(2):99-115.

253. Yankaskas JR, Marshall BC, Sufian B, Simon RH, Rodman D. Cystic fibrosis adult care consensus conference report. *Chest* 2004;125(90010):1-39.

254. Yamamoto S, Shimizu S, Kiyonaka S, Takahashi N, Wajima T, Hara Y, et al. TRPM2-mediated Ca²⁺ influx induces chemokine production in monocytes that aggravates inflammatory neutrophil infiltration. *Nature Medicine* 2008;14:738-47.

255. Davtyan TK, Hakopyan GS, Avetisyan SA, Mkrtychyan NR. Impaired endotoxin tolerance induction in patients with familial Mediterranean fever. *Pathobiology* 2006;73(1):26-39.

256. Karaguezian KG, Haroutjunian VM, Mamiconyan RS, Hakobian GS, Nazaretian EE, Hovsepyan LM, et al. Evidence of oxidative stress in erythrocyte phospholipid composition in the pathogenesis of familial Mediterranean fever (periodical disease). *J Clin Pathol* 1996;49(6):453-5.

257. Savran Y, Sari I, Kozaci DL, Gunay N, Onen F, Akar S. Increased levels of macrophage migration inhibitory factor in patients with Familial Mediterranean fever. *Int J Med Sci* 2013;10(7):836-9.

258. Frankel EN, Neff WE. Formation of malonaldehyde from lipid oxidation products (Lipid oxidation, malonaldehyde synthesis, thiobarbituric acid). Elsevier Biomedical Press 1983;754(3):264-70.

259. Erdoğan Ö, Öner A, Aydın A, İşimer A, Demircin G, Bülbül M. Effect of vitamin E treatment on the oxidative damage occurring in Henoch-Schönlein purpura. *Acta Paediatr* 2003;92:546-50.

260. Sarban S, Kocyigit A, Yazar M, Isikan UE. Plasma total antioxidant capacity, lipid peroxidation, and erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clin Biochem* 2005;38(11):981-6.

261. Gurbuz M, Yamanel L, Bulucu F, Inal V, Aydin A. Oxidative stress status in familial mediterranean fever with or without proteinuria. *Free Radic Biol Med* 2005;38:271–5.
262. Brechard S, Tschirhart EJ. Regulation of superoxide production in neutrophils: role of calcium influx. *J Leukoc Biol* 2008;84(5):1223–37.
263. Köse K, Yazici C, Cambay N, Aşcıoğlu O, Doğan P. Lipid peroxidation and erythrocyte antioxidant enzymes in patients with Behçet's disease. *Tohoku J Exp Med* 2002;197(1):9-16.
264. Sezer ED, Aksu K, Caglayan O, Keser G, Karabulut G, Ercan G. DNA damage and its relationship with other oxidative stress parameters in Behcet's disease. *Rheumatol Int* 2012;32(1):217-22.
265. Onur E, Kabaroglu C, Inanir I, Var A, Guvenc Y, Gunay O, et al. Oxidative stress impairs endothelial nitric oxide levels in Behçets' disease. *Cutan Ocul Toxicol* 2011;30(3):217-20.
266. Harzallah O, Kerkeni A, Baati T, Mahjoub S. Oxidative stress: correlation with Behçet's disease duration, activity and severity. *Eur J Intern Med* 2008;19(7):541-7.
267. Halliwell B. Albumin—An important extracellular antioxidant? *Biochem Pharmacol* 1998;37:569–71.
268. Witko SV, Friedlander M, Capeillere BC, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, et al. AOPP as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int* 1996; 49(5): 1304–13.
269. Piwowar A. Advanced oxidation protein products. Part I. Mechanism of the formation, characteristics and property. *Pol Merkur Lekarski* 2010;28(164):166-9. Poljski.
270. Keskin N, Civilibal M, Eleveli M, Koldas M, Duru NS, Ozturk H. Elevated plasma advanced oxidation protein products in children with Henoch-Schonlein purpura. *Pediatr Nephrol* 2011;26(11):1989-93.
271. Yazici C, Köse K, Çalış M, Demir M, Kirnap M, Ateş F. Increased advanced oxidation protein products in Behçet's disease: a new activity marker? *Br J Dermatol* 2004;151(1):105-11.
272. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase-halide-hydrogen peroxide antibacterial system. *J Bacteriol* 1969; 95(6):2131-8.
273. Yazici C, Köse K, Calis M, Kuzugüden S, Kirnap M. Protein oxidation status in patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatology (Oxford)* 2004;43(10):1235-9.
274. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 2003;329(1-2):23-38.
275. Baskol G, Demir H, Baskol M, Kilic E, Ates F, Karakukcu C, et al. Investigation of protein oxidation and lipid peroxidation in patients with rheumatoid arthritis. *Cell Biochem Funct* 2006;24(4):307-11.
276. Ozdogan M, Devay AO, Gurer A, Ersoy E, Devay SD, Kulacoglu H, et al. Plasma total anti-oxidant capacity correlates inversely with the extent of acute appendicitis: a case control study. *World J Emerg Surg* 2006;1:6.
277. Shull S, Heintz NH, Periasamy M, Manohar M, Janssen YM, Marsh JP, et al. Differential regulation of antioxidant enzymes in response to oxidants. *J Biol Chem* 1991;266(36):24398–403.
278. Nozik-Grayck E, Suliman HB, Piantadosi CA. Extracellular superoxide dismutase. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37(12):2466-71.
279. Qin Z, Reszka KJ, Fukai T, Weintraub NL. Extracellular superoxide dismutase (ecSOD) in vascular biology: An update on exogenous gene transfer and endogenous regulators of ecSOD. *Transl Res* 2008;151:68–78.
280. Dai L, Claxson A, Marklund SL, Feakins R, Yousaf N, Chernajovsky Y, et al. Amelioration of antigeninduced arthritis in rats by transfer of extracellular superoxide dismutase and catalase genes. *Gene Ther* 2003;10:550–8.
281. Bowler RP, Nicks M, Tran K, Tanner G, Chang LY, Young SK, et al. Extracellular superoxide dismutase attenuates lipopolysaccharide-induced neutrophilic inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004;31(4):432-9.

282. Ross AD, Banda NK, Muggli M, Arend WP. Enhancement of collagen-induced arthritis in mice genetically deficient in extracellular superoxide dismutase. *Arthritis Rheum* 2004;50(11):3702-11.
283. Fan J, Frey RS, Rahman A, Malik AB. Role of neutrophil NADPH oxidase in the mechanism of tumor necrosis factor- α -induced NF- κ B activation and intercellular adhesion molecule-1 expression in endothelial cells. *J Biol Chem* 2002;277:3404–11.
284. Hasan HR, Mathkor TH, Al-Habal MH. Superoxide dismutase isoenzyme activities in plasma and tissues of Iraqi patients with breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012;13(6):2571-6.
285. Andrade BB, Reis-Filho A, Souza-Neto SM, Raffaele-Netto I, Camargo LM, Barral A, et al. Plasma superoxide dismutase-1 as a surrogate marker of vivax malaria severity. *PLoS Negl Trop Dis* 2010;4(4):e650.
286. Taysi S, Kocer I, Memisogullari R, Kiziltunc A. Serum oxidant/antioxidant status in patients with Behçet's disease. *Ann Clin Lab Sci* 2002;32(4):377-82.
287. Yildirim K, Uzkeser H, Keles M, Yildirim S, Karatay S, Kiziltunc A, et al. Cu/Zn-superoxide dismutase, paraoxonase and arylesterase activities and malondialdehyde levels in patients with familial mediterranean fever. *Bratisl Lek Listy* 2012;113(9):561-4.
288. Koltuksuz U, Uz E, Ozen S, Aydinç M, Karaman A, Akyol O. Plasma superoxide dismutase activity and malondialdehyde level correlate with the extent of acute appendicitis. *Pediatr Surg Int* 2000;16(8):559-61.
289. Russo AJ. Increased serum Cu/Zn SOD in individuals with clinical depression normalizes after zinc and anti-oxidant therapy. *Nutr Metab Insights* 2010;3:37-42.
290. Morita A, Minami H, Sakakibara N, Sato K, Tsuji T. Elevated plasma superoxide dismutase activity in patients with systemic sclerosis. *J Dermatol Sci* 1996;11(3):196-201.
291. Marikovsky M, Ziv V, Nevo N, Harris-Cerruti C, Mahler O. Cu/Zn superoxide dismutase plays important role in immune response. *J Immunol* 2003;170(6):2993-3001.
292. Taysi S, Demircan B, Akdeniz N, Atasoy M, Sari RA. Oxidant/antioxidant status in men with Behçet's disease. *Clin Rheumatol* 2007;26(3):418-22.
293. Bai J, Rodriguez AM, Melendez JA, Cederbaum AI. Overexpression of catalase in cytosolic or mitochondrial compartment protects HepG2 cells against oxidative injury. *J Biol Chem* 1999;274:26217-24.
294. Kowaltowski AJ, Vercesi AE, Rhee SG, Netto LE. Catalases and thioredoxin peroxidase protect *Saccharomyces cerevisiae* against Ca(2+)-induced mitochondrial membrane permeabilization and cell death. *FEBS Lett* 2000;473:177-82.
295. Tome ME, Baker AF, Powis G, Payne CM, Briehl MM. Catalase-overexpressing thymocytes are resistant to glucocorticoid-induced apoptosis and exhibit increased net tumor growth. *Cancer Res* 2001;61:2766-33.
296. Yalcinkaya F, Ozen S, Ozcakar ZB, Aktay N, Cakar N, Düzova A, et al. A new set of criteria for the diagnosis of familial Mediterranean fever in childhood. *Rheumatology (Oxford)* 2009;48:395–8.
297. Goldbach-Mansky R, Kastner DL. Autoinflammation: the prominent role of IL-1 in monogenic autoinflammatory diseases and implications for common illnesses. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124(6):1141-9; quiz 1150-1.
298. Padeh S, Livneh A, Pras E, Shinar Y, Lidar M, Feld O, et al. Familial Mediterranean fever in the first two years of life: A unique phenotype of disease in evolution. *J Pediatr* 2010;156:985-9.
299. Gallizzi R, Vicchio P, Loddo I. Familial Mediterranean Fever: an overview. *The child: a journal of pediatrics* 2012; 1(1).
300. Medlej-Hashim M, Loiselet J, Lefranc G, Mégarbané A. Familial Mediterranean Fever (FMF): from diagnosis to treatment. *Sante* 2004;14(4):261-6. Francuski.

301. Ozen S, Bakkaloglu A, Yilmaz E, Duzova A, Balci B, Topaloglu R, et al. Mutations in the gene for familial Mediterranean fever: do they predispose to inflammation? *J Rheumatol* 2003;30:2014–8.
302. Notarnicola C, Didelot MN, Seguret F, Demaille J, Touitou I. Enhanced cytokine mRNA levels in attack-free patients with familial Mediterranean fever. *Genes Immun* 2002;3:43–5.
303. Yazici H, Ozdogan H. Familial Mediterranean fever in Turkey. In: Sohar E, Gafni J, Pras M. editors. *I International Conference on FMF*. London: Freund Publishing House; 1997:66–71.
304. Kone-Paut I, Dubuc M, Sportouch J, Minodier P, Garnier JM, Touitou I. Phenotype-genotype correlation in 91 patients with familial Mediterranean fever reveals a high frequency of cutaneomucous features. *Rheumatology (Oxford)* 2000;39:1275–9.
305. Brick R, Litmanovitch D, Berkwitz D, Shamir R, Shinawi M, Gershoni-Baruch R. High incidence of FMF mutations among children from Mediterranean extraction with recurrent abdominal pain. Abstracts of the familial Mediterranean fever II international conference. 3 - 7 May 2000; Antalya, Turkey. *Clin Exp Rheumatol* 2000;18:F-2.
306. Tunca M, Kirkali G, Soy Turk M, Akar S, Pepys MB, Hawkins PN. Acute phase response and evolution of Familial Mediterranean fever. *Lancet* 1999;353:1415.
307. Tchernitchko D, Legendre M, Cazeneuve C, Delahaye A, Niel F, Amselem S. The E148Q MEFV allele is not implicated in the development of familial Mediterranean fever. *Hum Mutat* 2003;22(4):339-40.
308. Topaloglu R, Ozaltin F, Yilmaz E, Ozen S, Balci B, Besbas N, et al. E148Q is a disease-causing MEFV mutation: a phenotypic evaluation in patients with familial Mediterranean fever. *Ann Rheum Dis* 2005;64:750–2.
309. Tchernitchko D, Moutereau S, Legendre M, Delahaye A, Cazeneuve C, Lacombe C, et al. MEFV analysis is of particularly weak diagnostic value for recurrent fevers in Western European Caucasian patients. *Arthritis Rheum* 2005;52:3603–5.
310. Gershoni-Baruch R, Shinawi M, Shamaly H, Katsinets L, Brik R. Familial Mediterranean fever: the segregation of four different mutations in 13 individuals from one inbred family: genotype-phenotype correlation and intrafamilial variability. *Am J Med Genet* 2002;109(3):198-201.

Prilog 1. Informisani pristanak roditelja za učešće u istraživanju

INFORMISANI PRISTANAK RODITELJA ZA UČEŠĆE U ISTRAŽIVANJU

Naslov istraživanja: „Prisustvo mutacija MEFV gena u populaciji dece Srbije“, Istraživanje se sprovodi u sklopu projekta „Preventivni, terapijski i etički pristup prekliničkim i kliničkim istraživanjima gena i modulatora redoks ćelijske signalizacije u imunskom, inflamatornom i proliferativnom odgovoru ćelije“, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Nišu.

1. OPŠTE INFORMACIJE I SVRHA ISTRAŽIVANJA

Molimo Vas za Vašu dozvolu da koristimo kliničke, laboratorijske i genetičke podatke Vašeg deteta radi ispitivanja prisustva mutacija MEFV gena, koji je odgovoran za nastanak familijarne mediteranske groznice (FMF). Ova bolest najčešće ostaje nedijagnostikovana zbog nepoznate zastupljenosti i nedovoljnog prepoznavanja bolesti na području Srbije.

U narednim pasusima ćete naći detaljne informacije u vezi ovog istraživanja, koje je važno da pažljivo pročitate i razumete. Učešće Vašeg deteta u ovom projektu je dobrovoljno. Vi i Vaše dete ste slobodni da prihvatite, odbijete ili odustanete od učešća u bilo koje vreme bez navođenja razloga i bez bilo kakvih neprijatnosti vezanih za njegovu/njenu buduću medicinsku terapiju. Ukoliko se Vi i Vaše dete saglasite da ono želi da učestvuje u ovoj istraživanju, moraćete da potpišete ovaj obrazac informisanog pristanka.

Porodična ili familijarna mediteranska groznica je nasledna bolest koju odlikuju napadi visoke temperature udruženi sa bolom u trbuhu, bolom u grudima i/ili bolom i otokom zglobova. Bolest se javlja kod osoba mediteranskog porekla i bliskog istoka, kao što su Jevreji, Turci, Arapi i Jermeni. Retka je u drugim delovima sveta. Međutim, nakon otkrivanja gena koji je odgovoran za njenu pojavu, bolest se dijagnostikuje češće i u sredinama gde se smatralo da je retka, kao što su Italija, Grčka, Amerika.

U ovoj bolesti, MEFV gen je izmenjen, te se proces zapaljenja u organizmu ne može kontrolisati. Bolest se nasleđuje recesivno, što znači da bi se bolest manifestovala kod neke osobe potrebno je da ona nasledi od oba roditelja po jedan mutirani gen. Roditelji su nosioci izmenjenog gena i nemaju očigledne znake bolesti. Bolest se može naći i kod drugih članova porodice, braće i sestara, rođaka. Međutim mutacija gena se otkriva kod 70-80% bolesnika sa FMF, što znači da postoje i bolesnici čiji geni nemaju oštećenje.

Lečenje FMF je jednostavno, jeftino i bez ozbiljnih neželjenih efekata. Danas je kolhicin jedini lek koji se primenjuje za lečenje FMF. Ako se lek redovno uzima napadi bolesti prestaju u oko 60% bolesnika. Ovaj lek sprečava i razvoj amiloidoze, ozbiljne komplikacije FMF. U ovoj studiji će učestvovati približno 100 dece iz Srbije, uzrasta od 2 do 18 godina, tokom narednih godinu dana.

Osnovna svrha ovog istraživanja je utvrđivanje potencijalnih nosilaca mutacija MEFV gena u Srbiji, povezanost mutacije gena sa kliničkim manifestacijama bolesti, utvrđivanje prisustva mutacije u zdrave dece kao i dece sa ponovljenim febrilnostima sa područja Srbije.

Potvrđivanjem dijagnoze FMF-a omogućava se rani početak primene specifične terapije koja u značajnoj meri pomaže bolesnicima i sprečava nastanak komplikacija bolesti.

2. OPŠTA IZJAVA O PRIVATNOSTI PODATAKA

Da bi se sprovedo ovo istraživanje, neophodno je da se prikupe i razmene medicinske informacije o Vašem detetu. Informacije koje identifikuju Vaše dete će biti korišćene u ovom istraživanju, uključujući i nove informacije koje se dobiju ili prikupe tokom istraživanja. Ova izjava o tajnosti

podataka, u daljem tekstu "Izjava", objašnjava kako će se informacije o Vašem detetu koristiti i kome će se otkrivati. Vi i Vaše dete imate pravo da vidite sakupljene informacije o Vašem detetu.

Ako Vi/Vaše dete prihvatite da učestvujete u ovom projektu, informacije o Vašem detetu će se koristiti i otkrivati na sledeće načine:

Ime i identitet Vašeg deteta neće biti poznati bilo kome osim glavnom istraživaču, i ovim informacijama će biti dodeljen određeni broj. Informacije koje su sakupljene u istraživanju će biti strogo anonimne. Formiraće se elektronska baza sakupljenih podataka. Pristup podacima koji se nalaze u elektronskoj bazi će imati samo članovi istraživačkog tima. Ako rezultati istraživanja budu objavljeni, identitet Vašeg deteta će ostati nepoznat i strogo poverljiv. Potpisivanjem dokumenta o informisanom pristanku za ovu studiju, Vi/Vaše dete dajete dozvolu da se informacije o Vašem detetu koriste kako je opisano u ovoj Izjavi.

Vi ili Vaše dete možete da odlučite da ne učestvujete ili da prekinete učešće u bilo kom trenutku bez objašnjenja i za to nećete biti kažnjeni, niti ćete izgubiti bilo kakve beneficije na koje bi Vaše dete inače imalo prava. Vi/Vaše dete možete da povučete svoju dozvolu tako što ćete o tome da obavestite glavnog istraživača. Ukoliko Vi/Vaše dete povučete svoju dozvolu, istraživači će i dalje moći da koriste podatke dobijene tokom istraživanja koji su prikupljeni pre nego što ste povukli svoj pristanak. Ukoliko ne povučete svoj pristanak, saglasnost za korišćenje ovih podataka će važiti do završetka istraživanja i dok se bilo koja informacija (koja ne odaje identitet Vašeg deteta) nalazi u bazi podataka za upotrebu u budućim istraživanjima ovog projekta.

Istraživači mogu da prekinu učešće Vašeg deteta u ovom istraživanju bez Vaše saglasnosti iz bilo kog razloga, a u najboljem interesu Vašeg deteta.

Ukoliko imate bilo kakva pitanja ili ukoliko ne razumete neku informaciju, molimo Vas pitajte lekara koji vodi projekat ili druge članove istraživačkog tima. O projektu takođe možete da razgovarate sa svojim lekarom, porodicom ili prijateljima. Molimo Vas ostavite sebi dovoljno vremena da donesete svoju odluku.

3. PROCEDURE ISTRAŽIVANJA

U smislu ostvarenja ciljeva istraživanja Vi i Vaše dete ćete morati da odgovorite na pitanja iz Upitnika ovog istraživanja. Ukoliko se bilo šta promeni tokom trajanja istraživanja, to morate reći lekaru ili drugim članovima istraživačkog tima.

Metode koje će se koristiti prilikom istraživanja su rutinske i standardizovane i ne predstavljaju rizik po zdravlje. Samo uzimanje krvi, genetske i biohemijske analize koje se planiraju ne predstavljaju rizik za ispitanike, i biće uzimani prilikom redovnih laboratorijskih kliničkih kontrola.

Lekar koji vodi istraživanje će Vas i Vaše dete uputiti kada treba ponovo da dođete na kliniku. Sledeći postupci će se obaviti pri posetama tokom istraživanja:

- Biće Vam postavljena pitanja iz Upitnika istraživanja o zdravstvenom stanju Vašeg deteta, o mogućim tegobama koje oseća, objektivnim znacima i lekovima koje uzima.
- Uzorci krvi će se uzimati pri posetama radi rutinskih biohemijskih i hematoloških analiza krvi, dok će se jedan uzorak krvi izdvojiti radi genetičkih ispitivanja.
- U nekim slučajevima može biti potrebno da se određeni testovi i postupci sprovedeni tokom istraživanja ponove. Na primer, do toga može doći ukoliko su neki od rezultata neupotrebljivi.

4. KORISTI UDRUŽENE SA OVOM STUDIJOM

Ovim ispitivanjem ćete dobiti informaciju o prisustvu mutacije MEFV gena kod Vašeg deteta, koja može biti odgovorna za nastanak ponovljenih febrilnosti. U tom slučaju će dete biti pošteđeno daljih nepotrebnih ispitivanja u smislu dijagnostikovanja nepoznate zapaljenske bolesti ili nepotrebnih intervencija i lečenja druge bolesti (antibioticima i sl.). Rana dijagnoza porodične mediteranske

groznice je jako važna zbog ranog započinjanja terapije. Kod nelečenih osoba ili odlaganja početka terapije se povećava rizik od sekundarne amiloidoze, koja predstavlja ozbiljnu komplikaciju bolesti. Rana primena terapije sprečava razvoj hroničnog artritisa, oštećenja i deformacije zglobova, poremećaj rada bubrega u odraslom dobu, odnosno, smanjenje radne sposobnosti.

Ovo istraživanje može da donese direktnu medicinsku korist Vašem detetu jer omogućava sveobuhvatni klinički i laboratorijski pregled. Informacije koje dobijete mogu ukazati na prisustvo ove mutacije u porodici i moguću pojave iste bolesti kod Vaših srodnika. Informacije dobijene tokom ovog istraživanja mogu biti korisne i drugim osobama sa sličnim zdravstvenim problemima.

5. RIZICI VEZANI ZA ISTRAŽIVANJE

Istraživanje nema dopunske rizike po ispitanike. Sve metode koje se koriste prilikom istraživanja su rutinske i standardizovane i ne nose dodatni rizik po zdravlje Vašeg deteta. Ovo istraživanje je odobreno od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Nišu. Etički komitet je obavio nezavisnu proveru istraživanja i dao svoje odobrenje za izvođenje istraživanja.

5. Koliki su troškovi učešća u ovom istraživanju?

Sve analize, procedure i posete ordinaciji koje su u vezi sa učešćem Vašeg deteta u ovom istraživanju biće Vam besplatno obezbeđene. Vi i vaše dete nećete imati nikakve dodatne troškove zbog učešća u ovom istraživanju. Vaše dete neće biti plaćeno za učešće u ovom istraživanju.

6. Koga treba da zovem ukoliko imam pitanja?

Ukoliko imate bilo kakva pitanja u vezi sa ovim istraživanjem, ili mislite da je kod Vašeg deteta došlo do povrede koja je u vezi sa samim istraživanjem, ili želite dodatne informacije u vezi sa istraživanjem molimo Vas pozovite:

Dr Jelenu Radović
Ime i prezime istraživača ili osobe za kontakt

063/8109929 _
Broj telefona

PRISTANAK

Objašnjen mi je cilj i dizajn istraživanja „Prisustvo mutacija MEFV gena u populaciji dece Srbije“ i dobio/la sam priliku da o tome porazgovaram i postavim pitanja. Na sva moja pitanja sam dobio/la zadovoljavajuće odgovore. Dobrovoljno pristajem da moje dete učestvuje u ovom istraživanju i odobravam korišćenje i otkrivanje njegovih ili njenih zdravstvenih informacija kako je opisano u ovom obrascu.

Svojim potpisom prihvatom i da se uzeti laboratorijski uzorci od moga deteta mogu koristiti u svrhu ovog istraživanja.

Razumeo/la sam da ću dobiti kopiju ovog potpisanog i datiranog obrasca pristanka.

Roditelj ili zakonski zastupnik deteta:

Ime i prezime

Potpis

Datum

Osoba koja obezbeđuje pristanak (saradnici tima)

Ime i prezime

Potpis

Datum

Svedok*

Ime i prezime

Potpis

Datum

*Svedok mora biti prisutan tokom celog procesa davanja informisanog pristanka.

Prilog 2. Informisani pristanak bolesnika za učesće u istraživanju za decu uzrasta do 18 godina

INFORMISANI PRISTANAK BOLESNIKA ZA UČEŠĆE U ISTRAŽIVANJU ZA DECU UZRASTA DO 18 GODINA

Naslov istraživanja: „Prisustvo mutacija MEFV gena u populaciji dece Srbije“, Istraživanje u sklopu projekta „Preventivni, terapijski i etički pristup prekliničkim i kliničkim istraživanjima gena i modulatora redoks ćelijske signalizacije u imunskom, inflamatornom i proliferativnom odgovoru ćelije“, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Nišu.

U ovom Informisanom pristanku ćeš možda naići na reči koje ne razumeš, zbog toga te molimo da pitaš svog lekara ili njegove pomoćnike da ti objasne sve što ne razumeš. Možeš da uzmeš koliko god želiš vremena da razmisliš i razgovaraš sa svojom porodicom.

U ovom istraživanju će se ispitivati da li postoji promena na jednom genu (molekulu u ćeliji) koji se zove MEFV. Ova promena može da bude razlog bolesti koja se zove “Porodična Mediteranska groznica”. U njoj se povremeno javljaju visoka temperatura i bolovi u telu.

Pozivamo te da učestvuješ u ovom istraživanju. Mi ovo radimo da prikupimo podatke koliko dece ima ovu promenu u Srbiji. Njeno otkrivanje je važno da bi brzo otkrili bolest koju izaziva. U ovom istraživanju učestvuju i drugi dečaci i devojčice.

Tvoje ime i lični podaci će biti poznati samo tvom lekaru.

Ako želiš da učestvuješ u istraživanju moraćeš da nam odgovoriš na neka pitanja o svom zdravlju. Zajedno sa tobom će uvek biti tvoji roditelji (ili zakonski zastupnik).

Kada budeš morao/la da daš krv kod lekara, jedan deo nje će se uzeti za ovo istraživanje. Lekar će koristiti najmanju moguću iglu. Ovo može da boli i može da ostavi plavu fleku, ali će ona nestati.

U ovo istraživanje ćeš biti uključen samo ako želiš. Ako više ne budeš želeo/la da učestvuješ, možeš slobodno da odeš bilo kad, bez bilo kakvih posledica. Niko se neće ljutiti na tebe ukoliko ne želiš da učestvuješ.

Ako imaš bilo kakva pitanja možeš slobodno da pozoveš svog lekara i razgovaraš s njim.

PRISTANAK STRANA ZA POTPIS

Da bi učestvovao u ovom istraživanju, tvoji roditelji (ili zakonski zastupnik) će morati da potpišu Informisani pristanak za roditelje, a od tebe se traži da potpišeš i datiraš ovu stranu za potpise Informisanog pristanka za decu.

Potpisivanjem ove strane ti potvrđuješ da:

- si pažljivo pročitao/la i razumeo/la šta je napisano i imao/la si vremena da razmisliš o tome.
- na sva tvoja pitanja je odgovorio tvoj lekar.

Izjavljujem da se slažem sa učešćem u istraživanju „Prisustvo mutacija MEFV gena u populaciji dece Srbije“.

Odgovoriću na sva pitanja iz istraživanja svom lekaru. Podaci iz upitnika i moj uzorak krvi se mogu koristiti za ovo istraživanje.

U bilo koje vreme mogu da odlučim da se povučem iz istraživanja.

Dobiću potpisanu i datiranu kopiju ovog Informisanog pristanka za decu da je imam kod sebe.

Ispitanik

Ime i prezime

Potpis

Datum

Osoba koja obezbeđuje pristanak

Ime i prezime

Potpis

Datum

Svedok*

Ime i prezime

Potpis

Datum

*Svedok mora biti prisutan tokom celog procesa davanja informisanog pristanka.

Prilog 3. Modifikovani upitnik Eurofever upitnika za potrebe istraživanja

UPITNIK Istraživanja "Prisustvo mutacija MEFV gena u populaciji dece Srbije"

INFORMACIJE O BOLESNIKU

Ime i prezime (opciono) _____
Broj telefona: _____ Adresa: _____
Pol: muški ženski
Zemlja rođenja _____ Zemlja stanovanja _____
Datum rođenja ili godine u vreme popunjavanja upitnika _____
ID bolesnika _____
(popunjava istraživač: npr. Petar Ristic rođen 25 marta 1970 = PR 250370)
Datum pojave prvih kliničkih manifestacija _____ (dan/mes/god)
Datum prve posete _____ Datum zadnje posete _____

KRITERIJUMI ZA UKLJUČIVANJE

Da li je dobijen usmeni ili pismeni pristanak za ANONIMNO prikupljanje podataka od bolesnika ili zakonskog zastupnika, i od bolesnika ako je uzrasta ≥ 10 godina.

Da Ne Datum pristanka _____

Da li bolesnik boluje od neke bolesti?

Navedi bolest: _____

Druge relevantne pridružene bolesti: _____

PORODIČNA ANAMNEZA

Da li su rođaci oboleli?

Način nasleđivanja: autozomno dominantni recesivni X-vezano nepoznato

Da li je majka obolela?

Navedi: _____

Da li je otac oboleo?

Navedi: _____

Da li su brat ili sestra oboleli?

Navedi: _____

Da li je drugi rođak oboleo? _____

KLINIČKE MANIFESTACIJE

Tok bolesti: kontinualanrekurentni kontinualan i rekurentni
(kontinualne manifestacije sa mogućim epizodama egzacerbacije; rekurentne manifestacije udružene ili nezavisne od epizoda groznice).

1. Groznica ($>38^{\circ}\text{C}$): nikada ponekad ili često uvek nepoznato (NP)

2. Slaba groznica $<38^{\circ}\text{C}$: nikada ponekad ili često uvek NP

3. Srednje vreme trajanja epizoda: dani _____ sati _____ ne specifično NP

4. Broj epizoda/godina (srednja vrednost): _____

5. Obrazac: regularan (periodičan) iregularan

6. Sezonske promene:

7. Poznati okidači: _____

4. Cerebralni MRI/CT sken: Datum _____
(lokacija lezije, tromboza venskog sinusa, atrofija, meningitis..)

5. Biopsije: Datum _____
Ako "da", navedite: _____

(kože, sinovije, bubrega, konjuktiva, kosti, drugo..nalaz)

6. Audiogram, fundoskopija? _____

TERAPIJA LEKOVIMA

Ako "da", navedite: _____

Navesti da li je terapija korišćena tokom napada, kao održavanje, kontinuirano ili diskontinuirano.
Navesti efikasnost terapije: kompletni odgovor, delimični odgovor, neuspeh, pogoršanje.

(NSAIDS, Steroidi, Kolhicin, Sulfasalazin, Metotreksat, Interferon, Ciklofosamid,
Azatioprin, Ciklosporin, Talidomid, Anakinra, Kanakinumab, Infliximab, Etanercept,
Adalimumab, Rilonacept, Tocilizumab, Bifosfonati, Cimetidin, Statini, drugo..)

Ako je bilo neželjenih reakcija navesti: _____

OPERACIJE

Tonzilektomija, adenoidektomija? _____ Datum _____

Drugo: _____

Napomena:

Biografija dr Jelene Radović

Lični podaci

Datum rođenja: 21.02.1982.

Mesto: Niš, Srbija

Obrazovanje

2009.- Doktorske akademske studije, smer Molekularna medicina, Medicinski fakultet u Nišu.

2009. Položen državni ispit za doktore medicine, Ministarstvo zdravlja, Srbija.

2001/2008. Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu (prosečna ocena **9.65**).

1997/2001. Gimnazija "Svetozar Marković", prirodno-matematički smer, Niš.

Radno iskustvo

2014. Saradnik u nastavi na predmetu Patofiziologija, Medicinskog fakulteta u Nišu.

Od 2010. angažovana je na predmetu Patofiziologija, Medicinskog fakulteta u Nišu, kao saradnik u nastavi – volonter.

2011-2014. Angažovanje na projektu Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, ev. broj III 41018.

Stipendije

Od 2010.- Stipendista Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

Peti najbolje diplomirani student Medicinskog fakulteta u Nišu za 2007/2008. godinu.

2005-2008. Stipendija Republičke fondacije za razvoj naučnog i umetničkog podmlatka Srbije.

2006. Sertifikat komiteta IFMSA za uspešno izveden program profesionalne razmene studenata, na odeljenju kardiologije, Dolj County University Hospital, Craiova, Rumunija.

2006. Eurobank EFG školarina za najbolje studente Srbije.

2005. Zahvalnica Medicinskog fakulteta u Nišu za postignute izvanredne rezultate na konkursu Republičke fondacije za razvoj naučnog i umetničkog podmlatka Srbije.

2004. Stipendija Niške fondacije za talentovane studente.

2002. Studentska stipendija Ministarstva prosvete Srbije.

Članstvo

2013. Sekretar časopisa „Acta Medica Medianae“.

2013. Član srpskog društva za mitohondrijsku i slobodno radikalnu fiziologiju.

2013. Član udruženja za kardionefrologiju Srbije.

Od 2010. angažovana na projektima Ministarstva nauke i tehnološkog razvoja RS br. III 41018.

2010. Član sekretarijata časopisa "Acta Medica Medianae".

2009. Član Lekarske komore Srbije.

Učešće na više seminara i kurseva u zemlji i inostranstvu (izvod):

2013. Naučni kongres „Život sa slobodnim radikalima: Hemija, Biologija, Medicina“ II Kongres srpskog društva za mitohondrijalnu i slobodno-radikalnu fiziologiju.

2013. Sertifikat Prvog kongresa kardionefrologije i hipertenzije Jugoistočne Evrope.

2012. Sertifikat „32nd Balkan Medical Week“, Srpske sekcije Balkanske medicinske unije.

2012. 7th Mass Spectrometry Summer School, Universite Pierre & Marie Curie. Faculty of Sciences and Mathematics. May 30th – June 1st 2012, Niš, Serbia.

2011. ANALYSIS DOO i Thermo Fisher Scientific u saradnji sa Hemijskim fakultetom Univerziteta u Beogradu. Smarter technology - Safe Food and Environment.



Прилог 1.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

Заступљеност мутација и R202Q полиморфизма гена за породичну
медитеранску грозницу и њихов утицај на оксидативни стрес и кли-
ничке запаљенске манифестације

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација, ни 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, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

У Нишу, 15.04.2014.

Аутор дисертације: Др Јелена Радовић

Потпис докторанда:

Јелена Радовић



Прилог 2.

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Име и презиме аутора: Јелена Радовић

Студијски програм: МЕДИЦИНА

Наслов рада: ЗАСТУПЉЕНОЋ ШТАЏИЈА И R202Q ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ЗА ПОРОДИЧНУ ШЕДИКЕРАНСКУ
ГРСВНИЦУ И ЊИХОВ УТИЦАЈ НА ОКСИДАТИВНИ СТРЕС И КЛИНИЧКЕ ЗАДАЉЕКСКЕ ИН-
ФИЕСТАЦИЈЕ

Ментор: Проф. др Јелена Војчиновић

Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације истоветна електронској верзији, коју сам предао/ла за уношење у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 14.04.2014.

Аутор дисертације: др Јелена Радовић

Потпис докторанда:



Прилог 3.

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да, у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

Заступљеност шундација и R202 Q болниморфизма гена за породичну медитеранску грозницу и њихов утицај на оксидативни стрес и клиничке запаљенске манифестације

која је моје ауторско дело.

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

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити 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 подвучете само једну од шест понуђених лиценци; кратак опис лиценци је у наставку текста).

У Нишу, 14.04.2014.

Аутор дисертације: Др Јелена Радовић

Потпис докторанда: