

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Dijana M. Perović

**Ispitivanje polimorfizama gena za citokine kod
pacijenata sa čestom varijabilnom
imunodeficijencijom**

Doktorska disertacija

Beograd, 2016.

UNIVERSITY OF BELGRADE

SCHOOL OF MEDICINE

Dijana M. Perović

**Evaluation of cytokine genetic polymorphism
in patients with common variable
immunodeficiency**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016.

Mentor:

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

Komentor:

Prof. dr Branka Bonači - Nikolić, vanredni profesor Medicinskog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije

Prof. dr Dušan Popadić, vanredni profesor Medicinskog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

Doc. dr Biljana Jekić, docent Medicinskog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Jelena Milašin, redovni profesor Stomatološkog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane doktorske disertacije:

Zahvalnica

Ovom prilikom želim da se zahvalim:

Prof. dr Veri Bunjevački, mentoru, na ukazanom poverenju, podršci i korisnim savetima

Prof. dr Branki Bonači-Nikolić, komentoru, čiji su entuzijizam, energija i veliko znanje učinili da lakše sagledam i savladam složenu i heterogenu bolest koja je predmet ove teze, i da do kraja istraživanja zavolim njenu kompleksnost

Posebnu zahvalnost dugujem **Ass. dr Vladimiru Peroviću**, mom suprugu, na velikoj ličnoj i profesionalnoj pomoći u svim etapama izrade ove disertacije

Zahvaljujem osoblju **Instituta za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu** na nesebičnoj pomoći u izradi eksperimentalnog dela istraživanja, posebno **Prof. dr Dušanu Popadiću**, predsedniku komisije za odbranu disertacije, na korisnim komentarima i sugestijama

Svim pacijentima obolelim od česte varijabilne imunodeficijencije koji su učestvovali u istraživanju takođe dugujem veliku zahvalnost

Zahvaljujem članovima moje porodice, majci, sestri i bratu, na podršci i veri da ću savladati i ovu stepenicu na putu profesionalnog napredovanja

I na kraju, ali ne na poslednjem mestu, želim da izrazim zahvalnost mojoj deci: **Lazaru, Mariji i Danilu**, uz koje je ova stepenica samo naizgled bila teža, jer bez njihovog prisustva i безусловne ljubavi, ona ne bi ni imala tako velikog značaj

Tezu posvećujem svom ocu

Ispitivanje polimorfizama gena za citokine kod pacijenata sa čestom varijabilnom imunodeficijencijom

Dijana M. Perović

Sažetak

Uvod: Česta varijabilna imunodeficijencija (CVID) je bolest heterogene kliničke slike koju odlikuju poremećena diferencijacija i maturacija B-ćelija uz nedovoljnu produkciju antitela. Pripada grupi retkih bolesti sa procenjenom prevalencijom od 1:25000 do 1:50000, ali je ujedno najčešća klinički relevantna primarna imunodeficijencija. Početak i tok bolesti su veoma varijabilni. U kliničkoj slici dominiraju ponavljane bakterijske infekcije, uz brojne inflamatorne, limfoproliferativne i autoimunske poremećaje, kod približno polovine pacijenata. Sporadični oblici CVID se najverovatnije nasleđuju poligeno, ali je opisano više monogenских uzročnih mutacija koje se javljaju u malom procentu prevashodno familijarnih oblika CVID. Opisani su brojni imunološki poremećaji, ali uzrok nastanka bolesti je još uvek nepoznat. Nekoliko istraživača je pretpostavilo da poremećaj u produkciji citokina, među kojima su i TNF, IL-10, IL-6 i IFN-gama, ima ulogu u etiopatogenezi poremećaja.

Ciljevi istraživanja: Testirati hipotezu da genski polimorfizmi *TNF* (-308G/A), *IFNG* (+874T/A), *IL10* (-1082G/A, -819T/C i -592A/C), i *IL6* (-174G/C) doprinose sklonosti ka javljanju CVID ili posebnih kliničkih manifestacija bolesti. Ispitati distribucije alela i genotipova polimorfizama u genima IL-10, IL-6 u populaciji zdravih ljudi u Srbiji i uporediti ih sa objavljenim podacima za druge populacije. Ispitati produkciju TNF, IL-10, IL-6 i IFN-gama kod pacijenata sa CVID u odnosu na zdrave kontrole, kao i korelaciju genotipa pacijenata sa nivoima citokina.

Pacijenti i metode: Trideset pet pacijenata sa CVID genotipizirani su pomoću Taqman eseja radi analize izabranih polimorfizama u *TNF*, *IL6*, *IL10*, i *IFNG*, kao i 250 zdravih kontrola za polimorfizme u genima *IL6* i *IL10* za koje nisu postojali podaci u zdravoj populaciji Srbije. Za ispitivanje slaganja distribucija dobijenih frekvencija genotipova u populaciji sa očekivanim vrednostima po Hardy-Weinberg ravnoteži, primenjivan je χ^2 test. Genotipsko-fenotipska korelacija je vršena tako što su pacijenti podeljeni u tri

klinička fenotipa: bronhiektazije, splenomegalija i autoimunske bolesti. Za određivanje nivoa citokina u supernatantu kultivisane su mononuklearne ćelije periferne krvi od svih pacijenata i 35 zdravih kontrola, stimulisane forbol-miristil-acetatom i jonomicinom. Produkcija citokina je merena enzimskim imunoesejom.

Rezultati: CVID pacijenti su imali značajno višu frekvenciju *TNF* A alela i AA genotipa u odnosu na zdrave kontrole ($p=0,006$; OŠ=2,27; 95%IP=1,24-4,17 za alel A i $p=0,038$, OŠ=15,64; 95%IP=1,38-177,20 za AA genotip). Genska analiza *IL6* polimorfizma pokazala je da G alel nosi veći rizik za razvoj CVID ($p=0,038$, OŠ=1,78, 95%IP=1,03-3,08), a T alel u *IFNG* genu povezan je sa splenomegalijom kao kliničkom manifestacijom CVID ($p=0,032$; OŠ=2,86; 95%IP=1,08-7,56). Nije utvrđena asocijacija između distribucije alela, genotipova ili haplotipova polimorfizama u genu za IL-10 i CVID ili kliničkih komplikacija bolesti. Ispitivanjem produkcije citokina u supernatantu nakon stimulacije mononuklearnih ćelija nađena je visoko statistički značajna razlika u produkciji TNF ($p=0,0006$) i IL-6 ($p=0,0038$) kod pacijenata sa CVID u odnosu na zdrave kontrole. Korelacijom genotipova za ispitivane polimorfizme sa produkcijom odgovarajućeg citokina kod pacijenata sa CVID nije dobijena statistički značajna razlika u rezultatima.

Zaključak: Naši rezultati ukazuju na asocijaciju između CVID i -308G/A *TNF* i -174G/C *IL6* polimorfizama u genima za citokine. Osim toga, pokazali smo da je splenomegalija, jedna od najčešćih komplikacija ove bolesti, povezana sa +874T/A *IFNG* polimorfizmom. To govori u prilog da citokini imaju bitnu ulogu u patogenezi ove primarne imunodeficijencije. Međutim, da bi se potvrdio značaj ovih nalaza neophodna su dopunska istraživanja na većem brojem ispitanika.

KLJUČNE REČI: CVID, citokini, TNF, IL-10, IL-6, IFN-gama, polimorfizmi pojedinačnih nukleotida.

NAUČNA OBLAST: Medicina

UŽA NAUČNA OBLAST: Humana genetika

UDK:

Evaluation of cytokine genetic polymorphism in patients with common variable immunodeficiency

Dijana M. Perović

Abstract

Introduction: Common Variable Immunodeficiency (CVID) is a heterogeneous disease characterized by impaired B cell differentiation and maturation accompanied with the defective antibody production. It is a rare disease, with estimated prevalence 1 in 25000 to 1 in 50000, but also the most common clinically relevant primary immunodeficiency. Age of onset and course of the disease are highly variable. Recurrent bacterial infections are dominant in clinical presentation, with inflammatory, lymphoproliferative and autoimmune disorders present in almost half of the patients. Sporadic CVID has putative polygenic inheritance, but several monogenic mutations are found in small percentage of patients, mostly in familiar cases of CVID. Plethora of immunological abnormalities is described, but the cause of the disorder is still unknown. Several investigators addressed the possibility that disturbed cytokine production of TNF, IL-6, IFN-gamma and IL-10, among a variety of others, may be implicated in CVID.

Aims of the investigation: The aim of this study was to test the hypothesis that gene polymorphisms involving *TNF* (-308G/A), *IFNG* (+874T/A), *IL10* (-1082G/A, -819T/C and -592A/C), and *IL6* (-174G/C) cytokine genes might contribute to susceptibility to CVID or its clinical manifestations. In addition, we wanted to determine allele and genotype frequencies in the polymorphisms of the genes coding IL-10 and IL-6 in healthy Serbian population in order to compare them with the same data from other populations. Besides, the aim was to investigate TNF, IL-10, IL-6 and IFN-gamma cytokine production in the CVID patients related to healthy persons in control group, as well as to correlate the genotype of the patients with the cytokine production.

Patients and methods: Thirty five patients with CVID were genotyped for indicated single nucleotide polymorphisms (SNP) in *TNF*, *IL6*, *IFNG* and *IL10* using TaqMan-based assays, as well as 250 healthy controls for the SNPs in *IL6* and *IL10* which were unknown in healthy Serbian population. Hardy-Weinberg equilibrium for obtained data were tested using χ^2 test. In order to perform genotype-phenotype correlation, all

patients were divided into three groups of distinct clinical phenotypes: bronchiectasis, splenomegaly and autoimmune diseases. Cytokine levels were measured from the supernatant by Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) after cultivation and stimulation of the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from the patients and 35 healthy persons with phorbol myristate acetate and ionomycin.

Results: CVID patients had significantly higher frequency of *TNF* A allele and AA genotype than healthy subjects ($p=0,006$; $OR=2,27$; $95\%CI=1,24-4,17$ and $p=0,038$, $OR=15,64$; $95\%CI=1,38-177,20$, respectively). Genetic analysis of *IL6* SNP showed that allele G confers increased risk for CVID ($p=0,038$, $OR=1,78$, $95\%CI=1,03-3,08$) while *IFNG* allele T was associated with splenomegaly in CVID ($p=0,032$; $OR=2,86$; $95\%CI=1,08-7,56$). We observed no association between alleles, genotypes and haplotypes of *IL-10* gene and CVID or its clinical complications. TNF and IL-6 values measured in supernatant after stimulation of PBMC was significantly higher ($p=0,0006$ and $p=0,0038$, respectively) in CVID patients compared to healthy controls. There was no statistically significant difference in the genotypes distribution and production of the cytokines.

Conclusions Our results indicated association between CVID and cytokine gene polymorphisms -308G/A *TNF* and -174G/C *IL6*. In addition, we demonstrated that splenomegaly, one of the most common complications in this disease, is associated with +874T/A *IFNG* polymorphism. These findings add further support to the notion that cytokines may play significant role in pathogenesis of this primary antibody deficiency. However, further investigation that would involve a larger study group of CVID patients is warranted to confirm our findings.

KEY WORDS: CVID, cytokines, TNF, IL-10, IL-6, IFN-gamma, single nucleotide polymorphism

SCIENTIFIC FIELD: Medicine

SPECIALISED SCIENTIFIC FIELD: Human genetics

UDC:

SADRŽAJ

1	UVOD.....	1
1.1	Definicija česte varijabilne imunodeficijencije i epidemiološke odlike.....	2
1.2	Dijagnostički kriterijumi.....	3
1.3	Klinička slika CVID	5
1.3.1	Infekcije	5
1.3.2	Hronična plućna bolest.....	5
1.3.3	Autoimunske bolesti	6
1.3.4	Gastrointestinalne bolesti.....	6
1.3.5	Granulomatozne/limfoidne infiltrativne lezije.....	7
1.3.6	Maligniteti.....	8
1.4	Podela na kliničke fenotipove	8
1.5	Terapija CVID	10
1.6	Etiologija i patogeneza CVID	11
1.6.1	Imunopatogeneza	11
1.6.2	T i B-ćelijski fenotip kod CVID pacijenata	12
1.6.3	Uloga citokina u patogenezi CVID.....	13
1.6.3.1	Uloga TNF u patogenezi CVID.....	13
1.6.3.2	Uloga IL-10 u patogenezi CVID	14
1.6.3.3	Uloga IL-6 u patogenezi CVID	14
1.6.3.4	Uloga IFN-gama u patogenezi CVID.....	15
1.7	Genetska osnova CVID	15
1.7.1	Polimorfizmi pojedinačnih nukleotida i studije asocijacije	21
1.7.2	Polimorfizam gena za TNF	26
1.7.3	Polimorfizmi gena za IL-10	26
1.7.4	Polimorfizam gena za IL-6.....	26
1.7.5	Polimorfizam gena za IFN-gama	27
2	CILJEVI.....	28
3	MATERIJAL I METODE	30
3.1	Ispitanici	31
3.1.1	Kriterijumi za postavljanje dijagnoze i podela na kliničke fenotipove	31
3.2	Zdrave kontrole	32
3.3	Uzimanje uzoraka krvi od ispitanika.....	32

3.4	Metode molekularne genetike.....	33
3.4.1	Izolacija DNK	33
3.4.2	Određivanje koncentracije i čistoće izolovane DNK	34
3.4.3	Detekcija i analiza polimorfizama gena reakcijom lančanog umnožavanja (PCR) u realnom vremenu (<i>engl.</i> Real-time PCR).....	34
3.5	<i>In vitro</i> ispitivanja	36
3.5.1	Ćelijska kultura	36
3.5.2	Određivanje koncentracija citokina.....	36
3.6	Statistička analiza	37
4	REZULTATI.....	39
4.1	Kliničke karakteristike pacijenata sa COVID	40
4.2	Molekularno genetička analiza.....	41
4.2.1	Ispitivanje polimorfizma <i>TNF</i> (rs1800629) kod pacijenata sa COVID	41
4.2.2	Ispitivanje polimorfizama <i>IL10</i> (rs1800896, rs1800871 i rs1800872) kod kontrola i pacijenata sa COVID	43
4.2.3	Ispitivanje polimorfizma <i>IL6</i> (rs1800795) kod kontrola i pacijenata sa COVID ...	49
4.2.4	Ispitivanje polimorfizma <i>IFNG</i> (rs2430561) kod pacijenata sa COVID	52
4.3	Rezultati merenja koncentracija TNF, IL-10, IL-6 i IFN-gama i korelacija sa odgovarajućim genotipom.....	54
5	DISKUSIJA	61
6	ZAKLJUČCI.....	83
7	LITERATURA.....	86

1 UVOD

1.1 Definicija česte varijabilne imunodeficijencije i epidemiološke odlike

Česta varijabilna imunodeficijencija (u daljem tekstu CVID) je najčešća i klinički najvažnija primarna imunodeficijencija koju odlikuju niske koncentracije imunoglobulina uz nedovoljnu produkciju specifičnih antitela. Ovo oboljenje čini heterogena grupa imunskih poremećaja koji se prezentuju ne samo akutnim i hroničnim infekcijama, već i brojnim inflamatornim i autoimunskim poremećajima, kao i povećanom incidencijom limfoma i drugih maligniteta (Jolles, 2013).

Naziv bolesti na engleskom (Common Variable Immune Deficiency, CVID) predstavlja kovanicu stvorenu 1971. godine od strane komiteta Svetske zdravstvene organizacije u cilju odvajanja drugih dobro definisanih sindroma nedovoljne produkcije antitela, koji imaju koherentniju kliničku sliku i nasleđuju se po mendelskim pravilima (Fudenberg i sar., 1971). Skoro četiri decenije kasnije komitet eksperata za primarne imunodeficijencije Međunarodnog udruženja imunoloških društava (*engl.* International Union of Immunological Societies, IUIS) redefinisao je bolest u *Common Variable Immunodeficiency Disorders*. Time je zadržan odomaćeni akronim CVID, ali je i naglašena heterogena priroda ovih hipogamaglobulinemijskih poremećaja (International Union of Immunological Societies Expert Committee on Primary i sar., 2009).

CVID pripada grupi retkih bolesti. U isto vreme, to je najprevalentnija klinički značajna primarna imunodeficijencija, otuda termin „česta“. Prevalencija poremećaja u populaciji Evrope i Severne Amerike procenjena je na 1 na 50000 do 1 na 25000 osoba. Ređe se javlja kod ljudi negroidne rase i Azijskog porekla (Boyle i Buckley, 2007; Tseng i sar., 2015). Prema registru evropskih zemalja, CVID čini 21% svih primarnih imunodeficijencija, a čak 57% simptomatskih. Najviša prevalencija zabeležena je u zemljama Severne Evrope. (Gathmann i sar., 2012). Generalno gledano, bolest se javlja sa jednakom učestalošću kod oba pola. Međutim, ukoliko se posmatraju odvojeno određene uzrasne grupe, uočeno je da se CVID u pedijatrijskoj populaciji značajno češće javlja kod dečaka nego kod devojčica, dok u grupi pacijenata preko 30 godina preovlađuju žene (Gathmann i sar., 2014). Nasuprot drugim primarnim imunodeficijencijama, CVID se može javiti u bilo kom životnom dobu, mada se najčešće ispoljava i prepoznaje između 20. i 40. godine života. Još uvek postoji

značajno kašnjenje u postavljanju dijagnoze u odnosu na vreme pojave prvih simptoma bolesti, i ono se meri godinama, u proseku 4 do 6. Uočeno je da postoje dva pika kada se CVID najčešće dijagnostikuje, prvi je u ranom detinjstvu, do 10. godine, izraženiji kod dečaka, a drugi između 30 i 40 godina. Približno petina pacijenata je uzrasta do 20 godina (Gathmann i sar., 2014). Životni vek ovih pacijenata je skraćen; 20-godišnje preživljavanje iznosi 64% za muškarce i 67% za žene u poređenju sa 92% odnosno 94%, u opštoj populaciji (Cunningham-Rundles i Bodian, 1999; Resnick i sar., 2012).

1.2 Dijagnostički kriterijumi

Prema kriterijumima Evropskog udruženja za imunodeficiencije (*engl.* European Society for Immunodeficiencies, ESID) za postavljanje dijagnoze CVID potrebno je prisustvo: 1. značajnog smanjenja koncentracije IgG i IgA ili IgM (< 2 SD vrednosti za uzrast), 2. starost od bar dve godine života, 3. odsustvo izohemaglutinina i/ili neadekvatan porast specifičnih antitela nakon vakcinacije koja sadrži proteinski antigen, 4. uz isključivanje sekundarnih uzroka hipogamaglobulinemije (Conley i sar., 1999).

Brojnost, i donekle neodređenost ovih dijagnostičkih kriterijuma, već na početku ilustruju teškoće na koje nailazimo kada je potrebno odrediti fenotip bolesti sa visokim stepenom heterogenosti kakva je CVID. Stoga se i dalje vode polemike oko granica za koncentracije imunoglobulina koje isključuju bolest, da „neadekvatan“ porast specifičnih antitela nakon vakcinacije nije lako odrediti, da uzrast od dve godine ne isključuje prolaznu hipogamaglobulinemiju ranog detinjstva, i tako dalje. Dijagnoza se stoga još uvek postavlja *per exclusionem*. Najnovija revizija ESID kriterijuma iz 2015. godine, prikazana u tabeli 1 unapredila je definisanje pojedinih stavki, ali i proširila neophodne kriterijume. U tekstu ispod tabele navedene su bolesti i stanja koja predstavljaju diferencijalnu dijagnozu hipogamaglobulinemija, i koje je potrebno isključiti pre postavljanja dijagnoze CVID.

Tabela 1. ESID registar: Predloženi kriterijumi za kliničku dijagnozu CVID (ESID, 2015)

Neophodni kriterijumi, bar <u>jedan</u> od navedenih	Dodatni kriterijumi, prisustvo svih potrebno za dijagnozu	Predlozi za alternativnu dijagnozu (ukoliko kriterijumi nisu u potpunosti ispunjeni)
1. Povećana osetljivost na infekcije 2. Autoimunske manifestacije 3. Granulomatozna bolest 4. Neobjašnjena poliklonalna limfoproliferacija 5. Član porodice sa deficijencijom antitela	1. Značajno smanjenje koncentracije IgG i IgA sa ili bez sniženih vrednosti IgM (mereno bar dva puta, < 2SD vrednosti za uzrast) 2. Neadekvatan porast specifičnih antitela nakon vakcinacije (i/ili odsustvo izohemaglutinina) ili niske vrednosti memorijskih B-ćelija (<70% normalne vrednosti za uzrast) 3. Isključivanje sekundarnih uzroka hipogamaglobulinemije* 4. Dijagnoza potvrđena posle četvrte godine života (simptomi mogu početi ranije) 5. Odsustvo dokaza teške deficijencije T-ćelija, definisane prisustvom dva od tri navedena kriterijuma: a. broj CD4/ μ l: 2-6 god. <300; 6-12 god. <250; više od 12 god. <200 b. % naivnih CD4: 2-6 god. <25%; 6-16 god. <20%; više od 16 god. <10% c. odsustvo proliferacije T-ćelija	Za pacijente mlađe od 4 godine ili pacijente sa nepotpunim kriterijumima razmotriti „Neklasifikovane hipogamaglobulinemije“ Za pacijente sa dokazanom teškom T-ćelijskom deficijencijom razmotriti „Neklasifikovane kombinovane imunodeficijencije“

*Diferencijalna dijagnoza hipogamaglobulinemija: **a. Izazvana lekovima:** antimalarični lekovi, Kaptopril, Karbamazepin, glukokortikoidi, Fenklofenak, soli zlata, Penicilamin, Fenitoin, Sulfasalazin. **b. Genetski poremećaji:** Ataksija-telangiektazija sindrom, Autozomne forme teške kombinovane imunodeficijencije (engl. Severe Combined ImmunoDeficiency, SCID), Hiper IgM imunodeficijencija, Transkobalamin II deficijencija i hipogamaglobulinemija, X-vezana agamaglobulinemija, X-vezana limfoproliferativni poremećaj (EBV vezan), X-vezana SCID, neki metabolički poremećaji i hromozomske anomalije, Hromozom 18q sindrom, Monozomija 22, Trizomija 8, Trizomija 21. **c. Infektivne bolesti:** HIV infekcija, kongenitalna rubela, kongenitalne CMV infekcije, kongenitalna toksoplazmoza, EBV. **d Maligniteti:** Hronična limfocitna leukemija, Imunodeficijencija sa timomom, Ne-Hoćkinov limfom, B-ćelijski maligniteti, **e. Sistemski poremećaji:** imunodeficijencija uzrokovana hiperkatabolizmom imunoglobulina, Imunodeficijencija uzrokovana izraženim gubitkom imunoglobulina (nefroze, teške opekotine, limfangiektazije, teška dijareja).

1.3 Klinička slika CVID

Varijabilnost označena u nazivu bolesti odnosi se kako na vreme početka simptoma koje može biti praktično u bilo kom životnom dobu, tako i na tok bolesti i kliničke manifestacije koje je prate.

1.3.1 Infekcije

Glavna klinička odlika ovih bolesnika je sklonost ka dominantno bakterijskim infekcijama koja se javlja kod više od 90% obolelih. Među njima, infekcije gornjeg i donjeg respiratornog trakta su najučestalije. Približno polovina pacijenata je imala bar jednu epizodu pneumonije u životu, a većina ima ponavljane otitise, sinuzitise i bronhitis. Od izazivača, najčešće su inkapsulirane bakterije *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria meningitidis*, kao i *Moraxella catharralis* (Oksenhendler i sar., 2008). Prema učestalosti, za respiratornim slede bakterijske infekcije gastrointestinalnog trakta, naročito sa uzročnicima *Giardia lamblia*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Helicobacter pylori*. Kod pacijenata se sreću i teški bakterijski artritis, meningitis i sepsa (Cunningham-Rundles i Bodian, 1999; Oksenhendler i sar., 2008). Relativno često se javljaju *Herpes zoster* infekcije. Postoji i povećana sklonost enterovirusnim infekcijama, dok je infekcija mikobakterijama i gljivicama retka. Tipične oportunističke infekcije ne spadaju u klasičnu kliničku sliku CVID, već mogu uputiti na kombinovanu imunodeficijenciju sa teškim T-ćelijskim defektima (*engl.* Late Onset Combined ImmunoDeficiency, LOCID) koja prema najnovijim dijagnostičkim kriterijumima ne pripada kategoriji CVID (Malphettes i sar., 2009).

1.3.2 Hronična plućna bolest

Ponavljane infekcije i hronična inflamacija disajnih puteva i pluća prouzrokuju često funkcionalnu i/ili strukturnu hroničnu plućnu bolest, koja uključuje hronični bronhitis, bronhiektazije i plućnu fibrozu, i javlja se kod približno trećine pacijenata. I pored toga što je pokazano da je pravilna prevencija i terapija plućnih bolesti redukovala učestalost pneumonija sa preko 70% na 40% u tri različite studije od 1999. do 2011. godine (Cunningham-Rundles i Bodian, 1999; Oksenhendler i sar., 2008; Resnick i sar., 2012), oštećenje disajnih puteva se time, izgleda, ne zaustavlja.

Parenhimalne i intersticijalne promene pluća kod pacijenata sa CVID različito se prezentuju radiografski i histopatološki, a u osnovi često imaju limfocitne i/ili granulomatozne plućne infiltrate koji ukazuju na moguću agresivnu inflamatornu komponentu (Cunningham-Rundles, 2012). Stoga, tačna etiologija progresivne plućne bolesti kod pacijenata sa CVID još uvek je nejasna. Moguće je da se radi o kašnjenju u postavljanju dijagnoze i već postojećem ireverzibilnom oštećenju disajnih puteva ponavljanim infekcijama pre započinjanja specifične terapije. Postojanje perzistentne rezidualne infekcije koja nije adekvatno tretirana supstitucionom i antibiotskom terapijom takođe se navodi kao mogući uzrok, kao i aktuelne inflamatorne promene uzrokovane imunskom disregulacijom. Najverovatnije je, međutim, da se radi o kombinacija svih navedenih faktora. Ono što je bitno jeste da je progresivna plućna bolest još uvek vodeći uzrok morbiditeta i mortaliteta kod ovih bolesnika (Resnick i sar., 2012).

1.3.3 Autoimunske bolesti

U oko četvrtine pacijenata sa CVID konstatuju se različite forme autoimunske bolesti. One se manifestuju kao citopenije, Hašimoto tireoiditis, vitiligo, perniciozna anemija, sika sindrom, reumatoidni artritis, psorijaza, sistemski eritemski lupus, alopecija, primarna bilijarna ciroza, i druge (Cunningham-Rundles i Bodian, 1999; Boileau i sar., 2011). Citopenije su najčešće u ovoj grupi (približno 10% svih pacijenata sa CVID), prevashodno idiopatska trombocitopenijska purpura (ITP) i autoimunska hemolitička anemija (AIHA), odvojeno ili udruženo kao Evansov sindrom. Nije neobično da navedeni poremećaji, ili bilo koja druga autoimunska bolest, budu prva manifestacija CVID, mada se generalno mogu javiti pre, u toku, ili nakon postavljanja dijagnoze (Agarwal i Cunningham-Rundles, 2009).

1.3.4 Gastrointestinalne bolesti

Zahvaćenost gastrointestinalnog trakta je takođe česta kod pacijenata sa čestom varijabilnom imunodeficijencijom. Manifestacije se mogu svrstati u tri grupe: one koje su nastale kao posledica infekcije, one uzrokovane autoimunskim bolestima, dok u treću grupu spadaju maligniteti (Jolles, 2013). Glavni simptom zahvaćenosti GIT-a jeste prolazna ili perzistentna dijareja, koja se javlja kod 21 do 57% pacijenata (Daniels i sar.,

2007; Agarwal i Mayer, 2009). Potrebno je potvrditi i lečiti, ili isključiti, infekciju (najčešći uzročnici su navedeni u tekstu iznad). U velikom broju slučajeva je teško razgraničiti infekciju od inflamacije s obzirom da oba procesa mogu dovesti do, nekad teške, hronične dijareje koja dovodi do gubitka težine, steatoreje i malapsorpcije. Procenjeno je da se inflamatorne komplikacije probavnog sistema javljaju kod 19 do 32% pacijenata sa CVID (Agarwal i Mayer, 2009). Makroskopski i mikroskopski se uočavaju promene u vidu nodularne limfoidne hiperplazije, enteritisi slični celijakiji ili kolitisi slični inflamatornim bolestima debelog creva, ali uz diferencijalno dijagnostički značajnu histopatološku crtu odsustva plazma ćelija (Daniels i sar., 2007). Dijeta bez glutena nije dala zadovoljavajuće rezultate kod pacijenata sa enteritisom sličnim celijakiji (Cunningham-Rundles, 2010).

Bolesti jetre i patološke vrednosti testova funkcije jetre sreću se kod približno 10% pacijenata. Histološki se najčešće radi o nodularnoj regenerativnoj hiperplaziji ili granulomatoznom hepatitisu (Malamut i sar., 2008; Ward i sar., 2008). Bolesti jetre, kao i inflamatorne bolesti creva, prisutne u kliničkoj slici CVID, nose lošiju prognozu kada je reč o preživljavanju ovih pacijenata (Resnick i sar., 2012).

1.3.5 Granulomatozne/limfoidne infiltrativne lezije

Značajna komplikacija bolesnika sa CVID je i pojava granulomskih formacija u različitim organima, najčešće u plućima, limfnim čvorovima i slezini, mada se mogu javiti i u koži, jetri, crevima i nekim drugim organima. Približno 10 do 20% pacijenata razvija ovakav tip lezija koje histološki podsećaju na sarkoidozu (Ardeniz i Cunningham-Rundles, 2009; Park i Levinson, 2010). S obzirom na to da su pluća najčešće zahvaćen organ, stvoren je i termin granulomatozna limfocitna intersticijalna bolest pluća (*engl.* Granulomatous-Lymphocytic Interstitial Lung Disease, GLILD) koja se razvija kod pacijenata sa CVID. Termin objedinjuje granulomatozne i limfoproliferativne histološke crte koje uključuju limfocitnu intersticijalnu pneumoniju (LIP), folikularni bronhiolitis, i limfoidnu hiperplaziju (Park i Levinson, 2010). Etiologija ovih promena nije razjašnjena; pronađena veza između humanog herpes virusa 8 i razvoja granulomatoznih lezija u jednoj studiji (Wheat i sar., 2005) kasnije nije potvrđena. U svakom slučaju, prisustvo GLILD ili granulomatozne bolesti u jetri

značajno smanjuje preživljavanje pacijenata sa CVID (Bates i sar., 2004; Resnick i sar., 2012).

Benigna limfoproliferacija je otkrivena kod 40 do 50% bolesnika sa CVID, najčešće u vidu splenomegalije, dok približno 10 do 20% ima lokalizovanu ili difuznu limfadenopatiju (Chapel i sar., 2008). Uočeno je, takođe, da osobe koje imaju granulomatoznu bolest češće ispoljavaju i autoimunske bolesti. Zašto se to događa, nije još uvek objašnjeno, ali može ukazati na zajedničku etiopatogenezu oba fenomena (Cunningham-Rundles, 2012).

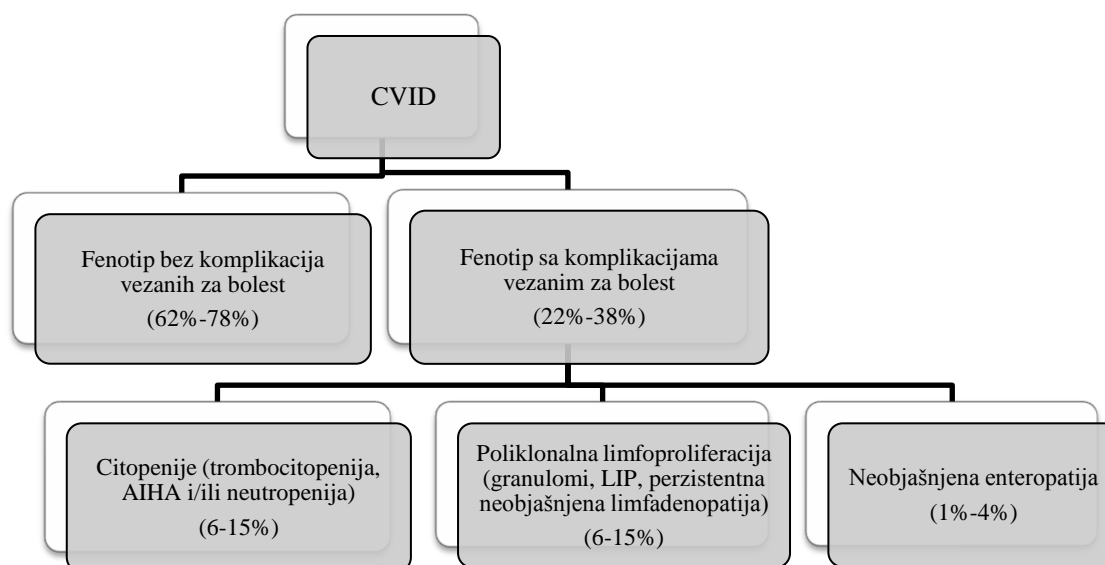
1.3.6 Maligniteti

Povećana sklonost ka razvoju maligniteta, koja se javlja kod bolesnika sa CVID, takođe je bitna odlika ovog poremećaja, kako zbog učestalosti (do 15%), tako i zbog značajnog udela u mortalitetu (Resnick i sar., 2012). Većina studija je pokazala da su limfomi i karcinom želuca najčešći u ovoj grupi (Cunningham-Rundles i Bodian, 1999; Mellekjaer i sar., 2002; Chapel i sar., 2008). Međutim, skorašnje studije ukazuju na smanjenje učestalosti karcinoma želuca; verovatno zbog povećane upotrebe antibiotika koji eradiciraju *H. pylori*, bakteriju koja ima potencijalnu ulogu u razvoju karcinoma želuca. Karcinom dojke se sada smatra najznačajnijim ne-limfoidnim malignitetom kod pacijenata sa CVID, mada su maligniteti gastrointestinalnog trakta i dalje među najučestalijim (Cunningham-Rundles, 2010; Resnick i sar., 2012). Limfomi se javljaju kod približno 10% pacijenata sa CVID. Većina limfoma su B-ćelijski, ne-Hoćkinovi, i obično ektranodalni (Cunningham-Rundles i Bodian, 1999). Uz ostale malignitete, nakon hronične plućne bolesti, limfomi predstavljaju drugi najznačajniji uzrok smrti pacijenata sa CVID (Resnick i sar., 2012).

1.4 Podela na kliničke fenotipove

Velika heterogenost u kliničkoj prezentaciji nametnula je potrebu za jasnom i pravilnom kliničkom fenotipizacijom CVID. Glavni razlog leži u nastojanju da se, u odsustvu definisane genetske dijagnoze za ovu grupu poremećaja, bolje predvide tok i komplikacije bolesti, čime bi se poboljšalo lečenje pacijenata. Osim toga, jasna podela na dobro definisane fenotipove omogućava stvaranje što homogenije grupe za genetska, imunopatogenetska i druge vrste istraživanja, kao i poređenje rezultata između različitih

studija (Jolles, 2013). Analizom velikih kohorti CVID pacijenata iz više Evropskih zemalja 2008. godine je napravljena podela u pet različitih fenotipova, pri čemu je više od 80% pacijenata pripadalo samo jednom podtipu. Podtipovi su bili: 1. bez komplikacija vezanih za bolest (samo infekcije), 2. autoimunitet (citopenije i organ-specifične autoimunske bolesti), 3. poliklonalna limfoproliferacija (uključujući hepatomegaliju, limfocitnu intersticijalnu pneumoniju, perzistentnu neobjašnjenu limfadenopatiju i neinfektivne granulome), 4. enteropatija (koja ne uključuje infektivne, autoimunske i gluten-senzitivne enteropatije), i 5. limfoidni malignitet (Chapel i sar., 2008). Nekoliko godina kasnije, usledila je revizija datih kriterijuma, uz uključivanje pacijenata iz velike kohorte obolelih iz SAD kao i pacijenata iz francuske DEFI grupe, i sažimanje u četiri podtipa koji proizilaze iz dva osnovna. Novi kriterijumi su prikazani u dijagramu 1 zajedno sa procentima u kojima je svaki od pojedinih fenotipova bio prisutan kod 848 bolesnika sa CVID iz te tri velike kohorte (Chapel i sar., 2012).



Dijagram 1. Klinički fenotipovi CVID.

AIHA: autoimunska hemolitička anemija, LIP: limfocitna intersticijalna pneumonija.

U odnosu na originalnu podelu, u novoj unapređenoj verziji, autoimunske bolesti kao komplikacija su podeljene na citopenije i organ-specifične autoimunske bolesti, pri čemu je uočeno da jedino citopenije nose rizik za smanjeno preživljavanje stoga su

organ-specifične autoimunske bolesti izostavljene. Osim toga, hepatomegalija više nije svrstana u fenotip sa poliklonalnom limfoproliferacijom jer nije potvrđena veza hepatomegalije sa granulomima i/ili LIP. Limfoidni maligniteti su takođe izostavljeni iz posebne fenotipske kategorije jer se smatra da oni ne moraju biti primarni događaj kod bolesnika sa CVID (Chapel i sar., 2012). Primenom novih, unapređenih, kriterijuma uklapanje bolesnika u samo jedan fenotip povećalo se na 89% do 94%. Autori naglašavaju da, s obzirom na jasne razlike u prognozi bolesnika sa određenim fenotipom, oni očigledno moraju imati i različitu biološku osnovu. Naime, prisustvo jedne ili više neinfektivnih komplikacija tokom dugotrajnog praćenja vezano je sa skoro 11 puta višom stopom mortaliteta (Chapel i sar., 2008; Resnick i sar., 2012). Potrebno je dodati da se određeni klinički entiteti, poput limfoma, hepatomegalije, bronhiektazija i splenomegalije i dalje uključuju u najčešće klinički potvrđene komplikacije CVID, i koriste se kao klinički biomarkeri (Jolles, 2013).

1.5 Terapija CVID

Osnovu lečenja pacijenata sa CVID čini nadoknada antitela u vidu intravenske ili subkutane primene preparata imunoglobulina, najčešće u dozi od 400 do 600 mg/kg, jednom mesečno. Tačna doza, način i interval primene prilagođavaju se specifičnim potrebama pacijenta (Cunningham-Rundles, 2010). Supstitucija imunoglobulina u značajnoj meri redukuje učestalost infekcija, smanjuje upotrebu antibiotika i potrebu za hospitalizacijom, a efekti su bolji prilikom primene većih doza kojima se postiže viši nivo IgG u serumu (Gathmann i sar., 2014).

Lečenje komplikacija, uključujući infekcije, hroničnu plućnu bolest, enteropatiju, autoimunske bolesti, granulomatozne lezije i malignitet, imaju određene specifičnosti, ali se u osnovi ne razlikuju bitno od terapije istih stanja kod imunokompetentnih pacijenata (Bonilla i sar., 2016).

Do nedavno, transplantacija koštane srži ili druge vrste terapije hematopoetskim matičnim ćelijama (*engl.* Haematopoetic Stem Cell Therapy, HSCT) nisu smatrane značajnom metodom lečenja pacijenata sa CVID. Međutim, skorašnja istraživanja su pokazala mogućnost značajnog poboljšanja ili izlečenja nakon ovih procedura, ali je mortalitet vezan za HSCT kod CVID pacijenata još uvek veliki, stoga je preporuka da

se ona razmatra u slučaju hematoloških maligniteta ili drugih komplikacija refrakternih na standardnu terapiju (Rizzi i sar., 2011; Wehr i sar., 2015).

1.6 Etiologija i patogeneza CVID

CVID je kao bolest prepoznata još u pedesetim godinama prošlog veka. Međutim, i pored dramatičnog napretka u razjašnjavanju molekularne osnove brojnih drugih primarnih imunodeficijencija koji se odigrao poslednjih decenija, patofiziologija ove bolesti ostala je nedovoljno razjašnjena. Sa izuzetkom nekoliko poznatih monogenetskih formi, (videti poglavlje Genetska osnova CVID), etiologija imunskog poremećaja kod približno 98% pacijenata je nepoznata (Bonilla i sar., 2016).

1.6.1 Imunopatogeneza

Klinička heterogenost CVID ukazuje na to da multipli imunoregulatorni defekti mogu rezultovati zajedničkim krajnjim ishodom koji čini neadekvatna produkcija specifičnih antitela. S obzirom na to da je hipogamaglobulinemija glavna manifestacija, a da 90% pacijenata ima normalan broj B-limfocita u perifernoj krvi, pretpostavljeno je da je primarni poremećaj u kasnijim fazama razvoja B-ćelijske linije (Ahn i Cunningham-Rundles, 2009; Vale i Schroeder, 2010). Shodno tome, veliki broj pacijenata ima nizak procenat memorijskih B-ćelija koje su promenile klasu sekretovanih imunoglobulina (IgD⁻/IgM⁺/CD27⁺), što vodi istovremenoj deplekciji dugoživećih plazma ćelija i padu koncentracije imunoglobulina u serumu (Brouet i sar., 2000; Taubenheim i sar., 2005). Međutim, zapažanje da B-ćelije kod nekih CVID pacijenata mogu da produkuju imunoglobuline ukoliko se adekvatno stimulišu *in vitro*, ukazalo je na moguću i bitnu ulogu spoljašnjih B-ćelijskih faktora u patogenezi imunodeficijencije. U tom kontekstu, opisani su i brojni poremećaji T-ćelija kod pacijenata sa CVID (Giovannetti i sar., 2008; Yazdani i sar., 2014), uključujući poremećaj u produkciji citokina, o čemu će biti više govora u daljem tekstu.

Poremećaji urođenog imunskog sistema, poput izmenjene funkcije antigen prezentujućih, dendritskih ćelija (Bayry i sar., 2004; Yong i sar., 2008), kao i NK ćelija (Aspalter i sar., 2000) zatim različiti poremećaji u signalizaciji kao što su defekti *Toll-like* receptora (Sharifi i sar., 2016), takođe su nađeni kod CVID pacijenata.

1.6.2 T i B-ćelijski fenotip kod CVID pacijenata

U obilju otkrivenih imunoloških abnormalnosti, imunofenotipizacija je postala neophodna analiza kod CVID pacijenata radi definisanja membranskih markera limfocita koji bi omogućili ranu dijagnozu, adekvatnu terapiju i bolju prognozu.

Ukupan broj B limfocita u ovoj grupi bolesnika je najčešće normalan, ili je u nižim vrednostima normalnog ranga. Fenotipska analiza perifernih B-ćelijskih podgrupa je otkrila smanjenje $IgM/IgD^-/CD27^+$ memorijskih B-ćelija kod većine (ali ne svih) CVID pacijenata i omogućila bazu za "Frajburg" i "Pariz" klasifikaciju (Warnatz i sar., 2002; Piqueras i sar., 2003). Frajburška klasifikacija je uključila CD21 antigen kao dodatni marker za identifikaciju pacijenata sa naglašenom ekspanzijom nezrelih B-ćelija koje slabo ekspimiraju CD21 i označene su kao $CD21^{low}$. U 2008. je napravljen konsenzus te dve klasifikacione šeme u Euroklas klasifikaciju. Njeni rezultati su potvrdili da je značajno smanjenje memorijskih B-ćelija kod pacijenata sa CVID povezano sa povećanim rizikom za nastanak splenomegalije i granulomatozne bolesti. Ekspanzija $CD21^{low}$ B-ćelija je korelisala sa splenomegalijom, dok je limfadenopatija povezana sa povećanjem broja tranzicionih B-ćelija ($IgM^{++}/IgD^{++}/CD38^{++}$) (Wehr i sar., 2008).

Poremećaji T-limfocita, poput smanjenja ukupnog broja $CD4^+$ T-limfocita, kao i naivnih $CD45RA^+/CD4^+$ T-limfocita, uočeni su kod velikog broja bolesnika sa CVID. Đovaneti sa saradnicima je predložio T-ćelijsku klasifikaciju pacijenata sa CVID u tri grupe prema broju $CD4^+$ naivnih T-limfocita. Pacijenti sa veoma niskim brojem naivnih $CD45RA^+/CD4^+$ T-ćelija, uz porast memorijskog pula $CD45RO^+/CD4^+$ T-limfocita imali su splenomegaliju i tešku formu imunodeficijencije. Za razliku od $CD4^+$ T-limfocita, broj $CD8^+$ T-limfocita kod pacijenata sa CVID je često značajno povećan, i to posebno u relativnom broju, stoga je donekle tipično za ovu bolest da je $CD4^+/CD8^+$ odnos obrnut. Smanjen broj naivnih $CD8^+$ T-limfocita kao i povećan apsolutan broj aktivisanih, i memorijskih $CD8^+$ T-limfocita takođe su zapaženi (Giovannetti i sar., 2007).

1.6.3 Uloga citokina u patogenezi CVID

Citokini predstavljaju grupu modulatornih proteina ili glikoproteina koji se vezuju za svoje receptore kao odgovor na različite stimulse, što rezultuje aktivacijom sekundarnih glasnika i daljim prenosom signala unutar ćelije. Regulacija citokinske mreže je precizna, i zavisi od sredinskih i genetskih faktora, stoga postoje individualne varijacije u njihovoj sintezi, kako bazalnoj, tako i stimulisanjoj (Smith i Humphries, 2009). Citokini imaju važnu ulogu u sintezi antitela, zato je njihova uloga u patogenezi ove, dominantno humoralne, imunodeficijencije opsežno razmatrana u više studija. Rezultati su često kontradiktorni što pored metodoloških razlika može da reflektuje poznatu heterogenost samog poremećaja, ali može biti i odraz sekundarnih događaja u specifičnim CVID podgrupama, jer je teško razlučiti primarne od sekundarnih imunoloških poremećaja kod ovih pacijenata. U svakom slučaju, brojni su dokazi da citokini, kao što su faktor nekroze tumora (*engl.* Tumor Necrosis Factor, TNF), interleukin (IL)-10, IL-6 i interferon (IFN)-gama, između ostalih, mogu imati bitnu ulogu u patogenezi CVID (Varzaneh i sar., 2014).

1.6.3.1 Uloga TNF u patogenezi CVID

TNF je moćan inflamatorni medijator koji proizvode brojne ćelije. Generalna ekspresija TNF receptora na različitim ćelijama ukazuje da je TNF uključen u veliki broj bioloških aktivnosti. Pored proinflamatorne uloge, TNF ima druge funkcije, poput stimulacije proliferacije T-ćelija *in vitro*, prevencije apoptoze T-ćelija indukovane superantigenima, i od izuzetnog je značaja za formiranje germinativnih centara u limfnom čvoru (Bazzaz i sar., 2014).

Većina studija koja je istraživala produkciju TNF citokina kod pacijenata sa CVID pokazala je povišene vrednosti, (Aukrust i sar., 1996) bez ili nakon *in vitro* stimulacije (Isgro i sar., 2005; Trujillo i sar., 2011), što je ukazalo na prisustvo inflamacije kod ovih pacijenata. Osim toga, uloga TNF u stvaranju granuloma je dobro dokumentovana (Roach i sar., 2002) a neki autori su pokazali korist od primene anti-TNF lekova (infiximab) u lečenju određenih kliničkih manifestacija CVID poput enteropatije i granulomatoznih lezija, posebno na koži (Chua i sar., 2007; Franxman i sar., 2014).

1.6.3.2 Uloga IL-10 u patogenezi CVID

Za razliku od TNF, IL-10 je antiinflamatorni citokin koji sekretuju različite ćelije, posebno T-ćelije i monociti. On inhibira proinflamatorne citokine poput IFN-gama, IL-3, TNF. Pored toga, reguliše diferencijaciju B-ćelija, T-ćelija, i NK ćelija, a učestvuje i u diferencijaciji plazma ćelija. Važnu ulogu ima i u kontroli inflamacije od strane regulatornih T-ćelija (Treg) koje se dovode u vezu sa razvojem različitih autoimunskih poremećaja (Varzaneh i sar., 2014). U skladu s tim neke studije su pokazale snižen broj Treg kod CVID pacijenata, posebno onih sa splenomegalijom i povišenim inflamatornim markerima (Holm i sar., 2003; Fevang i sar., 2007). Kada je reč o produkciji ovog citokina kod pacijenata sa CVID rezultati su heterogeniji nego za TNF i objavljeni su radovi koji podržavaju sniženu produkciju od strane T-ćelija *in vitro* (Holm i sar., 2003), normalnu (Oliva i sar., 1997), ili povišenu produkciju od strane monocita (Zhou i sar., 1998; Kasztalska i sar., 2011).

1.6.3.3 Uloga IL-6 u patogenezi CVID

IL-6 proizvode različite ćelije uključujući antigen prezentujuće ćelije i pomoćničke T-ćelije (*engl.* T helper, Th) tj. Th2 ćelije. Ovaj citokin je moćan stimulator diferencijacije B-ćelija, produkcije antitela i preživljavanja plazma ćelija (Jourdan i sar., 2014). Imunomodulatornu funkciju ispoljava i kao glavni faktor diferencijacije Th17 ćelija, čija se uloga u poslednje vreme naglašava u patogenezi CVID (Yazdani i sar., 2014). Prekomerno stvaranje IL-6 u ranoj fazi bolesti može čak imati pozitivne efekte, ali takvo prolongirano stanje može doprineti razvoju različitih inflamatornih i autoimunskih bolesti. Smatra se da poremećena regulacija stvaranja ovog citokina prevazilazi imunološku toleranciju tako što menja ravnotežu između regulatornih T ćelija (T_{reg}) i Th17 ćelija (Kimura i Kishimoto, 2010).

Većina studija koje su ispitivale produkciju IL-6 kod pacijenata sa CVID prijavila je povišene nivoe u odnosu na zdrave kontrole (Pandolfi i sar., 1993; Pons i sar., 2006) mada neki autori nisu našli bitne razlike (Trujillo i sar., 2011), dok su drugi nakon stimulacije mitogenima izmerili smanjenu produkciju IL-6 (Hong i sar., 2010).

1.6.3.4 Uloga IFN-gama u patogenezi CVID

IFN-gama je plejotropni citokin koji proizvode efektorske T i NK ćelije. Neke od najvažnijih funkcija ovog citokina su aktivacija makrofaga, privlačenje leukocita, maturacija i diferencijacija NK ćelija, kao i promena klase imunoglobulina. (Schroder i sar., 2004). IFN-gama je ispitan u brojnim studijama sa CVID pacijentima, i rezultati dosta variraju, od normalne produkcije (Inoue i sar., 1994), preko toga da je nađena smanjena ekspresija IFN-gama iRNK, sa i bez *in vitro* stimulacije antigenima (Hauber i sar., 1993), do registrovanih povišenih vrednosti ovog citokina u grupi pacijenata sa smanjenim brojem CD4⁺ T-ćelija (Giovannetti i sar., 2007).

1.7 Genetska osnova CVID

Genetska osnova poremećaja odavno je uočena, a porodično javljanje zabeleženo je kod 10 do 20 % pacijenata. U porodicama sa više obolelih članova nasleđivanje odgovara autozomno-dominantnom tipu, ređe autozomno-recesivnom. Primećeno je i da se CVID i IgA selektivna deficijencija (IgAD), znatno češća ali klinički obično neispoljena ili neprepoznata primarna imunodeficijencija, mogu javiti unutar iste porodice (Vorechovsky i sar., 1995). Devedesetih godina prošlog veka nađena je asocijacija u ispoljavanju CVID fenotipa sa određenim haplotipom humanog leukocitnog antigena (*engl.* Human Leucocyte Antigen, HLA) DR3 i B8 (Olerup i sar., 1992; Volanakis i sar., 1992). I pored brojnih genetskih studija koje su usledile, relativno je kratka lista otkrivenih monogenetskih poremećaja koji se manifestuju kao CVID fenotip, i oni su ukratko sumirani u tabeli 2.

Među navedenim poremećajima, prva je opisana **ICOS deficijencija** (*engl.* Inducible T-cell Co-stimulator, ICOS), nastala usled homozigotne delecije egzona 2 i 3 u *ICOS* genu. ICOS pripada grupi T-ćelijskih receptora koji vezuje ICOS ligand, eksprimiran na B-limfocitima. Mutacija je prvobitno opisana kod četiri CVID pacijenta iz dve porodice (Grimbacher i sar., 2003) nakon čega je usledilo objavljivanje novih slučajeva i razjašnjavanje uloge ICOS kostimulatora, koji je eksprimiran isključivo na aktiviranim T-limfocitima, u patogenezi CVID. Utvrđeno je da ICOS ima ključnu ulogu u formiranju germinativnih centara u limfnom čvoru, promeni klase imunoglobulina i razvoju memorijskih B-ćelija (Warnatz i sar., 2006). Za poremećaj koji je do tada

smatrano da ima poligenSKU osnovu, po prvi put je pokazano da monogenska mutacija može dovesti do čitavog spektra manifestacija koje se viđaju i kod odraslih i kod dece sa CVID, uključujući pored rekurentnih infekcija i autoimunske, inflamatorne i maligne komplikacije. Yong i saradnici su napravili animalni model ICOS deficijencije na miševima, međutim, imunološki poremećaji registrovani kod takvih miševa nisu u potpunosti oslikavali humani model bolesti, što je još jednom dokazalo da se regulacija humanog imunskog odgovora značajno razlikuje od mišjih modela. Ipak, ovo otkriće je pokazalo da CVID zapravo može imati genetsku osnovu u poremećaju T limfocita i da ne mora biti prevashodno B-ćelijski poremećaj kao što je do tada smatrano. Značajno je i otkriće da je ICOS potentan stimulator lučenja IL-10, citokina za koji se zna da, između brojnih drugih funkcija, ima ulogu i u proliferaciji i diferencijaciji B-ćelija u plazma ćelije (Yong i sar., 2009).

Nekoliko godina po objavljivanju ICOS deficijencije otkrivena je homozigotna mutacija u **CD19** molekulu kod četiri pacijenta sa kliničkim i imunološkim fenotipom kompatibilnim sa CVID. Kod jednog pacijenta je nađena homozigotna insercija a kod ostala tri homozigotna delecija u genu za CD19, pri čemu su obe uvođile prevremeni STOP kodon usled čega se stvarao nefunkcionalni protein (van Zelm i sar., 2006). Poznato je da CD19 funkcioniše kao deo kompleksa sa CD21, CD81 i CD225 u signalizaciji B-ćelijskog receptora nakon prepoznavanja antigena. Još jedna složena heterozigotna mutacija u *CD19* je opisana kod dečaka iz Japana sa kliničkom slikom CVID, pri čemu je majka bila nosioc mutacije u intronu 5 koja je menjala mesto isecanja introna, a otac je imao veliku deleciju koja je obuhvatila *CD19* i još neke okolne gene (Kanegane i sar., 2007). U svakom slučaju pacijenti sa defektom CD19 se mogu prepoznati imunofenotipizacijom jer je CD19 molekul odsutan ili jako snižen. Međutim, da odsustvo ekspresije CD19 na B-ćelijama ne mora nužno da znači mutaciju njegovog gena pokazano je nedavno u studiji van Zelm i sar. u kojoj je opisan pacijent sa nefropatijom, teškom hipogamaglobulinemijom sa smanjenim brojem memorijskih B-ćelija, neadekvatnim stvaranjem specifičnih antitela i odsustvom ekspresije CD19. Pacijent je imao normalne *CD19* alele ali je kod njega detektovana homozigotna mutacija u **CD81** genu koja je dovela do potpunog odsustva CD81 ekspresije na leukocitima. Daljim *in vitro* istraživanjem na B-ćelijama pacijenta otkriveno je da ekspresija CD19 na membrani zavisi u velikoj meri od CD81 molekula, i da CD81

deficijencija takođe dovodi do poremećene aktivacije B-ćelija nakon stimulacije receptora za antigen (van Zelm i sar., 2010). Isto tako, opisana je i mutacija u *CR2* genu koji kodira **CD21**, receptor za C3d-opsonizovane imunske komplekse koji pojačava antigen-specifičan imunski odgovor, kod pacijenta sa fenotipom sličnim CVID (Thiel i sar., 2012).

Jedna od najskorije opisanih monogenских formi bolesti sa CVID fenotipom jeste haploinsuficijencija citotoksičnog T limfocit antigena-4 (**CTLA-4**) koja se, za razliku od prethodno pomenutih, nasleđuje autozomno dominantno. CTLA-4 je inhibitorni receptor koji se nalazi na imunskim ćelijama koji, između ostalog, ima važnu ulogu u imunskoj toleranciji i funkciji T regulatornih limfocita. Gen koji kodira ovaj protein nalazi se u blizini gena za ICOS i CD28, unutar regiona od 300 kb (Ling i sar., 2001). Posledice mutacija u *CTLA4* genu kod ljudi nisu u potpunosti poznate ali se zna da kod miševa CTLA-4 deficijencija dovodi do letalnog autoimunskog fenotipa (Waterhouse i sar., 1995). U jednoj studiji u SAD, heterozigotna mutacija u *CTLA4* nađena je kod devet osoba iz četiri posebne porodice, od kojih je šest imalo jasne kliničke i laboratorijske znake teške imunske disregulacije sa CVID karakteristikama. U kliničkoj slici su osim ponavljanih infekcija dominirali limfocitni infiltrati i česte autoimunske komplikacije (Kuehn i sar., 2014). Iste godine u drugoj studiji sprovedenoj u Nemačkoj pronađene su *CTLA4* mutacije kod još 19 osoba od kojih je 12 imalo istu kliničku sliku kao i pacijenti iz SAD. Osim alelske heterogenosti dokumentovane u obe studije (identifikovano je više mutacija po tipu “nonsense”, “missense”, “frame shift” i dr.) ukazano je i na nepotpunu penetrantnost mutacija ili ulogu drugih dodatnih faktora koji modifikuju bolest, uključujući genetske, epigenetske ili sredinske faktore. Međutim, bitno je naglasiti i da su neki od dokazanih nosioca mutacija deca ili mlade osobe i da nije isključeno da će se klinička slika slična CVID ispoljiti kasnije u životu, s obzirom da je i kod njih pokazana smanjena ekspresija *CTLA4* (Schubert i sar., 2014).

Osim opisanih mutacija koje se odnose na receptore eksprimirane na površini ćelija, nedavno su pronađeni i genetički defekti koji zahvataju proteine u citoplazmi, a povezani su sa ispoljavanjem CVID i/ili nekih autoimunskih bolesti. Tako je opisana homozigotna mutacija u genu za protein C kinazu δ (**PRKCD**) kod pacijenta koji je potomak iz braka sa konsangvinitetom a ima CVID fenotip sa naglašenom

autoimunskom komponentom (Salzer i sar., 2013). Mutacije u genu koji kodira **LRBA** protein (*engl.* Lipopolysaccharide Responsive Beige-like Anchor protein) takođe su opisane kod CVID i/ili autoimunskih bolesti u preko 50 slučajeva do danas (Lopez-Herrera i sar., 2012; Lo i sar., 2015; Gamez-Diaz i sar., 2016). Većina pacijenata sa LRBA deficijencijom je imala prethodno dijagnostikovan CVID, ali je ova deficijencija opisana i kod pacijenata koji nemaju hipogamaglobulinemiju već fenotip poput ALPS (autoimunski limfoproliferativni sindrom) ili X vezane imunske disregulacije sa poliendokrinopatijom i enteropatijom. Zajedničko je, međutim, da svi pacijenti imaju rani početak teških autoimunskih bolesti i izražen limfoproliferativni sindrom, uz progresivan tok i visok mortalitet (Alkhairy i sar., 2016).

Sekvenciranjem celokupnog egzoma (*engl.* Whole Exome Sequencing, WES) članova porodica u kojima je fenotip poput CVID registrovan kod više članova, nađene su heterozigotne mutacije u **NFKB2** genu (Chen i sar., 2013; Liu i sar., 2014). NF- κ B2 je transkripcioni faktor koji ima bitnu ulogu u razvoju, proliferaciji i maturaciji T- i B-ćelija. Osobnosti fenotipa kod pacijenata sa ovom mutacijom bile su rani početak bolesti i prisustvo centralne adrenalne insuficijencije. Nedavno su opisane heterozigotne mutacije i u genu koji kodira **NF- κ B1** kod više članova sa CVID fenotipom ili hipogamaglobulinemijom, u tri različite porodice iz geografski udaljenih regiona. Zanimljivo je pomenuti da su autori prvobitno analizom vezanosti (*engl.* linkage analysis) našli vezanost 4q regiona, koji sadrži **NFKB1** gen, sa ispoljavanjem CVID poremećaja (Finck i sar., 2006), ali tada nisu klasičnim Sengerovim sekvenciranjem našli mutacije u genima kandidatima među kojima je bio i **NFKB1** gen. Međutim, u novijoj studiji sekvenciranjem celog genoma i tehnikom ciljanog sekvenciranja sledeće generacije (*engl.* Next Generation Sequencing, NGS) detektovali su uzročne mutacije po tipu haploinsuficijencije subjedinice p50 NF- κ B1 (Fliegau i sar., 2015).

Opisane su i mutacije u drugim genima koji kodiraju intraćelijske signalne molekule, poput PI3K (fosfatidil-inozitol-3-kinaza), koji ima bitnu ulogu u kompleksnoj signalnoj mreži koja nastaje aktivacijom B- i T-ćelijskih površinskih receptora (Elgizouli i sar., 2016). Heterozigotne mutacije u **PIK3CD** genu koji kodira ovaj molekul identifikovane su primenom WES kod više od 50 pacijenata sa CVID fenotipom, a pokazano je da se radi o mutacijama koje dovode do prekomerne aktivacije

signalnog puta u kojem učestvuje PI3K (*engl. gain-of-function*) (Angulo i sar., 2013; Lucas i sar., 2014). **IKAROS** je još jedan intraćelijski molekul, plejotropni regulator hematopoeze bitan za stvaranje i funkciju B-limfocita, za koji je pokazano da ima ulogu u patogenezi CVID poremećaja. Heterozigotne mutacije u *IKZF1*, genu koji kodira ovaj transkripcioni faktor su nedavno opisane kod 29 pacijenata sa CVID iz 6 odvojenih porodica. Mutacije su bile po tipu zamene aminokiseline ili unutargenskih delecija, a sve su se nalazile u regionu gena koji kodira deo proteina koji se vezuje za DNK, čime je onemogućena funkcija regulatora transkripcije. Svi pacijenti sa IKAROS haploinsuficijencijom su se odlikovali naglašeno niskim brojem B-limfocita u perifernoj krvi (Kuehn i sar., 2016).

Sve opisane mutacije, uključujući i druge, samo ukratko navedene u tabeli 2, u velikoj meri su unapredile poznavanje biologije B-ćelija ali nisu u toj meri razjasnile etiologiju i patogenezu CVID poremećaja. Kumulativno, one se detektuju kod približno 2% do 10% slučajeva (Bogaert i sar., 2016; Bonilla i sar., 2016), a prema poslednjoj IUIS klasifikaciji primarnih imunodeficijencija ti monogeniski uzrokovani poremećaji svrstani su u odvojene imunodeficijencije, nezavisne od CVID (Picard i sar., 2015). Stoga, genetska osnova CVID je u najvećem broju slučajeva nerazjašnjena, najverovatnije poligenska ili multifaktorska (Schaffer i sar., 2007). Ta pretpostavka je bazirana na nekoliko činjenica: 1. patogene mutacije su identifikovane kod jako malog broja pacijenata sa CVID i pored uloženog velikog truda na tom polju, 2. postoji velika fenotipska varijabilnost između pacijenata sa istim primarnim genotipom, 3. prisustvo varijanti kod asimptomatskih rođaka i/ili u opštoj populaciji iznad određenog praga učestalosti, 4. sporadično javljanje bolesti kod približno 90% pacijenata, i 5. odložen početak simptoma kod velikog broja obolelih (Bogaert i sar., 2016).

Kao i kod drugih pretpostavljenih poligenskih bolesti, u istraživanju genetske osnove CVID poslednjih nekoliko decenija aktuelne su asocijativne studije i analiza polimorfizama gena, o čemu će biti reči u daljem tekstu.

Tabela 2. Monogenske imunodeficijencije sa fenotipom poput CVID, modifikovano prema ref. (Bonilla i sar., 2016)

Gen	Klinički fenotip	Referenca
<i>CD19</i>	Ponavljane RI	(van Zelm i sar., 2006; Kanegane i sar., 2007)
<i>CD20</i>	Ponavljane RI	(Kuijpers i sar., 2010)
<i>CD21</i>	Ponavljane RI, dijareja	(Thiel i sar., 2012)
<i>CD27</i>	EBV-udružena limfoproliferativna bolest, limfomi, mogući ponavljani sinuzitisi	(van Montfrans i sar., 2012; Salzer i sar., 2013)
<i>CD81</i>	Ponavljane RI, Henoch-Schonlein purpura, glomerulonefritis, ITP	(van Zelm i sar., 2010)
<i>CTLA4*</i>	RI, dijareja, limfoidne infiltracije organa, AI bolesti	(Kuehn i sar., 2014; Schubert i sar., 2014)
<i>ICOS</i>	Ponavljane RI i GIT infekcije, retko AI bolesti	(Grimbacher i sar., 2003; Takahashi i sar., 2009)
<i>IL21</i>	Ponavljane RI, kriptosporidium, druge teške virusne i bakterijske infekcije	(Kotlarz i sar., 2013; Kotlarz i sar., 2014)
<i>IL21R</i>	Ponavljane RI, IBD	(Kotlarz i sar., 2014; Salzer i sar., 2014)
<i>LRBA</i>	Ponavljane RI, enteropatija, ITP, AIHA	(Alangari i sar., 2012; Lopez-Herrera i sar., 2012)
<i>NFKB2*</i>	Ponavljane RI, meningokokni meningitis, adrenalna insuficijencija, ITP	(Chen i sar., 2013; Liu i sar., 2014)
<i>PIK3CD*</i>	Ponavljane RI, bronhiektazije, teške herpes virus infekcije, limfomi	(Angulo i sar., 2013; Lucas i sar., 2014; Elgizouli i sar., 2016)
<i>RAC2</i>	Ponavljane RI, post-strep. GN, AI tireoiditis	(Alkhairy i sar., 2015)
<i>TWEAK*</i>	Ponavljane RI, pneumokokni meningitis, bradavice	(Wang i sar., 2013)
<i>IKAROS*</i>	Ponavljane infekcije, ITP, ALL B-ćelija	(Kuehn i sar., 2016)

*nasleđuju se autozomno dominantno, za razliku od ostalih mutacija koje su autozomno recesivne

RI, respiratorne infekcije; EBV, Epstein Barr virus; ITP, idiopatska trombocitopenijska purpura; AI, autoimunske; GIT, gastrointestinalni trakt; IBD, inflamatorna bolest creva; AIHA, autoimunska hemolitička anemija; post-strep. GN, poststreptokokni glomerulonefritis, ALL, akutna limfoblastna leukemija

1.7.1 Polimorfizmi pojedinačnih nukleotida i studije asocijacije

Polimorfizmi u genetici predstavljaju normalne varijacije u naslednoj osnovi čoveka, tj. razlike u nukleotidnom sastavu DNK koje se sreću u opštoj populaciji. Polimorfizam pojedinačnih nukleotida (*engl.* Single Nucleotide Polymorphism, SNP) najčešći je izvor genetičke varijabilnosti u humanom genomu i obuhvata oko 80% svih polimorfizama a označava promenu nastalu usled zamene nukleotida unutar DNK sekvence. Smatra se da je polimorfni DNK lokus mesto na kome postoje najmanje dva alela, pri čemu najređi ima frekvenciju veću od 1%. Aleli s frekvencijama manjim od 1% označeni su kao mutacije, ili retke varijante. (Li i Sadler, 1991; Turnpenny i Ellard, 2007). Projektom „Genom čoveka“ (*engl.* Human Genome Project, HGP), koji se temeljio na sekvenciranju DNK molekula, pokazano je da SNP postoje unutar celog genoma kako u kodirajućim tako i nekodirajućim delovima DNK i u proseku se javljaju jednom na 250 baza (Reid-Lombardo i Petersen, 2010). Kada je HGP zvanično završen, 2001. godine, otkriveno je približno 1,5 miliona SNP u humanom genomu (Venter i sar., 2001), što je bio samo vrh ledenog brega. Međutim, projekat je inicirao novu eru istraživanja genetičkih varijacija i funkcionalne karakterizacije humanog genoma. Tako su započeti novi globalni projekti, poput internacionalnog HapMap projekta, koji su imali za cilj da validiraju nekoliko miliona SNP koji su otkriveni u toku i nakon završetka HGP, da odrede njihove frekvencije i frekvencije genotipova u različitim populacijama, Evropskog, Azijskog ili Afričkog porekla (Naidoo i sar., 2011). Otkrivanje novih SNP je i dalje u toku, a prema poslednjoj HapMap katalogizaciji ima ih približno 90 miliona (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_summary.cgi, pristupljeno veb stranici 07.05.2016. godine).

Obilje podataka koji su prikupljeni poslednjih godina dovelo je do potrebe za sistematizacijom obeležavanja (nomenklature) samih polimorfizama kao i njihovih fenotipskih – funkcionalnih efekata. Za SNP-ove je uveden univerzalan način obeležavanja, u vidu takozvanog rs broja. Skraćenica „rs“ potiče od „reference SNP number“, a broj koji se dodeljuje datom polimorfizmu je jedinstven i kao takav se registruje u bazama podataka. Pored toga, zadržalo se i obeležavanje prema položaju polimorfno – varijabilnog nukleotida u genu. Takođe, oznake koje se odnose na fenotipski efekat SNP-a, tj. njegov uticaj na strukturu proteina, se vrlo često koriste, budući da imaju veliki praktični značaj (Novaković i sar., 2010).

Većina do sada otkrivenih SNP ne utiče na promenu fenotipa, a najviše pažnje pobuđuju upravo SNP koji utiču na ispoljavanje (ekspresiju) gena, odnosno menjanje građe proteina. Pretpostavlja se da je broj takvih SNP u genomu čoveka između 50 000 - 250 000 (Stoneking, 2001). Ukoliko je SNP u kodirajućem delu, promena ekspresije gena nastaje zbog promene aminokiseline ili prevremenog uvođenja STOP kodona što rezultuje sintezom izmenjenog proteina. Polimorfizam koji ovo uslovljava je stoga pod pojačanim selekcionim pritiskom. Zato, unutar samog kodona mnogo češće se javljaju sinonimne ili tihe ("silent") bazne supstitucije koje ne dovode do promene aminokiseline. Sa druge strane ne znači da su "silent" mesta u kodirajućim sekvencama u potpunosti bez efekta. Alternativni tripleti koji kodiraju iste aminokiseline mogu imati različitu brzinu transkripcije, a iRNK može imati različitu brzinu translacije zbog limitiranog pula dostupnih tRNK. Promena ekspresije gena može da nastane i usled promena u 5' i 3' regulatornim sekvencama, promena u intronima koje menjaju stabilnost ili način obrade primarnog transkripta RNK ili promena u sekvencama koje kodiraju male regulatorne RNK (mikro RNK, miRNK). Ponekad, SNP ne mora da izaziva nijednu od navedenih promena ali postojanje određene alelske varijante može da bude udruženo sa određenom bolešću zbog toga što se ta alelska varijanta nasleđuje vezana za neki drugi deo genoma koji kodira ili reguliše produkte bitne u patogenezi bolesti. U takvim slučajevima SNP predstavlja marker te bolesti (Griffiths i sar., 2000; Novaković i sar., 2010).

Da bi se utvrdilo da li neki polimorfizam predstavlja predispoziciju za ispoljavanje datog svojstva primenjuju se studije asocijacije u kojima se analizira udruženost ispitivanog svojstva sa određenim genskim varijantama. Dve osnovne strategije koje se primenjuju u studijama asocijacije jesu analiza asocijacije gena kandidata i studije asocijacije čitavog genoma.

Studije gena kandidata se mogu primeniti u slučaju da postoji dovoljno znanja o biološkim mehanizmima koji su u osnovi patofiziologije bolesti. Geni kandidati biraju se na osnovu saznanja dobijenih istraživanjima na animalnim modelima, rezultata analize vezanosti ili na osnovu saznanja o biohemijskim procesima koji leže u osnovi bolesti koja se ispituje.

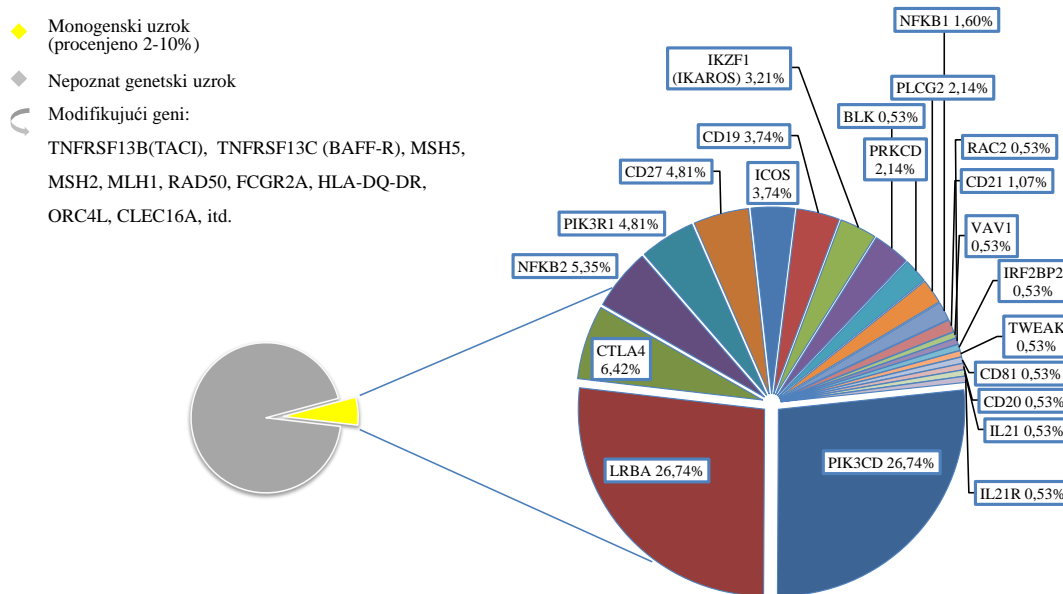
S obzirom da još uvek ne postoji adekvatan animalni model koji odgovara CVID fenotipu kod ljudi, geni kandidati su traženi među onima za koje se zna da imaju imunoregulatornu ulogu. Među njima, najbolje su dokumentovane promene u **TNFRSF13B** genu koji kodira tzv. transmembranski aktivator i kalcijum i ciklofilin ligand interaktor (*engl.* Transmembrane Activator and CAML Interactor, **TACI**), koje su nađene u 8 do 10% CVID pacijenata ali i kod 1%-2% zdravih osoba, stoga se i svrstavaju pre u genetske polimorfizme koji dovode do sklonosti ka razvoju CVID nego u uzročne mutacije. Inače, TACI polimorfizmi mogu da utiču na vezivanje liganda APRIL (ligand koji indukuje proliferaciju) i faktora aktivacije B-ćelija (*engl.* B-cell Activating Factor), neophodnih za promenu klase imunoglobulina (Castigli i sar., 2005; Salzer i sar., 2005; Martinez-Gallo i sar., 2013). Slično je nađeno i za **BAFF-R** (gen za BAFF receptor, sinonim *TNFRSF13C*), u kojem je otkrivena homozigotna delecija kod brata i sestre koji su potomci iz konsangvinitetnog braka i kod kojih su opisane kliničke i/ili laboratorijske karakteristike CVID poremećaja (Warnatz i sar., 2009). Daljim istraživanjem gena za BAFF-R ustanovljeno da su polimorfizmi u tom genu vrlo česti i da neki od njih mogu doprineti izmenjenom odgovoru B-ćelija (Pieper i sar., 2014).

Sugerisano je, takođe, da geni uključeni u proces reparacije DNK imaju ulogu u patogenezi CVID. To je slučaj sa **Msh5** genom koji, u sadejstvu sa *Msh4*, ima bitnu ulogu u regulaciji mejotske homologe rekombinacije, kao i u „mismatch“ popravci DNK i promeni klase imunoglobulina. Kod pacijenata sa CVID, kao i IgAD, otkrivena je asocijacija sa određenim polimorfizmima u *Msh5* genu (Sekine i sar., 2007). Međutim, ovaj gen je lociran unutar regiona MHC III klase kod ljudi već povezanog sa CVID i IgAD (A1-B8-DR3 haplotip), a funkcionalne posledice tih polimorfizma nisu potvrđene.

Nova dostignuća u razvoju metoda molekularne genetike omogućila su analizu asocijacije ispitivane bolesti sa stotinama hiljada genskih varijanti raspoređenih po čitavom genomu. Takve studije su poznate kao **studije asocijacije celokupnog genoma** (*engl.* Genome Wide Association Studies, GWAS). Kompanije kao što su Affimetrix i Illumina razvile su tehnologiju mikročipova (*engl.* microarray) na kojima se može analizirati po jedan SNP na svakih 5 kb do čak 1 kb genoma čoveka, čime se ispitivanjem obuhvata 600 000 do 3 000 000 SNP-ova. Ovakve studije sprovode se na

velikom broju ispitanika a do rezultata se dolazi primenom visoko specifičnih statističkih metoda. Zahvaljujući postojanju tzv. neravnoteže vezanosti (*engl.* Linkage Disequilibrium, LD), odnosno pojave da se dva alela nasleđuju zajedno češće nego što bi to bio proizvod slučajnosti, omogućeno je genotipiziranje mnogo većeg broja SNP nego što se realno tehnički izvodi (Hindorff i sar., 2009). Osim toga, unapređene platforme za GWAS danas mogu detektovati i varijacije u broju ponovaka (*engl.* Copy Number Variations, CNV) koje se od nedavno smatraju značajnim oblikom varijacija u ljudskom genomu, a neke od njih su već vezane i sa određenim bolestima (Cooper i sar., 2008). Heterogenu prirodu CVID dodatno su potvrdile objavljene GWAS i CNV studije koje su ukazale na nove gene i genske lokuse koji bi mogli imati ulogu u etiopatogenezi CVID-a. Tako je u prvoj studiji tog tipa analizom koja je obuhvatila 363 pacijenta sa CVID nađena jaka asocijacija sa genima za disintegrin i metaloproteinazu (**ADAM geni**), kao i duplikacija u **ORC4L** (*engl.* Origin Recognition Complex 4L) koja je otkrivena isključivo kod 15 CVID pacijenata (Orange i sar., 2011). Isto tako, u skorašnjoj, do sada najvećoj genetičkoj studiji sa CVID pacijentima, koja je obuhvatila uzorak od 778 pacijenata iz Evropskih i Severnoameričkih kohorti, analizom preko 100 hiljada SNP u specijalno dizajniranom čipu za imunološke bolesti (ImmunoChip, Illumina) otkrivena je jaka veza sa **CLEC16A** genskim lokusom. **CLEC16A** kodira protein koji je eksprimiran u dendritskim ćelijama, NK i B-ćelijama, a na eksperimentalnom modelu je pokazano da miševi sa smanjenom funkcijom ovog gena imaju poremećen imunoglobulinski profil (Li i sar., 2015). Zanimljivo je da su u obe pomenute studije potvrdili već opisanu asocijaciju CVID sa genima iz **HLA** lokusa na hromozomu 6.

Na slici 1. su prikazani do sada opisanih monogenski poremećaji sa fenotipom sličnim CVID, kao i njihova procenjena zastupljenost, pojedinačno i u odnosu na preostale slučajeve CVID kod kojih je genetski uzrok nepoznat. U potonjoj kategoriji sumirani su i najvažniji polimorfizmi povezani sa CVID poremećajem, odnosno potencijalni modifikujući geni.



Slika 1. Procenjen udeo monogenetskih mutacija u etiopatogenezi poremećaja sa CVID fenotipom, bazirano na objavljenim slučajevima. Modifikovno prema ref. (Bogaert i sar., 2016)

S obzirom na bitnu imunoregulatornu ulogu, geni za citokine su ispitivani kao dobri kandidat geni za CVID. Iako sama priroda bolesti može biti odgovorna za izmenjenu ekspresiju i sekreciju citokina u CVID, smatra se i da genetski polimorfizmi unutar kodirajućih ili promotorskih regiona gena za citokine utiču na njihovu produkciju. U dosadašnjim studijama, pokazano je da određeni genotipovi/haplotipovi gena za citokine, uključujući IFN-gama, IL-6, IL-10 i TNF, utiču na njihove koncentracije u serumu. Za neke od njih (IL-10, IL-6, TNF) pokazano je da specifični polimorfizmi u genima koji ih kodiraju mogu imati veze sa ispoljavanjem CVID fenotipa. Iako velike GWAS studije nisu otkrile asocijaciju CVID i polimorfizama u ovim genima, to ne limitira potencijalni značaj njihovog daljeg ispitivanja jer je moguće da se radi o etničkim genetskim karakteristikama ispitivanih populacija, kao i specifičnostima određenog kliničkog fenotipa heterogenih CVID poremećaja.

1.7.2 Polimorfizam gena za TNF

Gen za TNF (*TNF*) u ljudskom haploidnom genomu lociran je, u jednoj kopiji na kratkom kraku hromozoma 6, u blizini gena glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (*engl.* Major Histocompatibility Complex, MHC). Jedan od najviše ispitivanih polimorfizama pojedinačnih nukleotida (SNP) je polimorfizam na poziciji -308 u promotoru *TNF* u kojem je došlo do substitucije G>A (rs1800629), pri čemu je pokazano da genotipovi GA i AA proizvode veće količine TNF (Smith i Humphries, 2009). Rezai i sar. su pokazali veću učestalost GA genotipa u kohorti od 30 pacijenata sa CVID u odnosu na kontrolnu grupu od 140 osoba (Rezaei i sar., 2009). Pored toga, u jednoj ranijoj studiji autori su pronašli vezu između TNF +488 A alela i granulomatozne forme CVID (Mullighan i sar., 1997), što je i potvrđeno i na uzorku CVID pacijenata sa granulomatoznom bolešću iz francuske DEFI grupe (Boutboul i sar., 2016).

1.7.3 Polimorfizmi gena za IL-10

Gen *IL10* je mapiran na hromozomu 1q31-32 i ima 5 egzona. Najviše ispitivani polimorfizmi su u promotorskom regionu gena, a među njima su i *IL10* G/A-1082 (rs1800896) i C/T-819 (rs1800871) (Smith i Humphries, 2009). Rezai i sar. su u već pomenutoj kohorti pokazali da postoji značajno veća zastupljenost genotipa GA u okviru polimorfizma -1082 u grupi pacijenata sa CVID u odnosu na zdrave osobe (Rezaei i sar., 2010). Oni su takođe ispitivali haplotipove za tri polimorfizma u promotoru *IL10* za koje se smatra da su u neravnoteži vezanosti (LD), što su pomenuti *IL10* G/A -1082 (rs1800896), *IL10* C/T -819 (rs1800871), kao i *IL10* A/C-592 (rs1800872). Haplotip ATA, udružen sa sniženom produkcijom IL-10, prethodno je povezan sa granulomatoznom formom CVID, kao i *TNF* +488 A alel sa kojim je ta asocijacija još veća (Mullighan i sar., 1999), ali Rezai i sar. nisu potvrdili taj nalaz u njihovoj populaciji (Rezaei i sar., 2010).

1.7.4 Polimorfizam gena za IL-6

Gen *IL6* je smešten na 7p15.3 i sadrži 6 egzona. U jednoj studiji je utvrđeno da se genotip CC u okviru na poziciji -174 u genu za IL-6 značajno češće javlja kod pacijenata sa CVID u odnosu na grupu zdravih ispitanika (Rezaei i sar., 2009).

Genotipovi GG i GC proizvode veće količine IL-6 dok genotip CC proizvode manju količinu IL-6 (Morse i sar., 1999).

1.7.5 Polimorfizam gena za IFN-gama

Gen za IFN-gama, *IFNG*, je smješten na 12q24.1 i sadrži 4 egzona (Ruiz-Linares, 1993). Nekoliko polimorfizama je privuklo pažnju u studijama asocijacije polimorfizama i bolesti, a među njima je i polimorfizam +874 A>T u okviru introna 1 za koji se smatra da utiče na ekspresiju IFN-gama. Pokazano je da je TT genotip udružen sa visokom produkcijom IFN-gama, genotip TA sa srednjom, dok je genotip AA udružen sa niskom produkcijom tog citokina (Pravica i sar., 2000). Uloga ovog polimorfizma, koliko znamo, još nije ispitivana kod COVID pacijenata.

2 CILJEVI

Ciljevi istraživanja su sledeći:

1. Odrediti distribuciju alela i genotipova polimorfizama *TNF*, *IL10*, *IL6* i *IFNG* u grupi pacijenata sa CVID kao i za *IL10* i *IL6* kod zdravih osoba u Srbiji za koje do sada ne postoje podaci.
2. Ustanoviti da li je neki od polimorfizama ovih gena, koji nastaju usled izmene pojedinačnih nukleotida, faktor rizika za nastanak CVID ili da li utiče na kliničke manifestacije ove bolesti.
3. Proceniti da li se distribucije ispitivanih polimorfizama kod pacijenata sa CVID u ovoj studiji razlikuju u odnosu na studije u kojima su ovi polimorfizmi ispitivani u drugim populacijama pacijenata sa CVID.
4. Ustanoviti da li postoji korelacija određenog genotipa CVID pacijenata sa smanjenom ili povećanom produkcijom određenog citokina na osnovu izmerenih koncentracija *TNF*, *IL-10*, *IL-6* i *IFN-gama* u supernatantu nakon stimulacije mononuklearnih ćelija periferne krvi poliklonskim aktivatorima.

3 MATERIJA I METODE

Studija preseka je sprovedena na Klinici za alergologiju i imunologiju Kliničkog centra Srbije (KCS), analiza genskih polimorfizama i enzimski imunotestovi su urađeni u imunološkoj laboratoriji Instituta za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Dalja obrada podataka i statistička analiza urađeni su na Institutu za humanu genetiku Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Studija je planirana u skladu sa etičkim standardima datim u Helsinškoj deklaraciji (revidirana verzija iz 1983. godine) i u skladu sa pravilima Etičkog komiteta Kliničkog centra Srbije i Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (Odluka br. 29/III-4).

3.1 Ispitanici

U studiju su uključeni svi odrasli pacijenti sa CVID, ispitivani i lečeni u Klinici za alergologiju i imunologiju KCS tokom 2015. godine, koji su dali pristanak za učešće u studiji. Jedini kriterijum za isključenje iz studije bio je neprihvatanje pacijenta da učestvuje u njoj. Uzorak krvi je sakupljen od 35 pacijenata.

3.1.1 Kriterijumi za postavljanje dijagnoze i podela na kliničke fenotipove

U cilju kliničke obrade pacijenata korišćeni su podaci dobijeni prilikom rutinske dijagnostike u skladu sa protokolom za sve pacijente sa CVID na Klinici za alergologiju i imunologiju KCS. Kod svih pacijenata dijagnoza je postavljena na osnovu kriterijuma definisanih od strane Evropskog društva za imunodeficijencije (ESID) iz 1999. godine (Conley i sar., 1999), imajući u vidu i najnoviju, radnu, verziju istih kriterijuma iz 2015. godine (ESID, 2015).

Za svakog pacijenta su prikupljene sledeće karakteristike: pol, starost pri početku simptoma, vreme postavljanja dijagnoze, koncentracije imunoglobulina G, A i M na početku bolesti, kao i klinički komorbiditeti, odnosno komplikacije bolesti.

U cilju korelacije određenih kliničkih manifestacija sa ispitivanim genskim polimorfizmima pacijenti su podeljeni u definisane kliničke fenotipove: 1. pacijenti koji imaju infekcije i najčešće komplikacije respiratornih infekcija (bronhiektazije, hroničnu obstruktivnu bolest pluća) 2. pacijenti koji osim infekcija razvijaju i autoimunske bolesti (autoimunska citopenija, atrofični gastritis, vitiligo, autoimunski tiroiditis, enteropatija

slična celijakiji, kolitis) i 3. pacijenti koji razvijaju limfoproliferaciju (splenomegalija, limfadenopatija, limfoidna nodularna hiperplazija) sa ili bez neinfektivnih granuloma. Da bi se omogućila preciznija i validnija korelacija genotip – fenotip, prvu grupu pacijenata su činili pacijenti sa bronhiektazijama, verifikovanim kompjuterizovanom tomografijom grudnog koša i/ili bronhoskopijom. Treću grupu su činili pacijenti sa splenomegalijom, kao nedvosmislenim kliničkim entitetom u podgrupi limfoproliferativnog fenotipa, koja je dokazana ultrasonografski (longitudinalni dijametar preko 11 mm). Dijagnoza autoimunskih bolesti je potvrđena standardnim kliničkim i laboratorijskim parametrima koji su predviđeni dijagnostičkim kriterijumima za svaku pojedinačnu autoimunsku bolest.

3.2 Zdrave kontrole

Kontrolnu grupu za određivanje učestalosti alela *IL10* i *IL6* činili su 250 dobrovoljnih davalaca krvi čija je krv uzeta u Institutu za transfuziju krvi Srbije, dok su za *TNF* i *IFNG* korišćeni prethodno objavljeni podaci za zdrave osobe u Srbiji (Popadic i sar., 2015). Kontrolnu grupu za određivanje koncentracije TNF, IL-10, IL-6 i IFN-gama u supernatantu nakon stimulacije mononuklearnih ćelija periferne krvi poliklonским aktivatorima (forbol-miristolacetat i jonomicin) činilo je 35 zdravih osoba.

3.3 Uzimanje uzoraka krvi od ispitanika

Za određivanje genskih polimorfizama i ispitivanje produkcije citokina, svim ispitanicima je u Klinici za alergologiju i imunologiju KCS venepunkcijom uzeto 10 ml periferne krvi u odgovarajuće vacutainer epruvete (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, SAD) sa EDTA kao antikoagulansom. Uzorci su uzimani pred davanje supstitucione terapije intravenskim imunoglobulinima (IVIG) koju pacijenti dobijaju jednom mesečno. Uzorci krvi su čuvani na 4°C i transportovani unutar 2 sata do Laboratorije za imunologiju Instituta za Mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu gde su dalje obrađivani, i gde je izolovana i čuvana genomska DNK. Veći deo uzorka periferne krvi (oko 9,5 ml) korišćen je za izdvajanje mononuklearnih ćelija, dok je ostatak iskorišćen za izolaciju DNK.

3.4 Metode molekularne genetike

U ovom radu molekularno-genetičko ispitivanje obuhvata izolaciju ukupne genomske DNK i analizu polimorfizama gena za TNF, IL-10, IL-6 i IFN-gama primenom PCR-a u realnom vremenu standardizovanim TaqMan SNP esejom za genotipizaciju.

3.4.1 Izolacija DNK

Za izolaciju DNK iz krvi ispitanika korišćen je GeneJet Genomic DNA Purification Kit (Fermentas, Vilnius, Litvanija) prema uputstvu proizvođača. Pre početka izolacije, puferima za ispiranje (*engl.* Wash buffer, WB) WB I i WB II dodata je propisana količina 100% etanola (Zorka, Šabac, Srbija). Ukratko, krv u vacutainer epruvetama je promešana okretanjem epruvete gore-dole osam puta nakon čega je iz svake uzimana po 200 µl krvi i prenošeno u obeležene ependorf epruvete zapremine 1,5 ml (Sarsted, Nümbrecht, SR Nemačka). Zatim je svakom uzorku dodavano po 400 µl rastvora za liziranje i 20 µl proteinaze K. Nakon toga, svi uzorci su kratko i energično izmešani na orbitalnoj mešalici (vorteksu) i inkubirani 10 minuta u vodenom kupatilu na 56°C uz povremeno mešanje (2-3 puta) okretanjem epruveta gore-dole. U svaki uzorak je potom dodavano po 200 µl 96% etanola (Zorka, Šabac, Srbija), a zatim je smeša energično mešana. Nakon toga, sav sadržaj je prebacivan u prethodno obeležene kolonice koje su bile ubačene u ependorf epruvete od 2 ml sa odsečenim poklopcem (Sarsted, Nümbrecht, SR Nemačka). Sadržaj kolonica je potom centrifugiran 1 minut na 6000g nakon čega su kolonice sa vezanom DNK prebacivane u kivete za otpad koje su sastavni deo GeneJet Genomic DNA Purification kompleta. DNK vezane za matriks kolona su ispirane dodavanjem po 500 µl WB I i centrifugiranjem kolona u trajanju od 1 minut na 8000g. Sadržaj kiveti za otpad je zatim odlivan, a u kolone je dodavano po 500 µl WB II. Nakon toga, kolone su centrifugirane 3 minuta na 14 000g, a ukoliko bi u njima ostalo još tečnosti, centrifugiranje je ponavljano još 1 minut na istoj brzini nakon pražnjenja kiveti za otpad. Kolone sa vezanom DNK su prebacivane u nove obeležene Eppendorf Safe Lock epruvete od 1,5 ml (Eppendorf, Hamburg, SR Nemačka) i pristupalo se izdvajanju DNK vezane za matriks kolone na sledeći način: u svaku kolonu je dodavano 200 µl pufera za rastvaranje DNK, zatim su kolone inkubirane 2

minuta na sobnoj temperaturi i centrifugirane 1 minut na 8000g. Izolovanim DNK je zatim spektrofotometrijski određivana koncentracija i čistoća.

3.4.2 Određivanje koncentracije i čistoće izolovane DNK

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

3.4.3 Detekcija i analiza polimorfizama gena reakcijom lančanog umnožavanja (PCR) u realnom vremenu (*engl.* Real-time PCR)

Jedna od metoda za detekciju SNP-ova jeste i PCR u realnom vremenu sa primenom TaqMan eseja. PCR u realnom vremenu (kvantitativni PCR) predstavlja modifikaciju konvencionalnog PCR-a gde se dinamika amplifikacije meri u realnom vremenu nakon svakog PCR ciklusa. U PCR reakciji koriste se, pored prajmera, i alel specifične oligonukleotidne probe koje su na 5' kraju obeležene različitim fluorescentnim bojama (reporter boje npr. VIC, FAM) dok se na njihovom 3' kraju nalazi prigušivač (quencher) koji blokira emisiju fluorescencije. Tokom PCR reakcije u fazi vezivanja prajmera po principu komplementarnosti se za ciljnu sekvencu DNK vezuje i jedna od proba. Nakon toga, u fazi kada Taq polimeraza dodaje nove nukleotide dolazi do uklanjanja probe 5'-3' egzonukleaznom aktivnošću enzima. Kako se najpre odvaja 5' nukleotid sa reporterom, usled njegovog udaljavanja od prigušivača boja počinje da fluorescira, što aparat registruje. Iz ciklusa u ciklus raste intenzitet fluorescencije, što omogućava da se u realnom vremenu prati dinamika PCR reakcije. Na kraju PCR reakcije detektovano značajno povećanje fluorescencije samo jedne od boja ukazuje na homozigotno stanje za dati alel, dok povećanje fluorescencije obe boje ukazuje na heterozigotno stanje. Prednost ove metode leži u činjenici da se celokupna

analiza obavlja u jednoj tubi tokom jedne PCR reakcije bez potrebe za daljom obradom uzorka.

Za detekciju i analizu polimorfizama gena *TNF*, *IL10*, *IL6* u genomu pacijenata sa COVID primenjena je TaqMan metoda korišćenjem komercijalno dostupnih smeša oligonukleotida i to za *TNF* rs1800629 (#C__7514879_10), *IL10* rs1800896 i rs1800871 (#C__1747360_10 i C__1747362_10) i *IL6* rs1800795 (#C__1839697_20), (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD). Amplifikacija fragmenata DNK Real-time PCR metodom vršena je pomoću navedenih smeša komercijalnih oligonukleotida i Maxima™ Probe qPCR 2X Master Mix, (Fermentas, Vilnius, Litvanija) uzimajući u obzir preporuke proizvođača reagenasa. Ukratko, amplifikacija je vršena u optičkim pločama za PCR, formata 8 x 12 bunarčića (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD), u koje su sipane reakcione smeše od 5 µl 2 x Real Master Mix Probe (Fermentas, Vilnius, Litvanija), 0,25 µl komercijalne smeše oligonukleotida za detekciju navedenih polimorfizama i 4,75 µl ispitivanog DNK uzorka (4 ng/µl). Ploče su zatim zatvarane lepljenjem optičkog filma (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD), kratko centrifugirane na 1500g i smeštane u termoblok Realplex² PCR mašine (Eppendorf, Hamburg, SR Nemačka). Ploče su pre amplifikacije inkubirane u termobloku 4 minuta na 95°C da bi se aktivirala DNK polimeraza. Temperaturni profil amplifikacije je bio 95°C 15 sec → 60°C 1 minut sa 39 ponavljanja. Merenje fluorescencije u svakom ciklusu vršeno je na 60°C. Po završetku amplifikacije određivani su aleli pomoću Realplex 2.0 softvera uz ručno podešavanje linije praga detekcije.

Za polimorfizam *IFNG* (-874 T/A; rs2430561), s obzirom da nisu postojali komercijalno dostupni oligonukleotidi, korišćena je smeša oligonukleotida koja je posebno dizajnirana uz optimizovanje uslova za amplifikaciju i razlikovanje alela po protokolu koji je prethodno opisan u Popadić D. i autori (600 nM F / 600 nM R / 250 nM A TaqMan proba / 400 nM T TaqMan proba, finalne koncentracije). Temperaturni profil amplifikacije je bio 95°C 15 sec → 55°C 1 minut → 68°C 20 sekundi sa 39 ponavljanja. Merenje fluorescencije u svakom ciklusu vršeno je na 68°C (Popadic i sar., 2012). Po završetku amplifikacije određivani su aleli pomoću Realplex 2.0 softvera uz ručno podešavanje linije praga detekcije.

Polimorfizmi *IL10*, *IL6* kod zdravih kontrola su određeni u kolekciji 250 DNK dobrovoljnih davalaca krvi koja postoji u Laboratoriji za imunologiju Instituta za mikrobiologiju i imunologiju.

3.5 *In vitro* ispitivanja

3.5.1 Ćelijska kultura

U istraživanju su korišćene mononuklearne ćelije dobijene iz periferne krvi (*engl.* Peripheral Blood Mononuclear Cell, PBMC) pacijenata i zdravih kontrola. Puna krv je razblažena u odnosu 1:1 sa RPMI 1640 medijumom (Sigma-Aldrich, Minhen, Nemačka), nakon čega je naneta na 15 ml LSM 1077 gradijenta (Sigma-Aldrich, Minhen, Nemačka) i centrifugirana 30 minuta na 1000×g na sobnoj temperaturi bez kočnica. Gornji sloj plazme je uklonjen i PBMC iz interfaznog sloja su pažljivo sakupljane, resuspendovane u RPMI 1640 medijumu i isprane od gradijenta centrifugiranjem 10 minuta na 800×g, a zatim još 2 puta centrifugiranjem po 10 min. na 400×g. Ćelijska kultura humanih PBMC je kultivisana na 37°C u atmosferi obogaćenoj CO₂ u odgovarajućem medijumu (RPMI 1640 puferovan HEPES-om), uz dodavanje govedeg fetalnog seruma (*engl.* Fetal Bovine Serum, FBS), u koncentraciji od 10% i rastvora antibiotika i antimikotika (1%) (Sigma-Aldrich, Minhen, Nemačka). Ćelije u kulturi su stimulisane 24h forbol 12-miristat 13-acetatom (PMA) (Sigma-Aldrich, Minhen, Nemačka) (20ng/ml) i jonomicinom (Sigma-Aldrich, Minhen, Nemačka) (500 ng/ml). Za potrebe eksperimenata ćelije su kultivisane u pločama sa 24 bunara sa ravnim dnom (Sarstedt, Nümbrecht, Nemačka) radi merenja koncentracija citokina.

3.5.2 Određivanje koncentracija citokina

Ispitivanje produkcije citokina (IFN-gama, IL-6, TNF, IL-10) u supernatantu nakon 24h stimulacije sa PMA i jonomicinom ćelija u kulturi obavljeno je enzimskim imunotestom (*engl.* Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, (ELISA)). Za ispitivanje produkcije citokina IFN-gama, IL-6 i TNF korišćeni su komercijalno dostupni setovi regenasa (eBioscience, San Diego, CA, SAD), odnosno za IL-10 (R&D Systems, Abingdon, V. Britanija) prema uputstvu proizvođača i polistirenske ploče za mikrotitraciju sa 96 bunarčića MaxiSorp (Nunc, Roskilde, Danska). Protokol se sastojao iz sledećih faza: oblaganje ploče sa primarnim antitelom (100 µL/bazenčić, preko noći

na 4°C), ispiranje (5 puta), blokiranje sa albuminom iz goveđeg seruma (200 µL/bazenčić, 1 h na sobnoj temperaturi), ispiranje (5 puta), inkubacija uzoraka (100 µl/bazenčić, 2 h na sobnoj temperaturi), ispiranje (5 puta), inkubacija sa sekundarnim antitelom obeleženim biotinom (100 µl/bazenčić, 1 h na sobnoj temperaturi), ispiranje (5 puta), inkubacija sa avidin-enzimskim kompleksom sa peroksidazom rena kao enzimom (100 µl/bazenčić, 30 minuta na sobnoj temperaturi), ispiranje (5 puta), inkubacija sa supstratom (tetrametilbenzidin) (100 µl/bazenčić, do 30 minuta na sobnoj temperaturi u mraku), zaustavljanje reakcije sa jednomolarnom (1M) H₂SO₄ (Merck, Darmstadt, Nemačka) i očitavanje apsorbancije pomoću spektrofotometra (Tecan, Grodig, Austrija) korišćenjem filtra za 450 i 570 nm. Finalna apsorbancija je dobijena oduzimanjem izmerenih apsorbancija na pomenutim talasnim dužinama.

Svaki uzorak je rađen u duplikatu. Količina citokina (u pg/ml) određivana je korišćenjem standardne krive dobijene na osnovu vrednosti apsorbance za odgovarajući humani rekombinantni citokin (pripremljen od proizvođača odgovarajućeg kompleta za ELISA-u) pri čemu su napravljena dvostruka serijska razblaženja. Kao negativna kontrola (0 pg/ml citokina) korišćena je vrednost apsorbance pufera za razblaživanje. Kao prag za detekciju je uzeta najniža koncentracija standarda za koju je srednja apsorbancija -2SD bila veća nego srednja apsorbancija negativne kontrole +2SD. Prag za detekciju je bio: TNF (4 pg/ml), IFN-gama (4 pg/ml), IL-6 (3 pg/ml) i IL-10 (4 pg/ml). Rezultati merenja nivoa citokina su prikazani po grupama kao medijana sa interkvartilnim opsegom.

3.6 Statistička analiza

Statistička analiza je urađena korišćenjem standardnih metoda deskriptivne statistike. Za numerička obeležja korišćena je aritmetička sredina i standardna devijacija, odnosno medijana i interkvartilni opseg. Za testiranje razlike između dve grupe podataka, u zavisnosti od prisustva normalne raspodele, korišćen je Studentov T-test odnosno Man-Vitnijev test, a za više od dve grupe podataka jednofaktorska analiza varijanse ili Kruskal-Volisonov test. Za utvrđivanje razlike u frekvenciji i distribuciji alela i genotipova različitih polimorfizama i karakteristika bolesti u ispitivanim grupama, primenjen je Pirsonov χ^2 test ili Fisher-ov test tačne verovatnoće. Hardy-Weinberg ravnoteža (engl. Hardy-Weinberg Equilibrium, HWE) je ispitivana posebno za pacijente

i kontrole, kao i za obe grupe ispitanika zajedno. U svim testovima vrednosti verovatnoće (p vrednosti) manje od 0,05 smatrane se značajnim, a manje od 0,01 visoko značajnim. Za statističku analizu podataka i pravljenje grafika su korišćeni IBM SPSS Statistics v.20 (IBM Corp., Armonk, NY, SAD) i GraphPad Prism (GraphPad Software Inc, verzija 6, La Jolla, CA, SAD).

4 REZULTATI

4.1 Kliničke karakteristike pacijenata sa CVID

Ispitivanje je obuhvatilo 35 odraslih CVID pacijenata lečenih i ispitivanih na Klinici za alergologiju i imunologiju KCS. Demografske i kliničke karakteristike pacijenata sumirane su u tabeli 3. Distribucija muškog i ženskog pola bila je gotovo jednaka (51,4% prema 48,6%). Starost pacijenata u vreme uključenja u studiju izražena je u godinama, pri čemu je srednja vrednost iznosila 45 godina, uz opseg od 18 godina, što je bila minimalna vrednost, do maksimalne vrednosti od 69 godina. Prosečan uzrast u vreme početka bolesti bio je 27 godina, uz veliki opseg od 2 do 57 godina.

Tabela 3. Demografski i klinički parametri pacijenata sa CVID

Pacijenti	Godine
Starost	45 (18-69)
Vreme početka bolesti	27 (2-57)
	Broj pacijenata (%)
Pol	
Muški	18 (51,4)
Ženski	17 (48,6)
Rekurentne infekcije	
Gornji respiratorni trakt	19 (54,3)
Donji respiratorni trakt	26 (74,3)
Gastrointestinalni trakt	5 (14,3)
Urinarni trakt	1 (2,8)
Sepsa	1 (2,8)
Klinički fenotipovi	
Autoimunske bolesti	9 (25,7)
AIHA	3 (8,6)
ITP	2 (5,7)
Tireoiditis	3 (8,6)
Sistemska vitiligo	1 (2,8)
Splenomegalija	19 (54,3)
Bronhiektazije	12 (34,3)
Granulomi	2 (5,7)

AIHA, autoimunska hemolitička anemija; ITP, idiopatska trombocitopenijska purpura

Svi pacijenti su imali ponavljane infekcije kao jednu od prvih manifestacija bolesti. Najučestalije su bile infekcije donjeg i gornjeg respiratornog trakta (74,3% i 54,3%, respektivno), pri čemu je bronhiektazije razvila približno trećina pacijenata (34,3%). Autoimunske bolesti su dijagnostikovane kod 9 (25,7%) i u toj grupi su

najčešće citopenije (14,3%). Splenomegalija je zabeležena kod 19 pacijenata, što je više od polovine ukupnog broja, dok su granulomi registrovani kod samo 2 pacijenta (5,7%), stoga taj klinički entitet nije uzet za posebnu genotipsko-fenotipsku korelaciju.

4.2 Molekularno genetička analiza

Kod 35 pacijenata sa CVID i 250 zdravih osoba iz kontrolne grupe određena je distribucija alela i genotipova za polimorfizme *IL10* rs1800896 i rs1800871, kao i *IL6* rs1800795, dok su *IFNG* rs2430561, i *TNF* rs1800629 ispitivani samo kod pacijenata sa CVID.

4.2.1 Ispitivanje polimorfizma *TNF* (rs1800629) kod pacijenata sa CVID

Ispitivanje rs1800629 polimorfizma u promotoru gena za TNF kod pacijenata sa CVID vršeno je TaqMan PCR metodom pomoću komercijalnih oligonukleotida. Podaci za kontrolnu grupu koja uključuje 259 zdravih davaoca krvi iz Srbije preuzeti su iz literature (Popadic, 2014). Rezultati distribucije alela i genotipova, kao i statističke analize, prikazani su u tabeli 4.

Tabela 4. Aleli i genotipovi rs1800629 polimorfizma gena za TNF kod kontrola i pacijenata

Gen za citokin (SNP) Aleli/genotipovi	Kontrole	Pacijenti	p	OŠ (95%IP)
<i>TNF</i> (rs1800629)				
G	454 (0,88)	53 (0,76)	0,006†	0,44 (0,24-0,80)
A	64 (0,12)	17 (0,24)	0,006†	2,27 (1,24-4,17)
GG	196 (0,76)	20 (0,57)	0,019†	0,43 (0,21-0,89)
GA	62 (0,24)	13 (0,37)	0,092	1,88 (0,89-3,95)
AA	1 (0,004)	2 (0,06)	0,038†	15,64 (1,38-177,20)

OŠ, odnos šansi, IP, interval poverenja, †p vrednost <0.05

Analizom rezultata utvrđeno je da je frekvencija *TNF* A alela bila značajno viša kod pacijenata sa CVID nego kod kontrola ($p=0,006$) uz izračunat odnos šansi (OŠ) 2,27 u okviru intervala poverenja 95% (95%IP) od 1,24 do 4,17. Zastupljenost AA genotipa se takođe značajno razlikovala u grupi pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu ($p=0,038$; OŠ=15,64, 95%IP 1,38-177,20), dok je frekvencija GG genotipa bila značajno viša kod zdravih kontrola ($p=0,019$; OŠ=0,43, 95%IP=0,21-0,89).

U cilju testiranja da li distribucija genotipova odgovara distribuciji alela koji su određeni za ispitanike u ovom istraživanju izračunato je da li se dobijeni rezultati učestalosti genotipova nalaze u Hardy-Weinberg ravnoteži, i to je prikazano u tabeli 5.

Tabela 5. Testiranje distribucije genotipova rs1800629 polimorfizma gena za TNF u odnosu na Hardy-Weinberg ravnotežu.

<i>TNF</i> rs1800629	Kontrole	CVID	Ukupno
GG	196	20	216
Genotipovi	GA	13	75
	AA	2	3
Ukupno	259	35	294
HWE*	$X^2= 2,87$	$X^2= 0,035$	$X^2= 1,60$

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

Dalja analiza povezanosti alela i genotipova među pacijentima sa pojedinim kliničkim fenotipovima (bronhiektazije, splenomegalija, autoimunske bolesti) dala je rezultate prikazane u tabelama 6 i 7.

Tabela 6. Aleli i genotipovi rs1800629 polimorfizma gena za TNF klasifikovani prema kliničkom fenotipu

Citokin gen (SNP) Aleli/genotipovi	Bronhiektazije		Splenomegalija		Autoimunske bolesti	
	ne	da	ne	da	ne	da
<i>TNF</i> (rs1800629)						
G	34 (0,74)	19 (0,79)	26 (0,81)	27 (0,71)	38 (0,73)	15 (0,83)
A	12 (0,26)	5 (0,21)	6 (0,19)	11 (0,29)	14 (0,27)	3 (0,17)
GG	13 (0,56)	7 (0,58)	11 (0,69)	9 (0,47)	14 (0,54)	6 (0,67)
GA	8 (0,35)	5 (0,42)	4 (0,25)	9 (0,47)	10 (0,38)	3 (0,33)
AA	2 (0,09)	0 (0,00)	1 (0,06)	1 (0,06)	2 (0,08)	0 (0,00)

Tabela 7. Statistička analiza distribucije alela i genotipova *TNF* rs1800629 prema kliničkom fenotipu

Citokin gen (SNP) Aleli/genotipovi	Bronhiektazije		Splenomegalija		Autoimunske bolesti	
	p	OŠ	p	OŠ	p	OŠ
<i>TNF</i> (rs1800629)						
G	0,624	1,34 (0,41-4,38)	0,322	0,57 (0,18-1,75)	0,528	1,84 (0,46-7,34)
A	0,624	0,74 (0,23-2,44)	0,322	1,76 (0,57-5,47)	0,528	0,54 (0,14-2,16)
GG	0,923	1,08 (0,26-4,42)	0,203	0,41 (0,10-1,64)	0,700	1,71 (0,35-8,37)
GA	0,690	1,34 (0,32-5,61)	0,173	2,70 (0,64-11,47)	1,000	0,80 (0,16-3,94)
AA	0,536	NP	0,900	0,83 (0,05-14,48)	1,000	NP

OŠ, odnos šansi uz 95% interval poverenja, NP, nije primenjivo

Korelacijom genotipova rs1800629 u *TNF* genu sa pojedinim kliničkim fenotipovima nije dobijena statistička značajnost.

4.2.2 Ispitivanje polimorfizama *IL10* (rs1800896, rs1800871 i rs1800872) kod kontrola i pacijenata sa CVID

U okviru promotora gena za IL-10 ispitana su dva polimorfizma, *IL10* (rs1800896) i *IL10* (rs1800871) korišćenjem komercijalnih oligonukleotidnih proba TaqMan PCR metodom. Genotipovi za treći polimorfizam u okviru istog regiona gena *IL10* (rs1800872) izvedeni su iz SNP rs1800871 jer je ustanovljeno da su ova dva SNP u potpunoj neravnoteži vezanosti kod belaca (Turner i sar., 1997).

Rezultati distribucije alela i genotipova za sva tri ispitivana polimorfizma u okviru *IL10* gena prikazani su u tabeli 8. Analizom rezultata može se zaključiti da nije nađena statistički značajna razlika u distribuciji alela i genotipova za ispitivane *IL10* polimorfizme između pacijenata sa CVID i kontrolne grupe.

Tabela 8. Aleli i genotipovi rs1800896, rs1800871 i rs1800872 polimorfizama gena za IL-10 kod kontrola i pacijenata

Gen za citokin (SNP) Aleli/genotipovi	Kontrole	Pacijenti	p	OŠ (95%IP)
<i>IL10 (rs1800896)</i>				
A	294 (0,59)	42 (0,60)	0,841	1,05 (0,63-1,75)
G	206 (0,41)	28 (0,40)	0,841	0,95 (0,57-1,58)
AA	88 (0,35)	13 (0,37)	0,823	1,09 (0,52-2,26)
GA	118 (0,47)	16 (0,46)	0,862	0,94 (0,46-1,92)
GG	44 (0,18)	6 (0,17)	1,000	0,97 (0,38-2,47)
<i>IL10 (rs1800871)</i>				
C	370 (0,74)	54 (0,77)	0,571	1,18 (0,65-2,14)
T	130 (0,26)	16 (0,23)	0,571	0,84 (0,47-1,52)
CC	137 (0,54)	19 (0,54)	1,000	0,98 (0,48-1,99)
CT	96 (0,39)	16 (0,46)	0,406	1,35 (0,66-2,75)
TT	17 (0,07)	0 (0,00)	0,144	NA
<i>IL10 (rs1800872)</i>				
C	370 (0,74)	54 (0,77)	0,571	1,18 (0,65-2,14)
A	130 (0,26)	16 (0,23)	0,571	0,84 (0,47-1,52)
CC	137 (0,55)	19 (0,54)	1,000	0,98 (0,48-1,99)
CA	96 (0,38)	16 (0,46)	0,406	1,35 (0,66-2,75)
AA	17 (0,07)	0 (0,00)	0,144	NA

OŠ, odnos šansi, IP, interval poverenja, NP, nije primenjivo

U cilju testiranja da li distribucija genotipova odgovara distribuciji alela koji su određivani za ispitanike u ovom istraživanju, izračunato je da li se dobijeni rezultati učestalosti genotipova nalaze u Hardy-Weinberg ravnoteži (Tabele 9 i 10).

Tabela 9. Testiranje distribucije genotipa rs1800896 polimorfizma gena za IL-10 u odnosu na Hardy-Weinberg ravnotežu.

<i>IL10 (rs1800896)</i>	Kontrole	CVID	Ukupno
AA	88	13	101
Genotipovi	GA	16	133
	GG	6	51
Ukupno	250	35	
HWE*	$X^2=0,31$	$X^2=0,08$	$X^2=0,39$

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

Tabela 10. Testiranje distribucije genotipa rs1800871 polimorfizma gena za IL-10 u odnosu na Hardy-Weinberg ravnotežu.

<i>IL10</i> rs1800871)	Kontrole	CVID	Ukupno
Genotipovi			
CC	136	19	155
CT	97	16	133
TT	17	0	17
Ukupno	250	35	
HWE*	$X^2=0,00$	$X^2=3,07$	$X^2= 2,85$

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

Dobijeni rezultati pokazuju da su distribucije genotipova rs1800896 i rs1800871 polimorfizma gena za IL10 bile u Hardy-Weinberg ravnoteži, $p>0,05$.

Raspodela alela u populaciji zdravih osoba iz Srbije upoređena je sa podacima za druge populacione grupe da bi se utvrdilo da li postoje razlike između frekvencija G i A alela rs1800896 polimorfizma gena za IL-10 između kontrola iz Srbije i zdravih osoba sa drugih geografskih područja. Ovi rezultati su prikazani u tabeli 11.

Tabela 11. rs1800896 polimorfizam gena za IL-10 kod zdravih osoba u različitim populacijama.

Referenca	Populacija	Broj	Metod	A alel (%)	G alel (%)	p
(Perović i sar., u štampi)	Srbija	250	TaqMan	58,6	41,4	NP
(Fialho i sar., 2009)	Portugalija	117	PCR-SSP	65,4	34,6	0,399
(Khabour i Barnawi, 2010)	Jordan	118	RFLP	68,2	31,8	0,158
(Uboldi de Capei i sar., 2003)	Italija	140	PCR-SSP	61,0	39,0	0,729
(Seifart i sar., 2005)	Nemačka	243	RFLP	59,0	41,0	1,000
(Guarnizo-Zuccardi i sar., 2007)	Kolumbija	102	PCR-SSP	71,0	29,0	0,066

NP, nije primenjivo

Kao što je prikazano u tabeli 11, nije ustanovljena statistički značajna razlika u frekvencijama alela rs1800896 polimorfizma *IL10* između populacije Srbije i populacija Portugalije, Jordana, Italije, Nemačke i Kolumbije.

Tabela 12. rs1800871 polimorfizam gena za IL-10 kod zdravih osoba u različitim populacijama.

Referenca	Populacija	Broj	Metod	C alel (%)	T alel (%)	p
(Perović i sar., u štampi)	Srbija	250	TaqMan	74,0	26,0	NP
(Lee i sar., 2010)	Tajvan	148	RFLP	26,5	73,5	<0.0001
(Uboldi de Capei i sar., 2003)	Italija	140	PCR-SSP	72,0	28,0	0,752
(Seifart i sar., 2005)	Nemačka	243	RFLP	76,0	24,0	0,740
(Guarnizo-Zuccardi i sar., 2007)	Kolumbija	102	PCR-SSP	72,0	28,0	0,752

NP, nije primenjivo

Kada je reč o drugom ispitivanom *IL10* polimorfizmu, rs1800871, nađena je visoko statistički značajna razlika u frekvencijama alela između populacija Srbije i Tajvana, dok je distribucija alela ovog polimorfizma u našoj populaciji slična sa distribucijama populacija Italije, Nemačke i Kolumbije. Rezultati su sumirani u tabeli 12.

U cilju određivanja haplotipova za *IL10* polimorfizme korišćen je Arlequin softver v. 3,5 i algoritam maksimizacije očekivanja (*engl.* Estimation Maximization, EM) (Excoffier i Lischer, 2010). Dobijena su tri haplotipa: GCC, ACC i ATA, od mogućih osam, čija je distribucija prikazana u tabeli 13.

Tabela 13. Distribucija *IL10* haplotipova u grupi pacijenata sa COVID i zdravih kontrola.

<i>IL10</i> haplotip	Kontrole	Pacijenti sa COVID	p	OŠ (95%IP)
GCC	205 (0,41)	28 (0,40)	0,862	0,96 (0,57-1,60)
ACC	165 (0,33)	26 (0,37)	0,493	1,20 (0,71-2,02)
ATA	130 (0,26)	16 (0,23)	0,572	0,84 (0,47-1,52)

OŠ, odnos šansi, IP, interval poverenja

Kao što se vidi iz priloženog, ni analiza haplotipova polimorfizama u promoter regionu *IL10* gena nije pokazala povezanost sa sklonošću ka razvoju COVID fenotipa.

Dalje, urađena je korelacija distribucije alela i genotipova za sva tri polimorfizma prema određenim kliničkim manifestacijama, odnosno fenotipovima

bolesti. Podaci su prikazani u tabelama 14 i 15. Kao što se može videti iz priloženog, nije nađena značajna genotipsko-fenotipska korelacija ni za jedan od ispitivanih polimorfizama u *IL10* genu.

Tabela 14. Aleli i genotipovi rs1800896, rs1800871 i rs1800872 polimorfizama gena za IL-10 klasifikovani prema kliničkom fenotipu

Citokin gen (SNP) Aleli/genotipovi	Bronhiektazije		Splenomegalija		Autoimunske bolesti	
	ne	da	ne	da	ne	da
<i>IL10</i> (rs1800896)						
A	26 (0,57)	16 (0,67)	19 (0,59)	23 (0,61)	31 (0,6)	11 (0,61)
G	20 (0,43)	8 (0,33)	13 (0,41)	15 (0,39)	21 (0,4)	7 (0,39)
AA	8 (0,35)	5 (0,42)	6 (0,37)	7 (0,37)	9 (0,35)	4 (0,45)
GA	10 (0,43)	6 (0,50)	7 (0,44)	9 (0,47)	13 (0,50)	3 (0,33)
GG	5 (0,22)	1 (0,08)	3 (0,19)	3 (0,16)	4 (0,15)	2 (0,22)
<i>IL10</i> (rs1800871)						
C	37 (0,80)	17 (0,71)	23 (0,72)	31 (0,82)	40 (0,77)	14 (0,78)
T	9 (0,20)	7 (0,29)	9 (0,28)	7 (0,18)	12 (0,23)	4 (0,22)
CC	14 (0,61)	5 (0,42)	7 (0,44)	12 (0,63)	14 (0,54)	5 (0,56)
CT	9 (0,39)	7 (0,58)	9 (0,56)	7 (0,37)	12 (0,46)	4 (0,44)
TT	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
<i>IL10</i> (rs1800872)						
C	37 (0,80)	17 (0,71)	23 (0,72)	31 (0,82)	40 (0,77)	14 (0,78)
A	9 (0,20)	7 (0,29)	9 (0,28)	7 (0,18)	12 (0,23)	4 (0,22)
CC	14 (0,61)	5 (0,42)	7 (0,44)	12 (0,63)	14 (0,54)	5 (0,56)
CA	9 (0,39)	7 (0,58)	9 (0,56)	7 (0,37)	12 (0,46)	4 (0,44)
AA	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)

Tabela 15. Statistička analiza distribucije alela i genotipova *IL10* (rs1800896, rs1800871 i rs1800872) prema kliničkom fenotipu

Citokin gen (SNP) Aleli/genotipovi	Bronhiektazije		Splenomegalija		Autoimunske bolesti	
	p	OŠ	p	OŠ	p	OŠ
<i>IL10</i> (rs1800896)						
A	0,409	1,54 (0,55-4,31)	0,920	1,05 (0,40-2,74)	0,920	1,06 (0,35-3,19)
G	0,409	0,65 (0,23-1,82)	0,920	0,95 (0,36-2,48)	0,920	0,94 (0,31-2,81)
AA	0,726	1,33 (0,32-5,61)	1,000	0,97 (0,24-3,85)	0,697	1,51 (0,32-7,07)
GA	0,708	1,30 (0,32-5,27)	0,823	1,16 (0,30-4,40)	0,460	0,50 (0,10-2,44)
GG	0,399	0,33 (0,03-3,18)	1,000	0,81 (0,14-4,72)	0,999	1,57 (0,24-10,49)
<i>IL10</i> (rs1800871)						
C	0,365	0,59 (0,19-1,85)	0,335	1,73 (0,56-5,34)	1,000	1,05 (0,29-3,79)
T	0,365	1,69 (0,54-5,31)	0,335	0,58 (0,19-1,78)	1,000	0,95 (0,26-3,44)
CC	0,279	0,46 (0,11-1,90)	0,250	2,20 (0,57-8,57)	1,000	1,07 (0,23-4,91)
CT	0,279	2,18 (0,53-9,02)	0,250	0,45 (0,12-1,76)	1,000	0,93 (0,20-4,28)
TT	1,000	NP	1,000	NP	1,000	NP
<i>IL10</i> (rs1800872)						
C	0,365	0,59 (0,19-1,85)	0,335	1,73 (0,56-5,34)	1,000	1,05 (0,29-3,79)
A	0,365	1,69 (0,54-5,31)	0,335	0,58 (0,19-1,78)	1,000	0,95 (0,26-3,44)
CC	0,279	0,46 (0,11-1,90)	0,250	2,20 (0,57-8,57)	1,000	1,07 (0,23-4,91)
CA	0,279	2,18 (0,53-9,02)	0,250	0,45 (0,12-1,76)	1,000	0,93 (0,20-4,28)
AA	1,000	NP	1,000	NP	1,000	NP

OŠ, odnos šansi uz 95% interval poverenja; NP, nije primenjivo

Analiza udruženosti izračunatih haplotipova sa kliničkim manifestacijama bolesti takođe nije dala statistički značajne rezultate, i to je prikazano u tabelama 16 i 17.

Tabela 16. *IL10* haplotipovi klasifikovani prema kliničkom fenotipu

<i>IL10</i> haplotip	Bronhiektazije		Autoimunske bolesti		Splenomegalija	
	nema	ima	nema	ima	nema	ima
GCC	20 (0,43)	8 (0,33)	21 (0,40)	7 (0,39)	13 (0,41)	15 (0,39)
ACC	17 (0,37)	9 (0,38)	19 (0,37)	7 (0,39)	10 (0,31)	16 (0,42)
ATA	9 (0,20)	7 (0,29)	12 (0,23)	4 (0,22)	9 (0,28)	7 (0,18)

Tabela 17. Statistička analiza haplotipova *IL10* prema kliničkom fenotipu

<i>IL10</i> haplotip	Bronhiektazije		Autoimunske bolesti		Splenomegalija	
	p	OŠ (95%IP)	p	OŠ (95%IP)	p	OŠ (95%IP)
GCC	0,409	0,68 (0,23-1,82)	0,920	0,94 (0,31-2,81)	0,920	0,95 (0,36-2,49)
ACC	1,000	1,02 (0,37-2,84)	0,862	1,10 (0,36-3,33)	0,348	1,60 (0,60-4,29)
ATA	0,365	1,69 (0,54-5,31)	1,000	0,95 (0,26-3,44)	0,335	0,58 (0,19-1,78)

OŠ, odnos šansi, IP, interval poverenja

4.2.3 Ispitivanje polimorfizma *IL6* (rs1800795) kod kontrola i pacijenata sa CVID

Komercijalni oligonukleotidi i TaqMan PCR metoda korišćeni su i za ispitivanje rs1800795 u promotornom regionu gena za IL-6. Rezultati distribucije alela i genotipova prikazani su u tabeli 18.

Tabela 18. Aleli i genotipovi rs1800795 polimorfizma gena za IL-6 kod kontrola i pacijenata

Gen za citokin (SNP) Aleli/genotipovi	Kontrole	Pacijenti	p	OŠ (95%IP)
<i>IL6</i> (rs1800795)				
G	292 (0,58)	50 (0,71)	0,037†	1,78 (1,03-3,08)
C	208 (0,42)	20 (0,29)	0,037†	0,56 (0,32-0,97)
GG	87 (0,35)	17 (0,48)	0,113	1,77 (0,87-3,61)
GC	118 (0,47)	16 (0,46)	0,862	0,94 (0,46-1,92)
CC	45 (0,18)	2 (0,06)	0,067	0,28 (0,06-1,19)

OŠ, odnos šansi, IP, interval poverenja

Frekvencija glavnog G alela u ovom polimorfizmu *IL6* značajno se razlikovala u grupi pacijenata sa CVID u odnosu na kontrolnu grupu. Pokazano je da alel G 1,78 puta povećava šansu za CVID ($p=0,037$; OŠ=1,78, 95%IP=1,03-3,08). Analizom genotipova, međutim, nije otkrivena statistički značajna razlika između dve ispitivane grupe.

Distribucija alela i genotipova za *IL6* rs1800795 bila je u Hardy-Weinberg ekvilibrijumu, što je prikazano u tabeli 19.

Tabela 19. Testiranje distribucije genotipa rs1800795 polimorfizma gena za IL-6 u odnosu na Hardy-Weinberg ravnotežu.

<i>IL6 (rs1800795)</i>	Kontrole	CVID	Ukupno
Genotipovi			
GG	87	17	104
GC	118	16	134
CC	45	2	47
Ukupno	250	35	285
HWE*	$X^2=0,2$	$X^2=0,5$	$X^2= 0,12$

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

Rezultati raspodele alela u populaciji zdravih osoba iz Srbije upoređeni su sa objavljenim podacima za druge populacione grupe da bi se utvrdilo da li postoje razlike između frekvencija G i C alela rs1800795 polimorfizma gena za IL-6 između kontrola iz Srbije i zdravih osoba iz drugih država. Ovi rezultati su prikazani u tabeli 20.

Tabela 20. rs1800795 polimorfizam gena za IL-6 kod zdravih osoba u različitim populacijama.

Referenca	Populacija	Broj	Metod	G alel(%)	C alel(%)	p
(Perović i sar., u štampi)	Srbija	250	TaqMan	58,4	41,6	NP
(Gonzalez-Gay i sar., 2002)	Španija	124	RFLP	67,3	32,7	0,192
(Fialho i sar., 2009)	Portugalija	117	PCR-SSP	64,1	35,9	0,493
(Uboldi de Capei i sar., 2003)	Italija	140	PCR-SSP	66,0	34,0	0,267
(Ranganath i sar., 2009)	Indija	569	RFLP	95,2	4,8	<0,001
(C. Seifart, 2005)	Nemačka	243	RFLP	59,0	41,0	0,920
(Fishman i sar., 1998)	V. Britanija	383	RFLP	59,7	40,3	0,862
(Guarnizo-Zuccardi i sar., 2007)	Kolumbija	102	PCR-SSP	75,0	25,0	0,013

NP, nije primenjivo

Kao što je prikazano u tabeli 20, postoji statistički visoko značajna razlika u frekvencijama alela rs1800795 polimorfizma gena za IL-6 kod zdravih stanovnika Srbije u odnosu na populaciju Indije i statistički značajna razlika u odnosu na populaciju Kolumbije. Nije ustanovljena značajna razlika u frekvencijama alela između populacije Srbije i populacija Španije, Portugalije, Italije, Velike Britanije i Nemačke.

Urađena je i genotipsko-fenotipska korelacija u cilju ispitivanja postojanja povezanosti između određenog genotipa *IL6* rs1800795 i kliničkih fenotipova COVID. Rezultati navedene korelacije prikazani su u tabelama 21 i 22.

Tabela 21. Aleli i genotipovi rs1800795 polimorfizma gena za IL-6 klasifikovani prema kliničkom fenotipu

Citokin gen (SNP) Aleli/genotipovi	Bronhiektazije		Splenomegalija		Autoimunske bolesti	
	ne	da	ne	da	ne	da
<i>IL6</i> (rs1800795)						
G	34 (0,74)	16 (0,67)	20 (0,62)	30 (0,79)	40 (0,77)	10 (0,56)
C	12 (0,26)	8 (0,33)	12 (0,38)	8 (0,21)	12 (0,23)	8 (0,44)
GG	12 (0,52)	5 (0,42)	5 (0,31)	12 (0,63)	14 (0,54)	3 (0,33)
GC	10 (0,44)	6 (0,50)	10 (0,63)	6 (0,32)	12 (0,46)	4 (0,45)
CC	1 (0,04)	1 (0,08)	1 (0,06)	1 (0,05)	0 (0,00)	2 (0,22)

Tabela 22. Statistička analiza rs1800795 polimorfizma gena za IL-6 klasifikovani prema kliničkom fenotipu

Citokin gen (SNP) Aleli/genotipovi	Bronhiektazije		Splenomegalija		Autoimunske bolesti	
	p	OŠ	p	OŠ	p	OŠ
<i>IL6</i> (rs1800795)						
G	0,522	0,71 (0,24-2,06)	0,129	2,25 (0,78-6,48)	0,084	0,37 (0,12-1,16)
C	0,522	1,42 (0,48-4,15)	0,129	0,44 (0,15-1,28)	0,084	2,67 (0,86-8,27)
GG	0,554	0,65 (0,16-2,68)	0,059	3,77 (0,92-15,44)	0,443	0,43 (0,09-2,09)
GC	0,708	1,30 (0,32-5,27)	0,067	0,28 (0,07-1,12)	1,000	0,93 (0,20-4,29)
CC	1,000	2,00 (0,11-35,09)	1,000	0,83 (0,05-14,48)	0,060	NP

OŠ, odnos šansi uz 95% interval poverenja, NP, nije primenjivo

Kao što je prikazano u tabeli 22, nema statistički značajne razlike između poređenih grupa. Na osnovu vrednosti OŠ, C alel bi predstavljao faktor većeg rizika za javljanje autoimunskih bolesti (OŠ=2,67 pri 95%IP 0,86-8,27, p=0,084), dok G alel i GG fenotip uvećavaju šansu za razvoj splenomegalije (OŠ=2,25 pri 95%IP 0,78-6,48; p=0,129 i OŠ=3,77 pri 95%IP 0,92-15,44; p=0,059; retrospektivno) ali ni jedna od ovih razlika nije dostigla nivo statističke značajnosti.

4.2.4 Ispitivanje polimorfizma *IFNG* (rs2430561) kod pacijenata sa COVID

Detekcija +874 (T/A) polimorfizma u prvom intronu gena za IFN-gama vršena je pomoću oligonukleotidnih prajmera i proba dizajniranih Primer Express 2.0 programom. Optimizovanje uslova za amplifikaciju real-time PCR-om i razlikovanje alela, prethodno je urađeno i detaljno opisano u literaturi (Popadic i sar., 2012). Analiza je urađena kod svih pacijenata sa COVID, dok su rezultati za kontrolnu grupu preuzeti iz prethodno urađenog istraživanja (Popadic, 2014). Dobijeni rezultati analizirani su i predstavljeni u tabeli 23, odakle se može videti da nije nađena statistički značajna razlika u distribuciji alela i genotipova ovog polimorfizma između pacijenata sa COVID i kontrolne grupe.

Tabela 23. Aleli i genotipovi rs2430561 polimorfizma *IFNG* kod kontrola i pacijenata

Gen za citokin (SNP) Aleli/genotipovi	Kontrole	Pacijenti	p	OŠ (95%IP)
<i>IFNG (rs2430561)</i>				
A	276 (0,53)	34 (0,49)	0,458	0,83 (0,50-1,36)
T	242 (0,47)	36 (0,51)	0,458	1,21 (0,73-1,99)
AA	74 (0,29)	8 (0,23)	0,479	0,74 (0,32-1,70)
AT	128 (0,49)	18 (0,51)	0,823	1,08 (0,53-2,20)
TT	57 (0,22)	9 (0,26)	0,624	1.23 (0.54-2.77)

OŠ odnos šansi, IP interval poverenja

U tabeli 24. je prikazano da se dobijeni rezultati učestalosti alela i genotipova nalaze se u Hardy-Weinberg ravnoteži.

Tabela 24. Testiranje distribucije genotipa rs2430561 polimorfizma gena *IFNG* u odnosu na Hardy-Weinberg ravnotežu

<i>IFNG (rs2430561)</i>	Kontrole	COVID	Ukupno
AA	74	8	82
Genotipovi	AT	18	146
	TT	9	66
Ukupno	259	35	294
HWE*	$X^2=0,01$	$X^2=0,03$	$X^2=0,004$

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

Dalje, ispitano je da li se distribucije alela, genotipova i nosioca A i T alela rs2430561 polimorfizma gena za IFN-gama razlikuju između pacijenata sa različitim kliničkim fenotipom. Rezultati su prikazani u tabelama 25 i 26.

Tabela 25. Aleli i genotipovi rs2430561 polimorfizma gena za IFN-gama klasifikovani prema kliničkom fenotipu

Citokin gen (SNP) Aleli/genotipovi	Bronhiektazije		Splenomegalija		Autoimunske bolesti	
	ne	da	ne	da	ne	da
<i>IFNG</i> (rs2430561)						
A	24 (0,52)	10 (0,42)	20 (0,62)	14 (0,37)	24 (0,46)	10 (0,56)
T	22 (0,48)	14 (0,58)	12 (0,38)	24 (0,63)	28 (0,54)	8 (0,44)
AA	6 (0,26)	2 (0,17)	7 (0,44)	1 (0,05)	6 (0,23)	2 (0,22)
AT	12 (0,52)	6 (0,50)	6 (0,37)	12 (0,63)	12 (0,46)	6 (0,67)
TT	5 (0,22)	4 (0,33)	3 (0,19)	6 (0,32)	8 (0,31)	1 (0,11)

Tabela 26. Statistička analiza distribucije alela i genotipova *IFNG* (rs2430561) prema kliničkom fenotipu

Citokin gen (SNP) Aleli/genotipovi	Bronhiektazije		Splenomegalija		Autoimunske bolesti	
	p	OŠ	p	OŠ	p	OŠ
<i>IFNG</i> (rs2430561)						
A	0,403	0,65 (0,24-1,77)	0,032†	0,35 (0,13-0,93)	0,493	1,46 (0,50-4,28)
T	0,403	1,52 (0,56-4,14)	0,032†	2,86 (1,08-7,56)	0,493	0,68 (0,23-2,01)
AA	0,685	0,57 (0,10-3,36)	0,013†	0,07 (0,01-0,67)	1,000	0,95 (0,15-5,86)
AT	0,920	0,92 (0,23-3,70)	0,130	2,86 (0,72-11,31)	0,443	2,33 (0,48-11,40)
TT	0,685	1,80 (0,38-8,53)	0,460	2,00 (0,41-9,76)	0,390	0,28 (0,03-2,64)

OŠ, odnos šansi uz 95% interval poverenja, † p<0,05

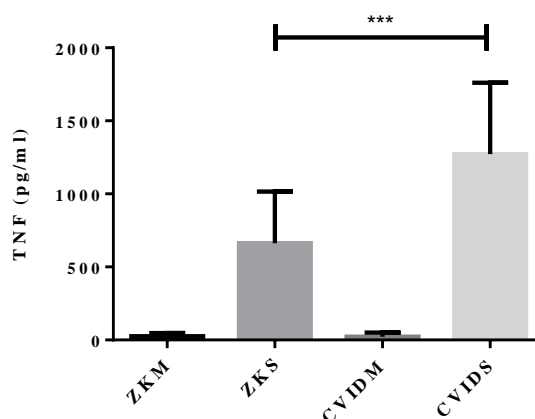
Analizom distribucije alela i genotipova *IFNG* (rs2430561) polimorfizma prema kliničkim fenotipovima nađena je asocijacija između T alela i povećanog rizika za razvoj splenomegalije kod pacijenata sa COVID. Pokazano je da T alel nosi skoro tri puta veći rizik za razvoj ove česte komplikacije bolesti (p=0,032, OŠ=2,86, 95%IP=1,08-7,56). Isto tako, pacijenti sa AA genotipom imaju manju šansu da razviju splenomegaliju, i ta razlika je, kao i razlika u distribuciji alela, statistički značajna (p=0,013, OŠ= 0,07, 95%IP 0,01-0,67). Prema vrednostima OŠ za AT od 2,86 (95%IP=0,72-11,31) i 2,00 za TT (95%IP=0,41-9,76), oba genotipa takođe mogu biti faktor rizika za razvoj splenomegalije, ali razlika nije dostigla statističku značajnost.

Nije nađena razlika u distribuciji alela i genotipova *IFNG* (rs2430561) i javljanja autoimunskih bolesti ili razvoja bronhiektazija.

4.3 Rezultati merenja koncentracija TNF, IL-10, IL-6 i IFN-gama i korelacija sa odgovarajućim genotipom

Ispitivanje produkcije citokina TNF, IL-6, IL-10 i IFN-gama u supernatantu nakon stimulacije mononuklearnih ćelija periferne krvi sa PMA i jonomicinom urađeno je na uzorku od 35 CVID pacijenata i 35 zdravih osoba koje su činile kontrolnu grupu. Dobijena je statistički značajna razlika u produkciji TNF i IL-6 između grupe pacijenata sa CVID i zdravih kontrola, dok za IL-10 i IFN-gama razlike u produkciji citokina nisu dostigle statističku značajnost.

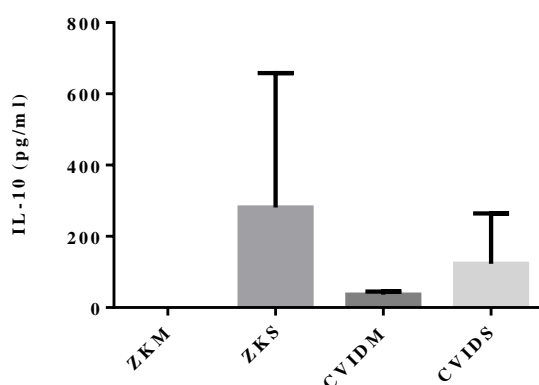
Rezultati su prikazani grafički po grupama, kao medijana sa interkvartilnim opsegom, na slikama 2 do 5.



ZKM, zdrave kontrole medijum; ZKS, zdrave kontrole stimulacija; CVIDM, CVID pacijenti medijum; CVIDS, CVID pacijenti stimulacija; *** $p < 0,001$

Slika 2. Produkcija TNF kod zdravih osoba iz kontrolne grupe i kod pacijenata sa CVID mereni u kontroli (medijum) i nakon stimulacije

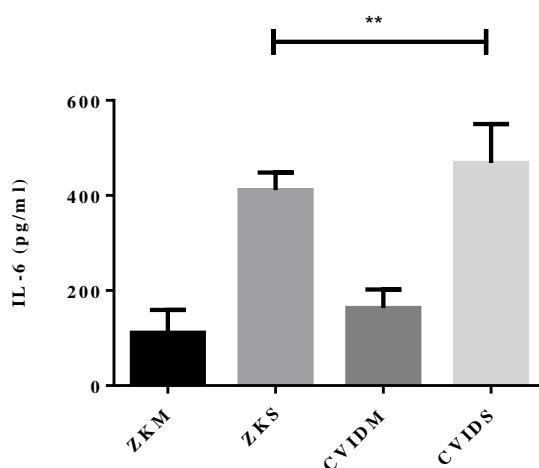
Merenjem TNF citokina kod zdravih osoba nakon stimulacije dobijene su vrednosti sa medijanom od 663 pg/ml i interkvartilnim opsegom od 348 pg/ml do 1016 pg/ml, dok su iste vrednosti u grupi CVID pacijenata iznosile: 1273 (685-1760) pg/ml. Razlika je bila visoko statistički značajna ($p=0,0006$). Prikazani rezultati govore u prilog tome da CVID pacijenti produkuju značajno više nivoa TNF nakon stimulacije PMBC u odnosu na zdrave osobe.



ZKM, zdrave kontrole medijum; ZKS, zdrave kontrole stimulacija; CVIDM, CVID pacijenti medijum; CVIDS, CVID pacijenti stimulacija

Slika 3. Koncentracija IL-10 kod zdravih osoba iz kontrolne grupe i kod pacijenata sa CVID mereni u kontroli (medijum) i nakon stimulacije

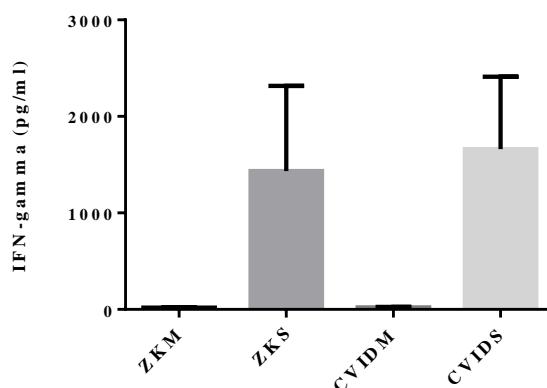
Na slici 3. možemo videti da je produkcija IL-10 nakon stimulacije niža kod pacijenata sa CVID nego kod zdravih kontrola. Međutim, razlika nije dostigla statističku značajnost ($p=0,0765$) a vrednosti medijane sa interkvartilnim opsegom u grupi zdravih kontrola i CVID pacijenata su iznosile: 281 (72-658) pg/ml i 123 (53-264) pg/ml, respektivno.



ZKM, zdrave kontrole medijum; ZKS, zdrave kontrole stimulacija; CVIDM, CVID pacijenti medijum; CVIDS, CVID pacijenti stimulacija; ** $p<0,01$

Slika 4. Produkcija IL-6 kod zdravih osoba iz kontrolne grupe i kod pacijenata sa CVID mereni u kontroli (medijum) i nakon stimulacije

Poređenjem rezultata nivoa produkcije IL-6 između osoba u kontrolnoj grupi i CVID pacijenata dobijena je statistički visoko značajna razlika ($p=0,0038$) koja ukazuje na to da CVID pacijenti nakon stimulacije PBMC proizvode značajno više ovog citokina. Vrednosti medijane i interkvartilnog opsega u grupi zdravih osoba bile su 411 (293-448) pg/ml, dok su za grupu CVID pacijenata iznosile 468 (398-550) pg/ml.



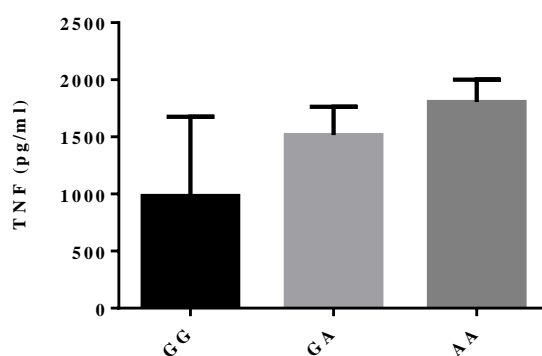
ZKM, zdrave kontrole medijum; ZKS, zdrave kontrole stimulacija; CVIDM, CVID pacijenti medijum; CVIDS, CVID pacijenti stimulacija

Slika 5. Produkcija IFN-gama kod zdravih osoba iz kontrolne grupe i kod pacijenata sa CVID mereni u kontroli (medijum) i nakon stimulacije

Produkcija IFN-gama nije se značajno razlikovala kada smo uporedili dve grupe, iako su kod CVID pacijenata registrovane nešto više vrednosti ovog citokina ($p=0,4925$). U grupi zdravih osoba medijana koncentracije je iznosila 1434 pg/ml sa interkvartilnim opsegom od 757 pg/ml do 2317 pg/ml, dok su u grupi CVID pacijenata vrednosti bile 1660 (987-2412) pg/ml.

Rezultati korelacije genotipa ispitivanih polimorfizama u genima *TNF*, *IL10*, *IL6* i *IFNG* sa produkcijom odgovarajućeg citokina prikazani su na slikama 6 do 9. Analiza rezultata nije dala statističku značajnost ni u jednoj ispitivanoj stavci.

Na slici 6. prikazani su genotipovi *TNF* rs1800629 u korelaciji sa produkcijom TNF nakon stimulacije. Može se uočiti da ređi genotipovi koji sadrže A alel (AA i GA) daju više izmerenog citokina u odnosu na češći genotip GG. Međutim, razlika nije dostigla statističku značajnost ($p=0,235$).

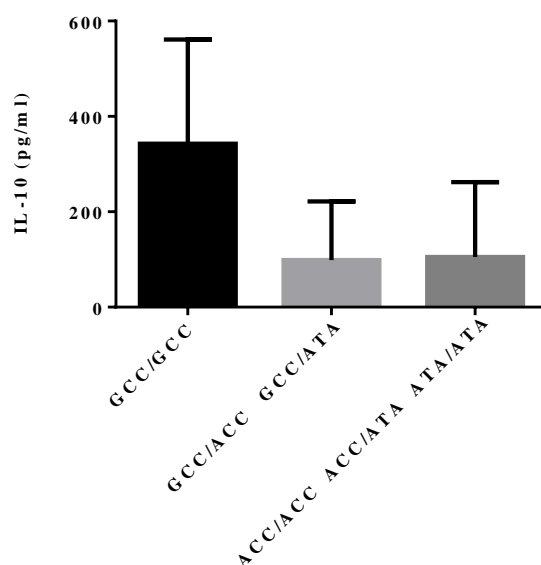


Slika 6. Nivoi TNF nakon stimulacije kod CVID pacijenata u odnosu na različite genotipove polimorfizma *TNF* gena rs1800629

Kod pacijenata sa genotipom GG (n=20) registrovana je vrednost medijane od 981,5 pg/ml uz interkvartilni opseg od 653,5 pg/ml do 1676 pg/ml, dok su kod pacijenata sa genotipom GA (n=13) i AA (n=2) zabeležene sledeće vrednosti: 1515 (849,5 -1765) pg/ml i 1805 (1608-2002) pg/ml, respektivno.

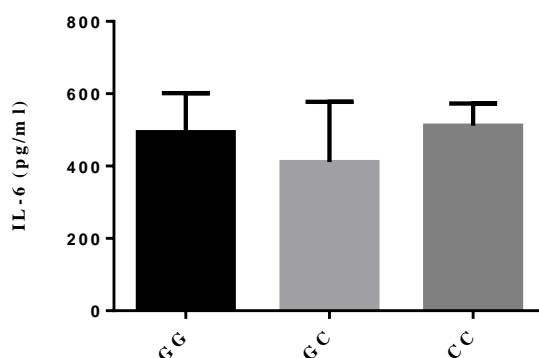
Kada je reč o polimorfizmima u genu za IL-10, uradili smo analizu udruženih haplotipova izvedenih iz tri ispitivana polimorfizma: rs1800896, rs1800871 i rs1800872, i shodno prethodnim ispitivanjima (Turner i sar., 1997) podelili smo dobijene diplotipove u tri podgrupe: visoke, srednje i niske produkcije. Diplotip koji je činio podgrupu pretpostavljene visoke produkcije bio je GCC/GCC (koji je imalo 6 pacijenata sa CVID), očekivanu srednju produkciju su obuhvatili diplotipovi GCC/ACC i GCC/ATA (16 pacijenata), dok su podgrupu očekivane niske produkcije činili pacijenti sa diplotipovima ATA/ATA, ATA/ACC i ACC/ACC (13 pacijenata).

Na slici 7. su grafički prikazani rezultati korelacije opisanih diplotipova polimorfizama u promotoru *IL10* gena povezanih sa visokom, srednjom i niskom produkcijom samog citokina i naših izmerenih vrednosti IL-10 u supernatantu nakon stimulacije PBMC kod CVID pacijenata.



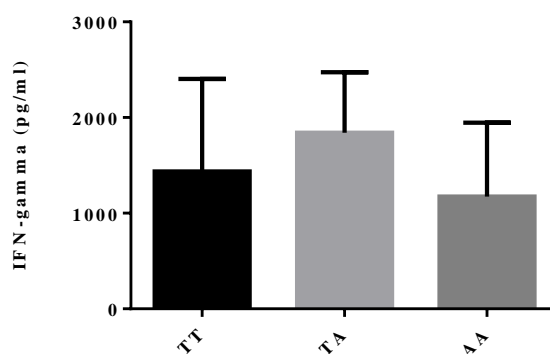
Slika 7. Produkcija IL-10 nakon stimulacije u korelaciji sa različitim diplotipovima polimorfizama u promotoru gena za IL-10

Analizom prikazanih rezultata može se uočiti su naši rezultati donekle u korelaciji sa prethodno objavljenim i da su diplotipovi povezani sa visokom produkcijom IL-10 dali najviše rezultate ovog citokina (medijana 342,5 pg/ml sa interkvartilnim opsegom od 128,5 pg/ml do 561,3 pg/ml). Međutim, podgrupe sa srednjom i niskom produkcijom dale su slične rezultate nivoa IL-10 koje su nešto više u grupi očekivane niske produkcije: 98,5 (31,5-221,5) pg/ml i 105,0 (64,0-262) pg/ml, respektivno. Štaviše, poređenjem između različitih podgrupa nije dobijena statistički značajna razlika ($p=0,1546$).



Slika 8. Produkcija IL-6 nakon stimulacije kod CVID pacijenata u odnosu na različite genotipove polimorfizma *IL6* gena rs1800795

Poređenjem koncentracije IL-6 u supernatantima kultura donora sa različitim genotipovima polimorfizma rs1800795 u *IL6* genu nije utvrđena bitna razlika u produkciji citokina u odnosu na genotip, i to se može videti na slici 7. Koncentracije IL-6, shodno prethodno opisanim vrednostima za druge citokine izražene kao medijana sa interkvantilnim opsegom bile su: 496 (442,5-567,5) pg/ml kod pacijenata sa CVID koji su imali genotip GG (njih 17), zatim 410,0 (305,8-523,0) pg/ml kod pacijenata sa genotipom GC (njih 16), i 511,5 (468,0-555,0) pg/ml kod 2 pacijenta koji su imali genotip CC. Poređenjem rezultata među grupama nije dobijena statistička značajnost ($p=0,1338$).



Slika 9. Produkcija IFN-gama nakon stimulacije kod CVID pacijenata u odnosu na različite genotipove polimorfizma *IFNG* gena rs2430561

Konačno, stratifikovanje rezultata koncentracija IFN-gama izmerenih nakon stimulacije kod pacijenata sa CVID prema određenom genotipu rs2430561 polimorfizma nije dalo statistički značajnu razliku između poređenih grupa. Rezultati su prikazani grafički na slici 9.

Genotip TT koji je imalo 9 pacijenata sa CVID u našim rezultatima korelisao je sa srednjom produkcijom IFN-gama: 1435 (1151-2404) pg/ml, TA genotip, registrovan kod 18 pacijenata, sa najvišom: 1842 (1066-2472) pg/ml, a AA genotip koji je imalo 8 pacijenata korelisao je sa najnižom produkcijom ispitivanog citokina: 1173 (240,5-1947) pg/ml. Poređenjem rezultata među grupama nije dobijena statistička značajnost, $p=0,2673$.

5 DISKUSIJA

Od trenutka kada je prvi put opisana u literaturi 1954. godine, česta varijabilna imunodeficijencija predstavlja izazov i za kliničare i za istraživače. Od komplikovanog naziva koji sam zahteva dodatna objašnjenja, jer termini poput „česta“ i „varijabilna“ koji su u srpskom jeziku prevedeni i kao „obična“ i „promenljiva“, mogu različito da se tumače ili pogrešno shvate, preko složene definicije i zahtevnih dijagnostičkih kriterijuma, sve do obilja različitih kliničkih manifestacija i registrovanih imunoloških poremećaja. Napredak u istraživanju ove bolesti je vidljiv, ali ne toliko brz i jasan koliko se očekivalo. U poslednje dve decenije postignut je veliki progres u razumevanju molekularne osnove teške kombinovane imunodeficijencije (SCID), kao i osetljivosti prema mikobakterijama koja se nasleđuje po mendelskim pravilima. Preko 90% ranih pre-B-ćelijskih defekata koji dovode do imunodeficijencije dobilo je svoju genetsku dijagnozu. Slično je i sa hiper-IgM sindromom za koji je u 70% do 80% poznata uzročna mutacija (Jolles, 2013). Međutim, najčešća klinički značajna primarna imunodeficijencija, ostala je najmanje razjašnjena u toj grupi. Vreme do postavljanja dijagnoze je skraćeno, a supstitucionna terapija imunoglobulinima je poboljšala kvalitet života ovih bolesnika i produžila njihov životni vek. Ipak, primenjena terapija nije se pokazala u potpunosti delotvornom kod čestih komplikacija poput autoimunskih bolesti, enteropatije, maligniteta, pa čak ni hronične plućne bolesti, koja je i dalje visoko na listi uzroka smrti CVID pacijenata.

Brojna istraživanja su objavljena na temu pronalaženja kliničkih i laboratorijskih biomarkera koji bi pomogli boljem definisanju i podeli heterogenih imunoloških poremećaja koji čine CVID. Od molekularno genetičkih studija se, međutim, najviše očekuje, jer bi one povezale kliničke i laboratorijske nalaze sa promenama određenog gena i time definitivno razdvojile poremećaje sa sličnim kliničko-laboratorijskim promenama prema mutacijama u istom genu ili u različitim genima. CVID tada više ne bi bila *per exclusionem* dijagnoza. Indikacije za primenu skupe supstitucione terapije imunoglobulinima bile bi jasne, a otvorio bi se i put za primenu i pronalaženje specifične, individualizovane terapije.

Mali procenat monogenskih poremećaja koji je otkriven kod pacijenata sa CVID fenotipom već je izdvojen iz ove dijagnostičke kategorije (Picard i sar., 2015). Većina opisanih uzročnih mutacija u tim poremećajima se javlja familijarno, a neke od njih su

opisane samo kod jedne ili tek nekoliko porodica. Zanimljivo je da su prve uzročne mutacije, poput onih u *ICOS* genu, otkrivene pristupom kandidat gena što je rezultovalo predominacijom autozomno recesivnih mutacija, iako model nasleđivanja u familijarnim oblicima CVID više odgovara autozomno dominantnom. Međutim, može se uočiti da se poslednjih godina sve više opisuju autozomno dominantne uzročne mutacije. To se može objasniti napretkom novih molekularno-genetičkih tehnologija, kao što je NGS, koje su ubrzale otkriće kako autozomno recesivnih tako i autozomno dominantnih gena odgovornih za razvoj poremećaja sa CVID fenotipom. Postalo je jasno da je CVID na neki način „kišobran“ dijagnoza, pri čemu se broj izdvojenih identifikovanih monogenских poremećaja značajno povećao tokom poslednjih godina. Ipak, taj trend nije ispunio očekivanja istraživača na ovom polju. Stoga se i zvanični stav o genetskoj osnovi CVID vraća na prethodne tvrdnje da se ova bolest nasleđuje pre kompleksno nego na mendelski način. Varijabilnost u vremenskom ispoljavanju bolesti ukazuje na verovatni aditivni uticaj više gena, moguće u kombinaciji sa sredinskim faktorima. Osim toga, vrlo je verovatno da postoje i tzv. geni koji modifikuju bolest, koncept koji nije nov u humanoј genetici, ali je u poslednjoj deceniji aktuelizovan, bilo da je reč o monogenским ili poligenским bolestima (Genin i sar., 2008).

Na osnovu svega iznetog u ovoj doktorskoј disertaciji, polimorfizmi u genima za citokine čine se kao dobri geni kandidati koji bi bar delom mogli objasniti patogenetsku osnovu ako ne same bolesti onda njenih pojedinačnih kliničkih manifestacija i/ili komplikacija, kao i velike varijabilnosti u početku i toku.

Naša studija predstavlja studiju preseka u koju je uključeno 35 pacijenata sa CVID i 250 zdravih kontrola, u kojoj je analizirana asocijacija odabranih SNP u genima za citokine: *TNF*, *IL10*, *IL6* i *IFNG* sa ispoljavanjem CVID i njenih kliničkih manifestacija. Gledano iz genetičko epidemiološkog ugla, veličina uzorka za ispitanike je relativno mala da bi ova studija asocijacije imala veliku statističku moć. Međutim, radi se o retkoј bolesti čija tačna prevalencija na našim prostorima nije procenjena. Zapravo, tačne incidencije i prevalencije CVID nisu poznate ni u jednom regionu sveta. Većina procena se zasniva na broju dijagnostikovanih ili registrovanih slučajeva, uz pretpostavku da je značajan broj pacijenata neprepoznat i/ili neregistrovan. Prema skorašnjem izveštaju ESID izračunata prevalencija CVID u Evropskim zemljama kreće

se od 0.07 (Poljska) do 0.98 (Francuska) na 100.000 stanovnika (Gathmann i sar., 2012). Smatra se da je ovako velika razlika u incidenciji unutar evropskih zemalja pre svega posledica toga što je značajan broj pacijenata neprijavljen u onim zemljama sa niskom prevalencijom. U svakom slučaju, s obzirom na broj stanovnika u Srbiji (<http://popis2011.stat.rs/>) i prema procenama ESID, u našoj zemlji bi broj dijagnostikovanih CVID pacijenata iznosio od 5 do 70. Naš uzorak od 35 ispitanika time se čini kao reprezentativan adultni populacijski uzorak CVID pacijenata u Srbiji, regrutovan tokom višemesečnog vremenskog perioda, iz jedne zdravstvene ustanove: Klinike za alergologiju i imunologiju Kliničkog centra Srbije.

Podela na kliničke fenotipove je za potrebe ovog istraživanja učinjena prema smernicama Chapel i saradnika (Chapel i sar., 2008; Chapel i sar., 2012) ali uz neophodne izmene. S obzirom na ograničen broj ispitanika, fenotipovi koji su korišćeni za korelaciju sa genotipom određeni su prema učestalosti i mogućnosti jasnog definisanja. Tako su određena tri različita fenotipa za korelaciju: 1. **bronhiektazije**, s obzirom da se radi o strukturnim promena koje su definisane CT pregledom grudnog koša i/ili bronhoskopijom, i to kod približno trećine pacijenata; 2. **splenomegalija**, koja je bila prisutna u više od polovine ispitanika, a registrovana je ultrasonografskim pregledom abdomena i 3. **autoimunske bolesti**, koje su takođe bile zastupljene u značajnom broju pacijenata, a dijagnostikovane su standardnim kliničkim i laboratorijskim testovima.

Imajući u vidu poznate činjenice iz etiopatogeneze CVID, kao i rezultate drugih studija, fokusirali smo se na ispitivanje polimorfizama u genima za citokine koji su uključeni u terminalnu diferencijaciju B-ćelija, koji su eksprimirani u germinativnim centrima limfnih čvorova i imaju ulogu u promeni klase imunoglobulina.

TNF je važan inflamatorni i imunoregulatorni citokin za koji je pokazano da se pojačano stvara kod pacijenata sa CVID, posebno u podgrupi sa granulomatoznim komplikacijama, splenomegalijom i/ili limfopenijom (Aukrust i sar., 1996). S obzirom na pretpostavljenu ulogu u patogenezi poremećaja, i na činjenicu da je gen za TNF lociran unutar MHC III lokusa koji je u prethodnim studijama već povezan sa sklonošću ka CVID, polimorfizmi u ovom genu su bili među prvim ispitivanim kod CVID pacijenata. *TNF* -308 G/A polimorfizam na poziciji nukleotida -308 u promotoru gena za TNF čine dve alelske forme od kojih je jedna guanin i definiše češći alel označen kao

TNF1, dok je u drugoj formi, TNF2, guanin supstituisan sa alaninom, koji je ređi alel (Wilson i sar., 1992). Postoje dokazi da je TNF2 povezan sa pojačanim lučenjem faktora nekroze tumora, spontano ili nakon stimulacije, tako što G→A supstitucija utiče na transkripcionu aktivnost promotora *TNF* (Wilson i sar., 1997). Mullighan je sa saradnicima 1997. godine prvi objavio asocijaciju *TNF* -308 A alela sa sklonošću ka CVID, i obrnuto, negativnu korelaciju sa TNF1, u kohorti od 150 pacijenata i 200 zdravih kontrola regrutovanih iz više centara u V. Britaniji. Autori su takođe pronašli vezu između *TNF* +488 A alela i razvoja granulomatozne forme CVID (Mullighan i sar., 1997). Rezaei je sa saradnicima reprodukovao asocijaciju *TNF* -308 A alela sa CVID. U grupi od 30 pacijenata, u poređenju sa 140 zdravih osoba, nađena je značajno veća učestalost ređeg A alela, i obrnuto, značajno viša frekvencija G alela kod zdravih osoba iz kontrolne grupe. Takođe, GA genotip je bio značajno češći u grupi pacijenata, GG genotip u kontrolnoj grupi, dok je homozigotni AA genotip registrovan samo kod jedne osobe, i to obolele od CVID. Nije međutim, nađena veza sa granulomatoznom formom bolesti, s obzirom da u vreme studije nijedan pacijent nije imao dokumentovane granulome (Rezaei i sar., 2009).

Naši rezultati, kada je reč o *TNF* -308 G/A polimorfizmu, u skladu su sa rezultatima pomenutih studija u V. Britaniji i Iranu. *TNF* -308 A je imao statistički značajno višu frekvenciju među pacijentima, kao i homozigotni genotip sa tim alelom, što govori u prilog tome da su ređi A alel, kao i AA genotip, faktori rizika za CVID. U isto vreme, G alel i GG genotip su bili značajno češći u grupi zdravih kontrola, što bi se moglo protumačiti da u odnosu na razvoj CVID imaju protektivnu ulogu.

Korelacijom učestalosti alela i genotipova sa određenim kliničkim fenotipom nije dobijena statistički značajna razlika. Međutim, uočeno je da je A alel češći kod pacijenata sa splenomegalijom, kao i GA genotip, dok je redak AA genotip nađen kod jednog pacijenta sa splenomegalijom. S obzirom da su od 35 pacijenata uključenih u ovo istraživanje samo 2 imali dokumentovane granulome taj klinički fenotip nije korišćen za genotipsko-fenotipsku korelaciju.

Uloga *TNF* u formiranju granuloma je potvrđena u više studija, kao i uloga u borbi protiv infekcije mikobakterijama (Roach i sar., 2002). Međutim, granulomatozna forma CVID koja se javlja u približno 15% pacijenata, teže se dijagnostikuje jer je često klinički nema, a zahteva invazivne dijagnostičke procedure poput biopsije tkiva radi

potvrđivanja dijagnoze. Stoga, u malim kohortama poput naše ili Rezai i sar. ovaj fenotip nije dovoljno zastupljen za korelaciju sa genotipom. Međutim, splenomegalija je često udružena sa granulomima, kao i sa povišenom koncentracijom TNF, stoga i trend pozitivne korelacije splenomegalije, u našim rezultatima, sa A alelom i GA genotipom, (koji su povezani sa pojačanim lučenjem ovog citokina), mogu biti od značaja. Da bi se ta korelacija potvrdila ili isključila potrebno je analizu uraditi na većem broju ispitanika ili meta-analizu rezultata postojećih studija.

Ispitivanjem produkcije TNF u supernatantu nakon stimulacije PBMC kod 35 pacijenata sa CVID, i isto toliko zdravih kontrola, nađena je visoko statistički značajna razlika u produkciji ovog citokina. Naši rezultati govore u prilog pojačanoj produkciji TNF kod CVID pacijenata, što je u skladu sa rezultatima iz većine studija koje su ispitivale slične parametre (Aukrust i sar., 1996; Isgro i sar., 2005; Trujillo i sar., 2011). Kada smo uradili korelaciju odgovarajućeg genotipa i produkcije citokina kod pacijenata, nismo našli statističku značajnu razliku u produkciji TNF prema određenom genotipu. Međutim, u rezultatima se vidi jasan trend porasta u produkciji TNF kod nosioca A alela. Shodno tome, pacijenti sa GG genotipom imali su najniže vrednosti, GA genotip je dao srednje vrednosti, dok su kod osoba sa AA genotipom izmerene najviše koncentracije TNF. Da bi se taj trend potvrdio ili isključio, potrebno je analizu uraditi na većem broju ispitanika. U svakom slučaju, rezultati korelacije genotipa sa produkcijom TNF u skladu su sa prethodno objavljenim istraživanjem o korelaciji A alela sa višom produkcijom tog citokina (Wilson i sar., 1997), mada postoje i studije koje nisu uspele da dokažu funkcionalnost ovog polimorfizma (Huizinga i sar., 1997; Kubota i sar., 1998).

S obzirom da su objavljene studije o uspehu u lečenju granulomatoznih komplikacija kod CVID pacijenata sa anti-TNF lekovima (influximab) (Thatayatikom i sar., 2005; Franxman i sar., 2014) određivanje genotipa koji produkuje veće količine ovog citokina moglo bi biti od kliničkog značaja. Posebno u svetlu oprezne primene influximaba i sličnih lekova kod CVID pacijenta s obzirom na njihovo osnovno stanje imunodeficijencije i sklonosti ka infekcijama (posebno mikobakterijama u slučaju supresije lučenja TNF). Utvrđivanje “visoko-produktivnog” genotipa olakšalo bi primenu takvih lekova uz manju bojazan od infektivnih komplikacija.

U ovoj studiji su prvi put određeni aleli i genotpovi za *TNF* -308 G/A polimorfizam kod pacijenata sa COVID u Srbiji. Međutim, analiza ovog polimorfizma u populaciji zdravih osoba u našoj zemlji prethodno je urađena (Popadić i sar., 2015). Prema podacima iz pomenutog istraživanja, koji su korišćeni u našoj studiji, frekvencije G i A alela rs1800629 polimorfizma gena za *TNF* u zdravoj populaciji Srbije ne razlikuju se statistički značajno u odnosu na populacije: Velike Britanije, Nemačke, Italije, Estonije, Poljske, Hrvatske, južne Indije i Španije. Statistički visoko značajna razlika ustanovljena je između zdrave populacije Srbije i populacija Japana, Egipta, severne Indije i Koreje.

Zanimljivo je da su prve genetičke studije na uzorku sa COVID i IgAD pacijentima našle asocijaciju sa genima iz HLA lokusa, a to je potvrđeno i u novijim GWAS. Humani MHC region predstavlja lokus u kome se nalazi najveći broj do sada opisanih gena koji utiču na sklonost ka razvoju imunski posredovanih ili autoimunskih bolesti. Međutim, velike alelske varijacije kao i postojanje značajne neravnoteže vezanosti (LD), zajedno sa ograničenim brojem MHC gena koji su ispitivani u većini studija asocijacije objavljenih do danas, otežavaju preciznu lokalizaciju i nedvosmisleno identifikaciju gena odgovornih za sklonost ka određenoj bolesti (International i sar., 2009). U isto vreme, *TNF* je jedan od najviše ispitivanih gena u autoimunskim bolestima, stoga rezultati analize *TNF* polimorfizama mogu biti interpretirani postojanjem LD sa HLA lokusima i *vice versa*. Za neke autoimunske bolesti objavljene su studije koje su pokušale da razgraniče uticaj gena iz HLA lokusa od uticaja *TNF* polimorfizama na ispoljavanje bolesti. Tako je za sistemski eritemski lupus (SLE) nađena asocijacija sa *TNF* -308 A alelom koja je nezavisna od asocijacije sa bilo kojim od gena iz HLA lokusa (Sullivan i sar., 1997). U drugoj skorašnjoj studiji, asocijacija *TNF* -308 A sa dijabetes melitusom tip 1, potvrđena u brojnim prethodnim studijama, objašnjena je LD sa HLA-DRB1 i HLA-DQB1 alelima. Autori su posebnom statističkom analizom (postepenom regresionom analizom) pokazali da su u njihovoj populaciji (Brazil) HLA haplotipovi nezavisno zadržali asocijaciju sa ispoljavanjem bolesti, dok rs1800629 polimorfizam nije (Patente i sar., 2015). Međutim, pretragom podataka u Medline bazi nismo pronašli rad u kojem je ispitan i razgraničen pojedinačan uticaj *TNF* -308 A i određenih gena HLA lokusa sa sklonošću ka COVID.

Volanakis i saradnici su početkom devedestih godina prošlog veka pronašli asocijaciju između sklonosti ka IgAD i CVID i gena MHC III regiona, pri čemu su izdvojili region između *C4B* i *C2* gena (Volanakis i sar., 1992). Iste godine Olerup i saradnici su objavili vezu između obe navedene imunodeficijencije i HLA regiona II klase, pretpostavljajući da su aleli iz *DQB1* lokusa geni kandidati (Olerup i sar., 1992). U prvoj GWAS studiji na uzorku sa CVID pacijentima takođe je nađena jaka asocijacija sa MHC lokusom, posebno sa SNP označenim kao rs3117426 (Orange i sar., 2011), dok su u drugoj velikoj studiji asocijacije korišćenjem specijalno dizajniranog SNP čipa za imunološke poremećaje Li i saradnici našli jaku asocijaciju između CVID i rs1049225 u 3' regionu koji se ne prepisuje (*engl.* untranslated region, UTR) lokusa *HLA-DQB1*. Daljom statističkom obradom utvrđeno je da su *HLA-DQB1* 02:01 i 05:03 aleli koji nose rizik, a *HLA-DQB1* 06:02 i *DQB1* 06:03 protektivni aleli (Li i sar., 2015). Mullighan i sar. su 1997. godine takođe ispitivali asocijaciju gena I i II klase HLA na istom uzorku u kojem je nađena asocijacija *TNF* -308 G/A sa CVID, kao i *TNF* +488 G/A sa granulomatoznom formom bolesti. Zanimljivo je da su i oni našli pozitivnu asocijaciju CVID sa *HLA-DQB1* 02:01 a negativnu sa *HLA-DQB1* 06:02 (Mullighan i sar., 1997). Međutim, nisu mogli da razdvoje šta je primarno u asocijaciji sa CVID. Orange i saradnici, kao ni Li i saradnici, u GWAS nisu prijavili vezanost bilo kog SNP u *TNF* genu sa ispoljavanjem CVID fenotipa. To bi govorilo u prilog tome da je primarna asocijacija CVID i određenih HLA alela, i da je moguće da su naši rezultati takođe posledica LD sa tim alelima, s obzirom da HLA genotipizacija nije rađena kod naših pacijenata. Ipak, to što GWAS nisu detektovale povezanost *TNF* sa sklonošću ka razvoju CVID svakako ne isključuje vezanost jer i GWAS imaju svoja ograničenja. Nekad je u pitanju veličina uzorka koja za GWAS mora biti mnogo veća nego kad je u pitanju analiza pojedinačnih SNP, nekad postoje bitne razlike u distribuciji genotipova među populacijama različitog etničkog porekla ili geografski udaljenih regiona (to je posebno tačno za gene HLA lokusa), ili problem može biti što ova tehnologija ne detektuje tzv. retke varijante i druge frakcije heritabilnosti kompleksnih bolesti (Cardon i Bell, 2001). Studije gena kandidata, sa prisutnim predznanjem o potencijalnoj ulozi tog gena u patogenezi bolesti, ipak imaju prednost nad "slepim" pristupom GWAS, kada se zna koliko je težak put od proste statističke asocijacije do otkrića funkcionalne osnove uočene veze genomskog intervala i jedne kompleksne bolesti, kakva je sigurno

CVID. U prilog tome da TNF polimorfizmi ipak imaju nezavisnu ulogu u patogenezi CVID govori i novija studija sa CVID pacijentima iz francuske DEFI grupe u kojoj je reprodukovana asocijacija *TNF* +488 A alela sa granulomatoznom formom CVID (Boutboul i sar., 2016). Smatra se da ovaj polimorfizam, koji nije u promotoru gena poput *TNF* -308 G/A već se nalazi u intronu, nije u LD sa genima iz HLA lokusa koji su povezani sa CVID.

U svakom slučaju, na osnovu naših rezultata i pregledom literature, može se zaključiti da *TNF* -308 G/A polimorfizam može imati ulogu u patogenezi CVID. Najverovatniji model bi bio da u uslovima u kojima je podstaknuto lučenje TNF, genetska predispozicija ka većoj produkciji ovog citokina dovodi do jačih inflamatornih reakcija. Granulomatozne komplikacije i razvoj splenomegalije mogle bi biti neke od posledica takve genetske sklonosti kod pacijenata sa CVID jer je poznato da postoji podgrupa CVID pacijenata koja ima agresivnu inflamatornu komponentnu, često udruženu sa autoimunskim komplikacijama (Cunningham-Rundles, 2012). U skladu s tim, može se pretpostaviti da nosioci G alela imaju bolju kontrolu inflamatornih reakcija podstaknutih TNF citokinom. Stoga, polimorfizam *TNF* -308 A mogao bi biti biomarker za primenu specifične anti-TNF terapije. Međutim, potrebna su dodatna ispitivanja na većem broju ispitanika da bi se mogao doneti takav zaključak.

Uloga IL-10 u patogenezi CVID pretpostavljena je na osnovu njegovih brojnih imunoregulatornih uloga. Svrstava se u antinflatatorne citokine, ali je pokazano i da ima bitnu ulogu u terminalnoj diferencijaciji B-ćelija, posebno u promeni klase imunoglobulina u IgA podklasu (Berron-Ruiz i sar., 2016). Nakon otkrića da mutacije u genu koji kodira ICOS dovode do ispoljavanja kliničke slike CVID, utvrđeno je i da osobe sa *ICOS* mutacijom imaju deficijenciju IL-10. Štaviše, smatra se da to leži u osnovi uloge ICOS kostimulatora u formiranju germinativnih centara i memorijskih B-ćelija kod ljudi (Warnatz i sar., 2006). Pored toga, animalni model deficijencije IL-10 dovodi do razvoja inflamatorne bolesti creva kod miševa, a poznato je da se u kliničkoj slici CVID može javiti poremećaj koji liči na IBD (Rennick i sar., 1997).

U našoj studiji ispitivali smo tri polimorfizma u promotoru *IL10* gena: *IL10* G/A -1082 (rs1800896), C/T -819 (rs1800871) i C/A -592 (rs1800872), koji su u jakom LD. Veruje se da ova tri polimorfizma imaju biološki značaj i da na transkripcionom nivou

menjaju ekspresiju *IL10* gena. Prva dva navedena polimorfizma su analizirana TaqMan PCR metodom, dok su genotipovi za treći polimorfizam izvedeni iz SNP rs1800871 jer je ustanovljeno da su ova dva SNP u potpunoj neravnoteži vezanosti kod belaca (Turner i sar., 1997). Ispitivan je njihov pojedinačni uticaj, kao i uticaj kombinacije alela u određene haplotipove za koje je u prethodnim studijama pokazano da imaju uticaj na produkciju IL-10, i da su povezani sa CVID ili nekom od njenih kliničkih manifestacija.

Do sada su u većem broju istraživanja ispitane frekvencije G i A alela na poziciji -1082, kao i C i T alela na poziciji -819, u okviru gena za IL-10 u populacijama zdravih osoba većeg broja geografski udaljenih država. Jedan od ciljeva ovog istraživanja je bio da se uporede dobijene frekvencije ovih alela u populaciji zdravih osoba iz Srbije sa frekvencijama u kontrolnim populacijama drugih država za koje postoje podaci u literaturi i utvrdi da li postoje značajne razlike između populacije zdravih osoba iz Srbije i drugih, geografski udaljenih i etnički različitih populacija. Kada je reč o rs1800896 frekvencije G i A alela u zdravoj populaciji Srbije nisu bile statistički značajno različite u odnosu na populacije Portugalije, Jordana, Italije, Nemačke i Kolumbije. Za drugi ispitivan *IL10* polimorfizam, rs1800871, nađena je visoko statistički značajna razlika u frekvencijama alela između populacija Srbije i Tajvana, dok je distribucija alela ovog polimorfizma u našoj populaciji slična sa distribucijama populacija Italije, Nemačke i Kolumbije.

Ova doktorska disertacija predstavlja prvo istraživanje kojim su određene frekvencije alela na pozicijama -1082, -819 i -592 u promotoru gena za IL-10 i distribucija genotipova kod pacijenata sa CVID u Srbiji. Analizom naših rezultata utvrđeno je da se distribucija alela i genotipova za sva tri ispitivana polimorfizma u grupi pacijenata sa CVID ne razlikuje bitno od distribucije u grupi 250 zdravih davaoca krvi iz kontrolne grupe. Analiza pojedinačnih SNP u korelaciji sa kliničkim fenotipom takođe nije dala pozitivne rezultate. Korišćenjem posebnog softvera i algoritma maksimizacije očekivanja određeni su haplotipovi za *IL10* promotor polimorfizme. Od mogućih osam, dobijena su tri haplotipa: GCC, ACC i ATA kod CVID pacijenata i zdravih osoba iz kontrolne grupe. Naši rezultati su bili u skladu sa objavljenim rezultatima *IL10* haplotipova u populacijama zdravih osoba bele rase (Turner i sar., 1997; Costeas i sar., 2003; Uboldi de Capei i sar., 2003). Međutim, distribucija haplotipova, kao ni pojedinačnih alela i genotipova za svaki od ispitanih polimorfizama,

u grupi pacijenata i kontrolnoj grupi nije pokazala bitne razlike. Ni dalja stratifikacija haplotipova prema kliničkom fenotipu nije pokazala značajnu povezanost bilo kog haplotipa sa bronhiektazijama, splenomegalijom ili autoimunskim bolestima kod CVID pacijenata.

Merenje nivoa IL-10 u našoj studiji pokazalo je da CVID pacijenti imaju nižu produkciju ovog citokina u odnosu na zdrave osobe. Međutim, razlika nije bila statistički značajna. S obzirom na ulogu u diferencijaciji B-ćelija i promeni klase imunoglobulina kao i na imunoregulatornu ulogu u supresiji inflamacije, logično bi bilo pretpostaviti da je produkcija IL-10 kod CVID pacijenata snižena. Shodno tome bi se mogao objasniti i trend registrovan u našim rezultatima. Međutim, iako su neke studije ukazale na nižu produkciju ovog citokina kod CVID pacijenata od strane T-limfocita (Holm i sar., 2003; Pons i sar., 2006), postoje i studije koje su pokazale normalnu ili povišenu produkciju od strane monocita, čak i u slučaju niske produkcije od strane T-limfocita (Zhou i sar., 1998).

U cilju određivanja moguće korelacije određenog genotipa IL-10 sa produkcijom samog citokina stratifikovali smo pacijente sa CVID prema određenim haplotipovima, odnosno diplotipovima za sva tri ispitivana polimorfizma. Shodno prethodno objavljenim rezultatima (Turner i sar., 1997) pacijente smo podelili u tri podgrupe: one sa “visoko-produkujućim” haplotipovima (GCC/GCC u diplotipu), one sa “srednje-produkujućim” (diplotipovi GCC/ACC i GCC/ATA) i “nisko-produkujućim” (ATA/ATA, ATA/ACC i ACC/ACC diplotipovi). Međutim, analizom koncentracija citokina nije nađena statistički značajna razlika između pojedinih grupa. Iako su u grupi sa “visoko-produkujućim” diplotipom nađene najviše vrednosti IL-10, druge dve podgrupe su pokazale slične rezultate.

Analiza naših rezultata ne ukazuje na bitnu ulogu tri ispitivana polimorfizma u promotor regionu gena za interleukin 10 u ispoljavanju CVID ili njenih kliničkih fenotipova. Međutim, u literaturi su opisani i drugačiji rezultati. Tako su Mullighan i saradnici pronašli vezu između “nisko-produkujućeg” ATA haplotipa, i razvoja granulomatozne forme CVID. Asocijacija je bila upadljivija kada je kombinovana sa analizom prethodno prijavljenih rezultata o vezi *TNF* +488 A alela sa razvojem ove komplikacije. Autori su postulirali da ATA haplotip, koji predisponira smanjenu produkciju IL-10, u isto vreme dozvoljava više vrednosti TNF, usled smanjene

inhibicije IL-10 na TNF. Više vrednosti TNF, kao što je već pomenuto, favorizuju stvaranje granuloma (Mullighan i sar., 1999). Rezaei i sar. su takođe ispitali asocijaciju pomenutih promotor polimorfizama u *IL10* genu sa CVID. Oni su našli pozitivnu asocijaciju genotipa *IL10* -1082 GA i javljanja CVID, dok je AA genotip bio značajno ređi kod zdravih osoba iz kontrolne grupe (Rezaei i sar., 2010). Kad je reč o haplotipovima, od teorijski mogućih osam, i oni su našli tri u kontrolnoj grupi: GCC, ACC i ATA, kao što je opisano u našim rezultatima i kod Mullighana i sar. Međutim, zanimljivo je da su među CVID pacijentima utvrdili tri retka haplotipa koji nisu bili prisutni kod kontrola, ACA, GCA i ATC, od kojih je ACA haplotip bio prisutan kod čak četiri pacijenta. Haplotip ACC, koji je, kao i ATA, povezan sa nižom produkcijom IL-10 bio je značajno ređi kod CVID pacijenata, što je bilo suprotno od rezultata u kohorti iz V. Britanije.

Osim inhibicije proinflamatornih citokina poput TNF i IFN-gama, interleukin-10 ima važnu ulogu u kontroli inflamacije od strane regulatornih T-ćelija (Treg) koje se dovode u vezu sa razvojem različitih autoimunskih poremećaja. Broj Treg kod CVID pacijenata, posebno onih sa splenomegalijom i povišenim inflamatornim markerima je snižen (Fevang i sar., 2007). Međutim, u skorašnjim studijama akcenat je stavljen na regulatorne B-ćelije, označene kao B10, koje se smatraju glavnim izvorom IL-10. Za njihovo postojanje se zna od ranije, ali su tek nedavno opisane kod čoveka (Iwata i sar., 2011) i sve više se ispituju kao bitan faktor u patogenezi brojnih imunski posredovanih bolesti, poput reumatoidnog artritisa ili ITP (Hua i sar., 2014). S obzirom na pretpostavljenu hroničnu imunsku aktivaciju usled sniženog broja Treg ćelija, kao i visoku incidenciju autoimunosti, sugerisano je da je i broj B10-ćelija kod pacijenata sa CVID snižen, odnosno da one imaju glavnu ulogu u razvoju Treg ćelija i kontroli T-ćelijske aktivacije i autoimunosti. Neke studije su zaista objavile snižen broj B10 i posledično IL-10 (Vlkova i sar., 2015; Barsotti i sar., 2016), posebno u podgrupi sa autoimunskim citopenijama, mada ima i suprotnih rezultata (Kofod-Olsen i sar., 2016).

Zanimljivo je da miševi koji nemaju funkcionalni gen (*engl.* “knock-out”) za IL-10 ispoljavaju težak kolitis sličan inflamatornim bolestima creva kod čoveka (Rennick i sar., 1997). Slično je i sa miševima koji imaju deficijenciju receptora za ovaj citokin. Međutim, u sredini bez mikroorganizama ne razvija se kolitis, što je podržalo teoriju da se u IBD radi o nekontrolisanom imunskom odgovoru na mikroorganizme prisutne u

crevima. Poslednjih godina brojna istraživanja su potvrdila da je IL-10 neophodan u uspostavljanju negativne povratne signalizacije potrebne za održavanje intestinalne homeostaze i kod čoveka. Pre svega, otkrivene su homozigotne mutacije u genima za IL-10 kao i IL-10RA (interleukin 10 receptor alfa) ili IL-10 RB (interleukin 10 receptor beta) kod dece sa veoma ranim početkom inflamatorne bolesti creva (*engl.* Very Early Onset Inflammatory Bowel Disease, VEO-IBD) koja ima težak klinički tok i rezistentna je na standardnu terapiju (Glocker i sar., 2009; Glocker i sar., 2010). U lečenju VEO-IBD kao terapija izbora pokazala se transplantacija matičnim ćelijama hematopoeze (HSCT) (Engelhardt i sar., 2013). Iako je kolitis najupečatljiviji deo kliničke slike, pacijenti imaju i druge kliničke manifestacije poput ponavljanih respiratornih infekcija, folikulitisa, artritisa, koji ovu bolest, nastalu usled mutacija u *IL10* ili *IL10RA*, svrstavaju u kompleksne imunološke poremećaje iz grupe primarnih imunodeficijencija (Picard i sar., 2015).

Asocijacija između CVID i IBD je dobro poznata. U kohorti od 473 pacijenata iz SAD 20 je imalo potvrđenu IBD (Resnick i sar., 2012). Skorašnja GWAS studija koja je uključila 125 pacijenata sa VEO-IBD ukazala je na asocijaciju bolesti sa varijantama koje su nađene i u CVID kohortama, poput polimorfizama u *MSH5*, *LRBA* ili *CD19* genima (Kelsen i sar., 2015). Osim toga, u jednoj porodici sa konsangvinitetom u kojoj je troje dece ispoljilo fenotip sa karakteristikama CVID uz VEO-IBD, mapiranjem homozigotnosti uz sekvenciranje celokupnog egzoma (*engl.* whole exome sequencing, WES), utvrđena je homozigotna mutacija u genu za IL-21 koja je pokazala potpunu segregaciju sa ispitivanim fenotipom. Pretpostavljeno je da IL-21, između ostalih funkcija, ispoljava imunosupresivnu ulogu podstičući lučenje IL-10 i da deficijencija IL-21 dovodi do manje produkcije i IL-10, stoga je klinička slika mutacija u *IL21* slična mutacijama u *IL10* i *IL10RA* genima (Salzer i sar., 2014). Osim opisanih mutacija, nađenih kod malog broja obolelih, gen za IL-10 je i u velikim studijama asocijacije povezivan sa razvojem IBD. Tako je u GWAS objavljenom 2008. nađena asocijacija polimorfizama u *IL10* sa IBD, potvrđenoj u velikoj meta-analizi još pet GWAS koje su sledile (Franke i sar., 2010). U drugoj studiji su ispitivani haplotipovi polimorfizama u promotoru *IL10* gena koji su analizirani i u našoj studiji, i nađena je veza sa GCC i ACC haplotipovima i Kronove bolesti u pedijatrijskoj populaciji. Osim toga, i retki haplotipovi su opisani isključivo kod obolelih (Sanchez i sar., 2009).

U svakom slučaju, polimorfizmi u genu za IL-10, kao i IL-10RA, povezani su prvenstveno sa IBD, ali i sa CVID. Koliko je nama poznato, nije rađeno istraživanje *IL10* polimorfizama i posebnog klinčkog fenotipa koji ima karakteristike IBD u sklopu CVID. U našem uzorku nije bilo pacijenata koji bi zadovoljili kriterijume za takvu dijagnozu, a zbog veličine uzorka nije izdvojen poseban fenotip koji bi uključio enteropatiju za genotipsko-fenotipsku korelaciju. Moguće je, ipak, da su retke homozigotne mutacije koje dovode do gubitka funkcije gena za IL-10 i IL-10RA, i koje se ispoljavaju kao VEO-IBD, deo kontinuuma gde su na drugom kraju polimorfizmi koji samo umanjuju efikasnost IL-10 signalizacije kod osoba koje će ispoljiti bolest kasnije u životu, uz prisustvo drugih genetskih ili negenetskih faktora. Može se pretpostaviti da bi taj fenotip na lakšem kraju spektra, bio CVID koji uključuje kliničku sliku enteropatije sa IBD karakteristikama. Poznato je da CVID može biti maskirana drugim, posebno autoimunskim bolestima, koje mogu biti inicijalna manifestacija, i da do ispoljavanja hipogamaglobulinemije i drugih znakova poremećaja može doći u bilo kom periodu života (Cunningham-Rundles, 2012).

Odsustvo asocijacije polimorfizama u promotoru gena za IL-10 u našoj studiji može biti zbog toga što ovaj polimorfizam zaista nema ulogu u patogenezi CVID, što je u skladu sa rezultatima velikih studija asocijacije kod CVID pacijenata (Orange i sar., 2011; Li i sar., 2015) koje nisu prijavile vezu sa ovim ili drugim polimorfizmima u *IL10* genu. Međutim, moguće da je problem u ograničenom broju ispitanika.

Kada je reč o interleukinu-6, u ovom istraživanju smo pronašli značajnu razliku u frekvencijama alela za polimorfizam u promotoru *IL6* na poziciji -174 (rs1800795) između kontrolne grupe i grupe pacijenata sa CVID. Alel G, koji je povezan sa višom produkcijom IL-6 (Fishman i sar., 1998), nosio je veći rizik za CVID od ređeg C alela, i ta razlika je dostigla statističku značajnost. Međutim, analiza genotipova nije dala statistički značajnu razliku između ove dve grupe. Osim toga, naši rezultati su bili suprotni od prethodno prijavljenih u studiji na kohorti iz Irana (Rezaei i sar., 2009) u kojoj je C alel, kao i CC genotip, bili značajno zastupljeniji kod pacijenata sa CVID, dok su G alel i GG genotip bili značajno češći u kontrolnoj grupi.

Da bi utvrdili distribuciju alela za polimorfizam rs1800795 u drugim populacijama i uočili eventualne razlike u odnosu na zdravu populaciju iz Srbije,

analizirali smo podatke iz sličnih studija sprovedenih u više zemalja iz Evrope, Azije i Južne Amerike. U drugim evropskim zemljama distribucija alela i genotipova se nije bitno razlikovala u odnosu na našu populaciju, ali je nađena značajna razlika u odnosu na Kolumbiju, kao i visoko statistički značajna razlika u odnosu na populaciju u Indiji.

Interleukin-6 je plejotropni citokin sa brojnim biološkim ulogama u inflamaciji, imunskom odgovoru i hematopoezi, među kojima je njegova uloga u terminalnoj diferencijaciji B-ćelija bila razlog prvim pretpostavkama o defektnoj produkciji ovog citokina kod pacijenata sa CVID. Međutim, ta pretpostavka je brzo odbačena jer je već u prvim studijama koje su se bavile ovom temom utvrđeno da se kod većine pacijenata sa CVID registruje više IL-6 u plazmi i da nedostatak ovog citokina ne može biti razlog neuspele diferencijacije B-ćelija (Adelman i sar., 1990). Povišena ekspresija *IL6* gena, mapiranog na 7p21, takođe je prijavljena kod pacijenata sa CVID i sledstveno povišena produkcija IL-6 u *in vitro* stimulisanim PBMC pacijenata u poređenju sa onima iz kontrolne grupe zdravih osoba. Još tad je pretpostavljeno da povišene vrednosti IL-6, iako ne mogu uticati na produkciju specifičnih imunoglobulina kod pacijenata sa CVID usled drugog nepoznatog defekta, mogu indukovati mnoge od limfoproliferativnih ili autoimunskih fenomena povezanih sa ovom bolešću (Pandolfi i sar., 1993). Povišena produkcija IL-6 je zaista registrovana kod pacijenata sa različitim autoimunskim bolestima, poput reumatoidnog artritisa, SLE i Kronove bolesti, a smatra se da ona može biti odgovorna i za hipergamaglobulinemiju koja se nekad registruje kod ovh pacijenata. Za neke ovih bolesti se već neko vreme u terapiji uspešno koriste specifični lekovi koji blokiraju aktivnost IL-6, poput tocilizumaba, i time antagonizuju efekte ovog citokina (Tanaka i sar., 2014). Međutim, kada je reč o CVID pacijentima, neke novije studije nisu potvrdile da postoje bitne razlike u produkciji IL-6 kod obolelih u odnosu na zdrave, ili su čak detektovale sniženu produkciju ovog citokina (Trujillo i sar., 2011) u monocitima CVID pacijenata nakon stimulacije. To dalje potvrđuje heterogenu prirodu poremećaja, ali može biti i odraz specifičnih događaja vezanih za manifestacije bolesti ili primenjenu terapiju (Ibanez i sar., 2005). Osim toga, kao što je već pomenuto, metode i tehnike kao i uslovi merenja citokina dosta se razlikuju od studije do studije. U svakom slučaju, s obzirom da je deficijencija IL-6 u etiologiji neuspele diferencijacije B-ćelija kod CVID pacijenata isključena, povišena produkcija ovog citokina može biti pretpostavljena i kao odraz kompenzatornog mehanizma.

Između ostalog, IL-6 funkcioniše kao medijator koji signalizira bitna dešavanja, poput postojanja infektivnog žarišta odakle šalje signal upozorenja čitavom organizmu (Hunter i Jones, 2015). CVID pacijenti su stalno izloženi infekcijama na koje nemaju adekvatan imunski odgovor. Mada prekomerno stvaranje IL-6 u ranoj fazi bolesti može imati pozitivne efekte, takvo prolongirano stanje može doprineti razvoju različitih inflamatornih, limfoproliferativnih i autoimunskih bolesti. Određeni genotip koji favorizuje povećanu produkciju IL-6, u ovom slučaju G alel na poziciji -174 uzvodno od transkripcionog mesta *IL6* gena, u tom kontekstu može doprineti razvoju takvih komplikacija kod CVID pacijenata.

Da bi odredili produkciju IL-6 kod CVID pacijenata iz našeg uzorka, kultivisali smo PBMC iz krvi uzete od svih pacijenata i 35 zdravih kontrolnih osoba i merili koncentracije ovog citokina u medijumu nakon kultivisanja sa ili bez stimulacije. Rezultati su pokazali značajno više IL-6 u supernatantu CVID pacijenata u odnosu na kontrole, i ta razlika je pokazala statističku značajnost ($p=0,0038$). Ovaj rezultat je u korelaciji sa drugim prethodno pomenutim studijama koje su ukazale na povišenu produkciju IL-6 kod obolelih od CVID. Isto tako, u korelaciji je i sa našim rezultatima genotipizacije SNP rs1800795 koja je pokazala značajno veću učestalost G alela kod pacijenata, koji je, kao što je već pomenuto, povezan sa višom produkcijom interleukina 6. Ipak, korelacijom genotipa sa produkcijom ovog citokina kod CVID pacijenata iz našeg uzorka nismo uspeli da reprodukujemo taj nalaz. Štaviše, produkcija citokina kod pacijenata sa GG, GC ili CC genotipom je slična, sa blagom prevagom vrednosti kod CC genotipa. Moguće je da je veličina uzorka faktor koji onemogućava ispoljavanje prave asocijacije, s obzirom i na to da je redak CC genotip registrovan samo kod 2 pacijenta sa CVID. S druge strane, u jednoj meta-analizi sa preko 5000 ispitanika nije utvrđena korelacija -174 G/C polimorfizma u *IL6* genu sa produkcijom IL-6 (Huth i sar., 2009). To je objašnjeno otkrićem da je gen za IL-6 regulisan ne samo proksimalnim promotorom u kojem je smešten -174 G/C polimorfizam, već i distalnim u čijoj blizini se nalazi drugi polimorfizam na poziciji - 6331 T>C za koji je pokazano da menja ekspresiju gena (Samuel i sar., 2008).

Koliko smo mogli uočiti pretragom Medline baze podataka, rs1800795 je ciljano ispitivan kao polimorfizam u *IL6* kandidat genu kod CVID pacijenata samo u studiji Rezai i sar. i našoj studiji, a rezultati su kontradiktorni. U velikim studijama asocijacije

na pacijenatima iz CVID kohorti sakupljenih iz više zemalja (Orange i sar., 2011; Li i sar., 2015) nije opisana asocijacija sa rs1800795. Međutim, u više studija je nađena asocijacija G alela i autoimunskih bolesti, poput sistemskog juvenilnog idiopatskog artritisa i reumatoidnog artritisa (Fishman i sar., 1998). Pacijenti sa CVID imaju u približno četvrtini slučajeva pridružene autoimunske bolesti, a poznato je i da oba poremećaja često dele genetsku osnovu. Stoga, asocijacija G alela sa ispoljavanjem CVID u našoj kohorti pacijenata u korelaciji je sa asocijacijom tog alela i autoimunskih bolesti. Međutim, korelacija genotipa sa autoimunitetom kao kliničkim fenotipom CVID na našem uzorku dala je upravo suprotne rezultate: C alel je nosio veći rizik za razvoj autoimunskih bolesti iako razlika nije dostigla statističku značajnost ($p=0,084$). S druge strane, prisustvo G alela je uvećavalo šansu za razvoj splenomegalije 2,27 puta (OŠ= 2,25 pri 95%IP 0,78-6,48) a GG genotip 3,77 puta (OŠ=3,77 pri 95%IP 0,92-15,44), iako ni ove razlike nisu pokazale statističku značajnost ($p=0,129$ i $p=0,059$, respektivno). Ovi podaci reprezentuju samo neke od teškoća u interpretaciji rezultata kod tako heterogene bolesti kao što je CVID. Da bi se uočeni trendovi u rezultatima potvrdili ili isključili potrebno je analizu uraditi na većem broju ispitanika.

IFNG je lociran na hromozomu 12 i čini ga četiri egzona. Svrstava se u gene koji imaju visoko očuvan sastav aminokisline. Od svih gena koji kodiraju proteine sa ulogom u imunskom odgovoru smatra se da se gen za IFN-gama nalazi među 10% onih sa najjačim selekcionim ograničenjima protiv zamene aminokiselina, što govori u prilog tome da ima esencijalnu ulogu u preživljavanju (Manry i sar., 2011). U okviru introna gena za IFN-gama opisano je nekoliko funkcionalnih polimorfizama među kojima je i SNP na poziciji +874 A/T (rs2430561). Utvrđeno je da je nasleđivanje A ili T nukleotida u potpunoj povezanosti sa brojem CA ponovaka koji čine mikrosatelitni marker smešten neposredno uz rs2430561. Broj CA ponovaka korelira sa produkcijom IFN-gama i može biti od 11 do 15. Osobe homozigoti za alel 2, koji se smatra najčešćim a odgovara broju od 12 CA ponovaka, proizvode značajno više IFN-gama nego osobe sa drugim genotipom (Pravica i sar., 1999). Naknadno je uočeno da se T alel nasleđuje zajedno sa nizom od 12 CA ponovaka, stoga T alel na poziciji +874 korelira sa višom produkcijom IFN-gama. To je objašnjeno time što se rs2430561 polimorfizam nalazi unutar veznog mesta za NFκB, a prisustvo timina na poziciji +874 neophodno je za

specifično vezivanje transkripcionog faktora NF κ B (Pravica i sar., 2000). Korelaciju između +874 T alela i produkcije IFN-gama kasnije su potvrdili i drugi istraživači (Hoffmann i sar., 2001; Cardoso i sar., 2010; Vallinoto i sar., 2010), ali postoje i suprotni rezultati (Cartwright i sar., 1999).

Interferon-gama, poznat i kao tip II interferona, je plejotropni citokin koji ima bitnu ulogu kako u urođenom tako i u stečenom imunitetu. S obzirom na dokazanu ulogu u odbrani protiv infekcije mikobakterijama, ne iznenađuje podatak da je polimorfizam -874 A/T među prvima ispitivan upravo kod pacijenata sa tuberkulozom. Pretpostavljeno je da oboleli od tuberkuloze, pogotovo sa hroničnom formom bolesti mogu imati predominaciju A alela u genotipu koji korelira sa nižom produkcijom IFN-gama. To je i potvrđeno u više studija uključujući i meta-analizu (Lio i sar., 2002; Vallinoto i sar., 2010; de Albuquerque i sar., 2012). S druge strane, kod sistemskih autoimunskih bolesti kao što je sistemski eritemski lupus (SLE), kod kojih je potvrđeno pojačano stvaranje IFN-gama, uklapa se asocijacija T alela sa povećanjem sklonosti ka nastanku SLE (da Silva i sar., 2014).

Distribucija A i T alela na poziciji +874 gena za IFN-gama ispitana je u većem broju populacija zdravih osoba, kao i u prethodnom istraživanju na populaciji zdravih dobrovoljnih davalaca krvi u Srbiji (Popadic i sar., 2012). Utvrđeno je takođe da su distribucije A i T alela u populaciji zdravih osoba u Srbiji slične frekvencijama ovih alela u većini evropskih zemalja, a postoji statistički visoko značajna razlika u odnosu na većinu populacija u Aziji i Africi. Tako su frekvencije A i T alela u zdravoj populaciji Srbije slične onima u populacijama V. Britanije, Italije, Hrvatske, Bugarske, Poljske, Turske, pripadnika bele rase iz Kanade, kao i Brazila i Kine. S druge strane, postoji statistički visoko značajna ili značajna razlika u distribuciji A i T alela u zdravoj populaciji Srbije i populacija Južne Afrike, Hong Konga, Tajvana, Egipta, Tajlandai i kanadana indijanskog porekla iz plemena Dene.

Kada je reč o čestoj varijabilnoj imunodeficijenciji, koliko je nama poznato, pre našeg istraživanja nije ispitivana asocijacija rs243056 sa ispoljavanjem ove bolesti. Jedina studija koju smo pronašli pretragom Medline baze podataka, izvedena u Španiji, ispitivala je mikrosatelitni polimorfizam u intronu *IFNG* gena kod 32 pacijenta sa COVID i 56 zdravih kontrola. S obzirom da je od ranije poznato da se se T alel nasleđuje zajedno sa nizom od 12 CA ponovaka jer je sa tim alelom u potpunom LD, donekle se

njihovi rezultati mogu preneti na -874 A/T polimorfizam. Međutim, oni nisu našli značajnu razliku u nasleđivanju bilo kog alela iz mikrosatelitnog markera, uključujući i alel 2, između pacijenata i zdravih kontrola. Ipak, veličina uzorka je ograničavajući faktor stoga su dopunska ispitivanja potrebna da bi se odredio značaj ovih polimorfizama kod pacijenata sa CVID.

Analizom distribucije alela i genotipova za -874 A/T polimorfizam u *IFNG* kod naših ispitanika nismo našli značajnu razliku u distribuciji T i A alela, kao ni genotipova, između obolelih od CVID i zdravih kontrola. Međutim, nađena je asocijacija između T alela i povećanog rizika za razvoj splenomegalije koja je pokazala statističku značajnost. Alel A i genotip AA su se, sa druge strane, pokazali kao protektivni u razvoju ove česte komplikacije kod obolelih od CVID, takođe sa statističkom značajnošću. Genotipovi TA i TT prema odnosu šansi povećavaju rizik za uvećanje slezine ali razlika u distribuciji tih genotipova nije bila statistički značajna.

Dopunska ispitivanja su svakako neophodna da bi se procenila uloga ovog polimorfizma *IFNG* u razvoju splenomegalije kod pacijenata sa CVID.

Ovo je prva studija u Srbiji koja je ispitivala uticaj polimorfizma rs243056 u genu za IFN-gama kod pacijenata sa CVID, i prva studija uopšte koja je povezala T alel u genotipu CVID pacijenata sa razvojem splenomegalije. S obzirom da je pokazano da nosioci T alela proizvode veće količine interferona-gama, ova asocijacija bi se mogla objasniti uticajem povišenih vrednosti tog citokina na regrutaciju različitih imunskih ćelija u slezinu i njenim sledstvenim uvećanjem.

Zanimljivo je da je u jednoj nedavnoj studiji urađena analiza celokupnog transkriptoma u punoj krvi 91 pacijenta sa CVID od kojih je 47 imalo inflamatorne komplikacije (uključujući hematološke autoimunske bolesti, granulomatozne infiltracije, intersticijalnu bolest pluća, limfoidnu hiperplaziju/splenomegaliju i/ili gastrointestinalne inflamatorne bolesti) a 44 je bilo bez komplikacija. U poređenju sa rezultatima zdravih kontrola CVID pacijenti su imali naglašenu ushodnu regulaciju gena odgovornih za interferone, koja je predominirala u grupi pacijenata sa inflamatornim komplikacijama. Objašnjenje nije u potpunosti nađeno, ali je pretpostavljeno da, s obzirom na činjenicu da su kod pacijenata sa inflamatornim komplikacijama nađeni i teži defekti u stečenom imunitetu (češće su limfopenični, imaju redukovani broj B-ćelija i snižene druge parametre iz B, T i plazma ćelijske mreže), oni mogu imati hroničnu

aktivaciju urođenog IFN puta kao odgovor na antigene iz spoljne sredine (Park i sar., 2013). Osim toga, hronična ushodna regulacija interferonskih puteva poznata je i kod autoimunskih bolesti usled aktivacije receptora sličnih Tollu (*engl.* Toll like receptor, TLR) i još nekih nedovoljno definisanih senzora u citoplazmi (Ronnblom i Eloranta, 2013), što CVID sa inflamatornim komplikacijama u molekularno biološkom smislu još jednom povezuje sa sistemskim autoimunskim bolestima.

Imajući sve to u vidu za očekivati je da pacijenti sa CVID, bar oni koji ispoljavaju fenotip sa komplikacijama, imaju povišenu produkciju IFN-gama. Rezultati koje smo pronašli u literaturi su, kao i za većinu drugih citokina merenih kod pacijenata sa CVID, neusaglašeni i često kontradiktorni. Serano i saradnici su detektovali povišene vrednosti IFN-gama u prečišćenim T-ćelijama nakon stimulacije sa CD3 ili PMA/PMH od 24h (Serrano i sar., 2000), a slično su opisali i North i sar. koji su merili produkciju IFN-gama u CD4⁺ i CD8⁺ T-limfocitima nakon 12h stimulacije sa PMA i jonomicinom (North i sar., 1996). Giovanetti i sar. su takođe opisali povišene nivoe ovog citokina kod pacijenata sa CVID koji imaju smanjen broj CD4⁺ T-ćelija (Giovannetti i sar., 2007). Opisani su i suprotni rezultati, koji idu u prilog sniženoj produkciji IFN-gama kod pacijenata sa CVID, (Hauber i sar., 1993) ali neka novija istraživanja su ipak iznela dokaze i nove činjenice u patogenezi ove bolesti koji koreliraju sa povišenom produkcijom interferona-gama. Tako su Vlkova i sar. u svetlu nedavno aktuelizovanih B regulatornih ćelija koje su glavni izvor IL-10 ispitivale interakciju tih ćelija kod CVID pacijenata i zdravih kontrola sa tzv. IFN-gama⁺/TNF⁺ produkujućim T-ćelijama, koje su multifunkcionalne CD4⁺ T-ćelije sposobne da produkuju oba proinflamatorna citokina a pripadaju kategoriji visoko imunokompetentnih memorijskih ili efektorskih memorijskih T-ćelija. Nekoliko zaključaka su izveli iz tog istraživanja: 1. produkcija citokina od strane multifunkcionalnih IFN-gama⁺/TNF⁺ CD4⁺ T-ćelija je povišena kod CVID pacijenata, 2. broj regulatornih B-ćelija je u isto vreme snižen, i 3. sposobnost B regulatornih ćelija da suprimiraju produkciju IFN-gama i TNF od strane CD4⁺ ćelija je smanjena. Stoga, defekt u odgovoru B regulatornih ćelija na stimulaciju T-ćelija vodi preteranoj aktivaciji T-ćelija koja može biti u osnovi imunoregulatornih abnormalnosti koje se nalaze kod pacijenata sa CVID (Vlkova i sar., 2015). U drugoj studiji koji su izveli isti autori koji su opisali naglašenu ushodnu regulaciju interferon-povezanih gena kod pacijenata sa inflamatornim CVID (Park i sar., 2013), opisana je ekspanzija ćelija

urođenog imunskog odgovora (engl. innate lymphoid cells, ILCs) koje su naglašeno IFN-gama pozitivne, kako u perifernoj krvi, tako i u mukoznom tkivu pacijenata. Time je pretpostavljena uloga ILCs u povišenoj inflamaciji i oštećenju sluznica respiratornog i gastrointestinalnog trakta. Iako su u prethodnoj studiji autori pokazali sniženu produkciju IFN-gama od strane T-limfocita, merenog u supernatantu nakon stimulacije kultivisanih PBMC, u ovoj drugoj studiji (Cols i sar., 2016) su u serumu izmerili značajno više IFN-gama kod CVID pacijenata, posebno onih sa komplikacijama, nego kod zdravih kontrola.

Merenjem nivoa IFN-gama nakon stimulacije u supernatantu u našem uzorku takođe su dobijene više vrednosti kod pacijenata sa CVID u odnosu na zdrave kontrole. Ta razlika, međutim, nije dostigla statističku značajnost. Kada smo uradili korelaciju genotipa za -874 A/T polimorfizam u *IFNG* i nivoa IFN-gama kod pacijenata takođe nismo dobili statistički značajne rezultate. Ipak, pacijenti sa TT i TA genotipom, koji su opisani kao “visoko-produkujući”, imali su više vrednosti u odnosu na pacijente sa AA genotipom. Stoga, naši rezultati ispitivanja polimorfizma u intronu gena za IFN-gama govore u prilog tome da je T alel faktor rizika za razvoj splenomegalije kod pacijenata sa CVID. U isto vreme, registrovan je trend ka višim nivoima IFN-gama kod pacijenata sa CVID u odnosu na kontrole, kao i predominacija viših vrednosti ovog citokina kod pacijenata koji su nocioci T alela. Ti rezultati su u korelaciji sa prethodno opisanim, kao i sa pretpostavljenom ulogom IFN-gama u patogenezi CVID ili, bar, nekih komplikacija koje prate bolest, poput splenomegalije.

Rezultati našeg istraživanja ukazuju na moguću ulogu ispitivanih polimorfizama u genima za citokine u etiopatogenezi česte varijabilne imunodeficijencije. Genetičke studije asocijacije, danas široko zastupljene u ispitivanju etiologije različitih poremećaja u ljudskoj populaciji, pružaju nam više sugestivne nego apsolutne dokaze. Međutim, uprkos svojim ograničenjima, one se upravo preporučuju u istraživanjima udela genetske komponente kod poligenih i kompleksnih bolesti. Malo je verovatno da geni za citokine opisani u našem istraživanju sadrže uzročne mutacije za CVID ali se, s druge strane, čine kao idealni kandidati za gene koji modifikuju bolest. Izolovano, ili u kombinaciji, ovi polimorfizmi mogu biti presudni u razvoju komplikacija bolesti od kojih u mnogome zavisi kvalitet života i prognoza kod CVID pacijenata.

S obzirom da se radi o retkoj bolesti, rezultati dobijeni na našem uzorku mogu poslužiti kao deo meta-analize većeg broja sličnih ili identičnih studija sprovedenih u svetu. Isto tako, poznato je da mnoge bolesti dele zajedničke gene podložnosti, stoga rezultati dobijeni u ovom istraživanju mogli bi da predstavljaju osnovu za dalja ispitivanja značaja ovih genetskih markera i kod pacijenata obolelih od drugih imunski posredovanih bolesti. Konačno, posmatrano iz ugla istraživača, COVID predstavlja model bolesti koji obećava bolje razumevanje medijatora imunske funkcije i inflamacije kao i, još uvek ne u potpunosti poznate genetske osnove produkcije antitela.

6 ZAKLJUČCI

1. Ispitivanjem rs1800629 polimorfizma gena za TNF:

- utvrđena je statistički visoko značajna razlika u učestalosti alela A između pacijenata sa CVID i zdravih osoba iz kontrolne grupe, kao i statistički značajna razlika u zastupljenosti AA i GG genotipa između dve poredene grupe, pri čemu je GG genotip protektivan, a AA genotip povećava rizik za nastanak CVID,
- nije utvrđeno da ovaj polimorfizam utiče na kliničke manifestacije bolesti.

2. Ispitivanjem rs1800896, rs1800871 i rs1800872 polimorfizama u promotoru gena za IL-10:

- nije dobijena statistički značajna razlika u distribuciji alela i genotipova ovih polimorfizama kod pacijenata sa CVID u odnosu na zdrave kontrole.
- poređenjem formiranih haplotipova takođe je dobijena slična distribucija kod obolelih od CVID i zdravih kontrola,
- nije utvrđena korelacija alela, genotipova kao ni haplotipova sa kliničkim fenotipom.

3. Ispitivanjem rs1800795 polimorfizma gena za IL-6:

- utvrđeno je da se frekvencija G alela statistički značajno razlikovala u grupi pacijenata sa CVID u odnosu na kontrolnu grupu,
- nije utvrđena statistički značajna korelacija u distribuciji alela i genotipova prema kliničkom fenotipu bolesti.

4. Ispitivanjem polimorfizma gena za IFN-gama (rs2430561):

- nije nađena statistički značajna razlika u distribuciji alela i genotipova ovog polimorfizma između pacijenata sa CVID i kontrolne grupe,
- nađena je asocijacija između T alela i povećanog rizika za razvoj splenomegalije kod pacijenata sa CVID.

5. Učestalost alela ispitivanih polimorfizama gena za IL-10 i IL-6 kod zdravih osoba u Srbiji se značajno razlikuje u odnosu na populacije zdravih osoba na geografski udaljenim teritorijama i različitog etničkog porekla.

6. Ispitivanjem produkcije citokina u supernatantu nakon stimulacije PBMC:

- nađena je statistički visoko značajna razlika u produkciji TNF *in vitro* kod pacijenata sa CVID u odnosu na zdrave kontrole nakon stimulacije PBMC, što govori u prilog povećane produkcije TNF od strane PBMC obolelih od CVID,

- registrovane su niže vrednosti IL-10 kod pacijenata sa CVID u odnosu na zdrave kontrole ali bez statističke značajnosti,

- dobijena je statistički značajna razlika u produkciji IL-6 kod pacijenata sa CVID, kod kojih su izmerene više vrednosti, u odnosu na zdrave kontrole.

- nađena je nešto viša produkcija IFN-gama kod pacijenata sa CVID u odnosu na zdrave kontrole ali nađena razlika nije statistički značajna.

7. Korelacijom genotipova za ispitivane polimorfizme sa produkcijom odgovarajućeg citokina kod pacijenata sa CVID nije dobijena statistički značajna korelacija u rezultatima.

7 LITERATURA

1. Adelman DC, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T, Saxon A, 1990. Elevated serum interleukin-6 associated with a failure in B cell differentiation in common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* 86, 512-521. [[PubMed](#)]
2. Agarwal S, Cunningham-Rundles C, 2009. Autoimmunity in common variable immunodeficiency. *Curr Allergy Asthma Rep* 9, 347-352. [[PubMed](#)]
3. Agarwal S, Mayer L, 2009. Pathogenesis and treatment of gastrointestinal disease in antibody deficiency syndromes. *J Allergy Clin Immunol* 124, 658-664. [[PubMed](#)]
4. Ahn S, Cunningham-Rundles C, 2009. Role of B cells in common variable immune deficiency. *Expert Rev Clin Immunol* 5, 557-564. [[PubMed](#)]
5. Alangari A, Alsultan A, Adly N, Massaad MJ, Kiani IS, Aljebreen A, Raddaoui E, Almomen AK, Al-Muhsen S, Geha RS, Alkuraya FS, 2012. LPS-responsive beige-like anchor (LRBA) gene mutation in a family with inflammatory bowel disease and combined immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* 130, 481-488 e482. [[PubMed](#)]
6. Alkhairy OK, Abolhassani H, Rezaei N, Fang M, Andersen KK, Chavoshzadeh Z, Mohammadzadeh I, El-Rajab MA, Massaad M, Chou J, Aghamohammadi A, Geha RS, Hammarstrom L, 2016. Spectrum of Phenotypes Associated with Mutations in LRBA. *J Clin Immunol* 36, 33-45. [[PubMed](#)]
7. Alkhairy OK, Rezaei N, Graham RR, Abolhassani H, Borte S, Hultenby K, Wu C, Aghamohammadi A, Williams DA, Behrens TW, Hammarstrom L, Pan-Hammarstrom Q, 2015. RAC2 loss-of-function mutation in 2 siblings with characteristics of common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* 135, 1380-1384 e1381-1385. [[PubMed](#)]
8. Angulo I, Vadas O, Garcon F, Banham-Hall E, Plagnol V, Leahy TR, Baxendale H, Coulter T, Curtis J, Wu C, Blake-Palmer K, Perisic O, Smyth D, Maes M, Fiddler C, Juss J, Cilliers D, Markelj G, Chandra A, Farmer G, Kielkowska A, Clark J, Kracker S, Debre M, Picard C, Pellier I, Jabado N, Morris JA, Barcenas-Morales G, Fischer A, Stephens L, Hawkins P, Barrett JC, Abinun M, Clatworthy M, Durandy A, Doffinger R, Chilvers ER, Cant AJ, Kumararatne D, Okkenhaug K, Williams RL, Condliffe A, Nejentsev S, 2013. Phosphoinositide 3-kinase delta gene mutation predisposes to respiratory infection and airway damage. *Science* 342, 866-871. [[PubMed](#)]
9. Ardeniz O, Cunningham-Rundles C, 2009. Granulomatous disease in common variable immunodeficiency. *Clin Immunol* 133, 198-207. [[PubMed](#)]
10. Aspalter RM, Sewell WA, Dolman K, Farrant J, Webster AD, 2000. Deficiency in circulating natural killer (NK) cell subsets in common variable immunodeficiency and X-linked agammaglobulinaemia. *Clin Exp Immunol* 121, 506-514. [[PubMed](#)]
11. Aukrust P, Lien E, Kristoffersen AK, Muller F, Haug CJ, Espevik T, Froland SS, 1996. Persistent activation of the tumor necrosis factor system in a subgroup of patients

with common variable immunodeficiency--possible immunologic and clinical consequences. *Blood* 87, 674-681. [[PubMed](#)]

12. Barsotti NS, Almeida RR, Costa PR, Barros MT, Kalil J, Kokron CM, 2016. IL-10-Producing Regulatory B Cells Are Decreased in Patients with Common Variable Immunodeficiency. *PLoS One* 11, e0151761. [[PubMed](#)]

13. Bates CA, Ellison MC, Lynch DA, Cool CD, Brown KK, Routes JM, 2004. Granulomatous-lymphocytic lung disease shortens survival in common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* 114, 415-421. [[PubMed](#)]

14. Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD, Galicier L, Lepelletier Y, Webster D, Levy Y, Eibl MM, Oksenhendler E, Hermine O, Kaveri SV, 2004. Common variable immunodeficiency is associated with defective functions of dendritic cells. *Blood* 104, 2441-2443. [[PubMed](#)]

15. Bazzaz JT, Amoli MM, Taheri Z, Larijani B, Pravica V, Hutchinson IV, 2014. TNF-alpha and IFN-gamma gene variation and genetic susceptibility to type 1 diabetes and its microangiopathic complications. *J Diabetes Metab Disord* 13, 46. [[PubMed](#)]

16. Berron-Ruiz L, Lopez-Herrera G, Vargas-Hernandez A, Santos-Argumedo L, Lopez-Macias C, Isibasi A, Segura-Mendez NH, Bonifaz L, 2016. Impaired selective cytokine production by CD4 T cells in Common Variable Immunodeficiency associated with the absence of memory B cells. *Clin Immunol*. [[PubMed](#)]

17. Bogaert DJ, Dullaers M, Lambrecht BN, Vermaelen KY, De Baere E, Haerynck F, 2016. Genes associated with common variable immunodeficiency: one diagnosis to rule them all? *J Med Genet*. [[PubMed](#)]

18. Boileau J, Mouillot G, Gerard L, Carmagnat M, Rabian C, Oksenhendler E, Pasquali JL, Korganow AS, Group DS, 2011. Autoimmunity in common variable immunodeficiency: correlation with lymphocyte phenotype in the French DEFI study. *J Autoimmun* 36, 25-32. [[PubMed](#)]

19. Bonilla FA, Barlan I, Chapel H, Costa-Carvalho BT, Cunningham-Rundles C, de la Morena MT, Espinosa-Rosales FJ, Hammarstrom L, Nonoyama S, Quinti I, Routes JM, Tang ML, Warnatz K, 2016. International Consensus Document (ICON): Common Variable Immunodeficiency Disorders. *J Allergy Clin Immunol Pract* 4, 38-59. [[PubMed](#)]

20. Boutboul D, Vince N, Mahevas M, Bories JC, Fieschi C, Def ISG, 2016. TNFA, ANXA11 and BTNL2 Polymorphisms in CVID Patients with Granulomatous Disease. *J Clin Immunol* 36, 110-112. [[PubMed](#)]

21. Boyle JM, Buckley RH, 2007. Population prevalence of diagnosed primary immunodeficiency diseases in the United States. *J Clin Immunol* 27, 497-502. [[PubMed](#)]

22. Brouet JC, Chedeville A, Fermanand JP, Royer B, 2000. Study of the B cell memory compartment in common variable immunodeficiency. *Eur J Immunol* 30, 2516-2520. [[PubMed](#)]
23. C. Seifart AD, A. Plagens, U. Seifart, U. Clostermann, B. Müller, C. Vogelmeier, P. von Wichert., 2005. TNF- α -, TNF- β -, IL-6-, and IL-10-promoter polymorphisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Tissue Antigens* 65, 93-100.
24. Cardon LR, Bell JI, 2001. Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet* 2, 91-99. [[PubMed](#)]
25. Cardoso CC, Pereira AC, Brito-de-Souza VN, Dias-Baptista IM, Maniero VC, Venturini J, Vilani-Moreno FR, de Souza FC, Ribeiro-Alves M, Sarno EN, Pacheco AG, Moraes MO, 2010. IFNG +874 T>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians. *Hum Genet* 128, 481-490. [[PubMed](#)]
26. Cartwright N, Demaine A, Jahromi M, Sanders H, Kaminski ER, 1999. A study of cytokine protein secretion, frequencies of cytokine expressing cells and IFN- γ gene polymorphisms in normal individuals. *Transplantation* 68, 1546-1552. [[PubMed](#)]
27. Castigli E, Wilson SA, Garibyan L, Rachid R, Bonilla F, Schneider L, Geha RS, 2005. TACI is mutant in common variable immunodeficiency and IgA deficiency. *Nat Genet* 37, 829-834. [[PubMed](#)]
28. Chapel H, Lucas M, Lee M, Bjorkander J, Webster D, Grimbacher B, Fieschi C, Thon V, Abedi MR, Hammarstrom L, 2008. Common variable immunodeficiency disorders: division into distinct clinical phenotypes. *Blood* 112, 277-286. [[PubMed](#)]
29. Chapel H, Lucas M, Patel S, Lee M, Cunningham-Rundles C, Resnick E, Gerard L, Oksenhendler E, 2012. Confirmation and improvement of criteria for clinical phenotyping in common variable immunodeficiency disorders in replicate cohorts. *J Allergy Clin Immunol* 130, 1197-1198 e1199. [[PubMed](#)]
30. Chen K, Coonrod EM, Kumanovics A, Franks ZF, Durtschi JD, Margraf RL, Wu W, Heikal NM, Augustine NH, Ridge PG, Hill HR, Jorde LB, Weyrich AS, Zimmerman GA, Gundlapalli AV, Bohnsack JF, Voelkerding KV, 2013. Germline mutations in NFKB2 implicate the noncanonical NF- κ B pathway in the pathogenesis of common variable immunodeficiency. *Am J Hum Genet* 93, 812-824. [[PubMed](#)]
31. Chua I, Standish R, Lear S, Harbord M, Eren E, Raeiszadeh M, Workman S, Webster D, 2007. Anti-tumour necrosis factor- α therapy for severe enteropathy in patients with common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Exp Immunol* 150, 306-311. [[PubMed](#)]
32. Cols M, Rahman A, Maglione PJ, Garcia-Carmona Y, Simchoni N, Ko HB, Radigan L, Cerutti A, Blankenship D, Pascual V, Cunningham-Rundles C, 2016.

Expansion of inflammatory innate lymphoid cells in patients with common variable immune deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 137, 1206-1215 e1206. [[PubMed](#)]

33. Conley ME, Notarangelo LD, Etzioni A, 1999. Diagnostic criteria for primary immunodeficiencies. Representing PAGID (Pan-American Group for Immunodeficiency) and ESID (European Society for Immunodeficiencies). *Clin Immunol* 93, 190-197. [[PubMed](#)]

34. Cooper GM, Zerr T, Kidd JM, Eichler EE, Nickerson DA, 2008. Systematic assessment of copy number variant detection via genome-wide SNP genotyping. *Nat Genet* 40, 1199-1203. [[PubMed](#)]

35. Costeas PA, Koumas L, Koumouli A, Kyriakou-Giantsiou A, Papaloizou A, 2003. Cytokine polymorphism frequencies in the Greek Cypriot population. *Eur J Immunogenet* 30, 341-343. [[PubMed](#)]

36. Cunningham-Rundles C, 2010. How I treat common variable immune deficiency. *Blood* 116, 7-15. [[PubMed](#)]

37. Cunningham-Rundles C, 2012. The many faces of common variable immunodeficiency. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012, 301-305. [[PubMed](#)]

38. Cunningham-Rundles C, Bodian C, 1999. Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients. *Clin Immunol* 92, 34-48. [[PubMed](#)]

39. da Silva HD, da Silva AP, da Silva HA, Asano NM, Maia Mde M, de Souza PR, 2014. Interferon gamma and Interleukin 10 polymorphisms in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. *Mol Biol Rep* 41, 2493-2500. [[PubMed](#)]

40. Daniels JA, Lederman HM, Maitra A, Montgomery EA, 2007. Gastrointestinal tract pathology in patients with common variable immunodeficiency (CVID): a clinicopathologic study and review. *Am J Surg Pathol* 31, 1800-1812. [[PubMed](#)]

41. de Albuquerque AC, Rocha LQ, de Moraes Batista AH, Teixeira AB, Dos Santos DB, Nogueira NA, 2012. Association of polymorphism +874 A/T of interferon-gamma and susceptibility to the development of tuberculosis: meta-analysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31, 2887-2895. [[PubMed](#)]

42. Elgizouli M, Lowe DM, Speckmann C, Schubert D, Hulsdunker J, Eskandarian Z, Dudek A, Schmitt-Graeff A, Wanders J, Jorgensen SF, Fevang B, Salzer U, Nieters A, Burns S, Grimbacher B, 2016. Activating PI3Kdelta mutations in a cohort of 669 patients with primary immunodeficiency. *Clin Exp Immunol* 183, 221-229. [[PubMed](#)]

43. Engelhardt KR, Shah N, Faizura-Yeop I, Kocacik Uygun DF, Frede N, Muise AM, Shteyer E, Filiz S, Chee R, Elawad M, Hartmann B, Arkwright PD, Dvorak C, Klein C, Puck JM, Grimbacher B, Glocker EO, 2013. Clinical outcome in IL-10- and IL-10

receptor-deficient patients with or without hematopoietic stem cell transplantation. *J Allergy Clin Immunol* 131, 825-830. [[PubMed](#)]

44. ESID 2015. Revised European society of immune deficiencies (ESID) registry (2014) criteria.

45. Excoffier L, Lischer HE, 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour* 10, 564-567. [[PubMed](#)]

46. Fevang B, Yndestad A, Sandberg WJ, Holm AM, Muller F, Aukrust P, Froland SS, 2007. Low numbers of regulatory T cells in common variable immunodeficiency: association with chronic inflammation in vivo. *Clin Exp Immunol* 147, 521-525. [[PubMed](#)]

47. Fialho RN, Martins L, Pinheiro JP, Bettencourt BF, Couto AR, Santos MR, Peixoto MJ, Garrett F, Leal J, Tomas AM, Bruges-Armas J, 2009. Role of human leukocyte antigen, killer-cell immunoglobulin-like receptors, and cytokine gene polymorphisms in leptospirosis. *Hum Immunol* 70, 915-920. [[PubMed](#)]

48. Finck A, Van der Meer JW, Schaffer AA, Pfannstiel J, Fieschi C, Plebani A, Webster AD, Hammarstrom L, Grimbacher B, 2006. Linkage of autosomal-dominant common variable immunodeficiency to chromosome 4q. *Eur J Hum Genet* 14, 867-875. [[PubMed](#)]

49. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P, 1998. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 102, 1369-1376. [[PubMed](#)]

50. Fliegauf M, Bryant VL, Frede N, Slade C, Woon ST, Lehnert K, Winzer S, Bulashevskaya A, Scerri T, Leung E, Jordan A, Keller B, de Vries E, Cao H, Yang F, Schaffer AA, Warnatz K, Browett P, Douglass J, Ameratunga RV, van der Meer JW, Grimbacher B, 2015. Haploinsufficiency of the NF-kappaB1 Subunit p50 in Common Variable Immunodeficiency. *Am J Hum Genet* 97, 389-403. [[PubMed](#)]

51. Franke A, McGovern DP, Barrett JC, Wang K, Radford-Smith GL, Ahmad T, Lees CW, Balschun T, Lee J, Roberts R, Anderson CA, Bis JC, Bumpstead S, Ellinghaus D, Festen EM, Georges M, Green T, Haritunians T, Jostins L, Latiano A, Mathew CG, Montgomery GW, Prescott NJ, Raychaudhuri S, Rotter JI, Schumm P, Sharma Y, Simms LA, Taylor KD, Whiteman D, Wijmenga C, Baldassano RN, Barclay M, Bayless TM, Brand S, Buning C, Cohen A, Colombel JF, Cottone M, Stronati L, Denson T, De Vos M, D'Inca R, Dubinsky M, Edwards C, Florin T, Franchimont D, Geary R, Glas J, Van Gossom A, Guthery SL, Halfvarson J, Verspaget HW, Hugot JP, Karban A, Laukens D, Lawrance I, Lemann M, Levine A, Libioulle C, Louis E, Mowat C, Newman W, Panes J, Phillips A, Proctor DD, Regueiro M, Russell R, Rutgeerts P, Sanderson J, Sans M, Seibold F, Steinhardt AH, Stokkers PC, Torkvist L, Kullak-Ublick G, Wilson D, Walters T, Targan SR, Brant SR, Rioux JD, D'Amato M, Weersma RK,

Kugathasan S, Griffiths AM, Mansfield JC, Vermeire S, Duerr RH, Silverberg MS, Satsangi J, Schreiber S, Cho JH, Annese V, Hakonarson H, Daly MJ, Parkes M, 2010. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genet* 42, 1118-1125. [[PubMed](#)]

52. Franxman TJ, Howe LE, Baker JR, Jr., 2014. Infliximab for treatment of granulomatous disease in patients with common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol* 34, 820-827. [[PubMed](#)]

53. Fudenberg H, Good RA, Goodman HC, Hitzig W, Kunkel HG, Roitt IM, Rosen FS, Rowe DS, Seligmann M, Soothill JR, 1971. Primary immunodeficiencies. Report of a World Health Organization Committee. *Pediatrics* 47, 927-946. [[PubMed](#)]

54. Gamez-Diaz L, August D, Stepensky P, Revel-Vilk S, Seidel MG, Noriko M, Morio T, Worth AJ, Blessing J, Van de Veerdonk F, Feuchtinger T, Kanariou M, Schmitt-Graeff A, Jung S, Seneviratne S, Burns S, Belohradsky BH, Rezaei N, Bakhtiar S, Speckmann C, Jordan M, Grimbacher B, 2016. The extended phenotype of LPS-responsive beige-like anchor protein (LRBA) deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 137, 223-230. [[PubMed](#)]

55. Gathmann B, Binder N, Ehl S, Kindle G, Party ERW, 2012. The European internet-based patient and research database for primary immunodeficiencies: update 2011. *Clin Exp Immunol* 167, 479-491. [[PubMed](#)]

56. Gathmann B, Mahlaoui N, Ceredih, Gerard L, Oksenhendler E, Warnatz K, Schulze I, Kindle G, Kuijpers TW, Dutch WID, van Beem RT, Guzman D, Workman S, Soler-Palacin P, De Gracia J, Witte T, Schmidt RE, Litzman J, Hlavackova E, Thon V, Borte M, Borte S, Kumararatne D, Feighery C, Longhurst H, Helbert M, Szaflarska A, Sediva A, Belohradsky BH, Jones A, Baumann U, Meyts I, Kutukculer N, Wagstrom P, Galal NM, Roesler J, Farmaki E, Zinovieva N, Ciznar P, Papadopoulou-Alataki E, Bienemann K, Velbri S, Panahloo Z, Grimbacher B, European Society for Immunodeficiencies Registry Working P, 2014. Clinical picture and treatment of 2212 patients with common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* 134, 116-126. [[PubMed](#)]

57. Genin E, Feingold J, Clerget-Darpoux F, 2008. Identifying modifier genes of monogenic disease: strategies and difficulties. *Hum Genet* 124, 357-368. [[PubMed](#)]

58. Giovannetti A, Pierdominici M, Aiuti F, 2008. T-cell homeostasis: the dark(ened) side of common variable immunodeficiency. *Blood* 112, 446; author reply 446-447. [[PubMed](#)]

59. Giovannetti A, Pierdominici M, Mazzetta F, Marziali M, Renzi C, Mileo AM, De Felice M, Mora B, Esposito A, Carello R, Pizzuti A, Paggi MG, Paganelli R, Malorni W, Aiuti F, 2007. Unravelling the complexity of T cell abnormalities in common variable immunodeficiency. *J Immunol* 178, 3932-3943. [[PubMed](#)]

60. Glocker EO, Frede N, Perro M, Sebire N, Elawad M, Shah N, Grimbacher B, 2010. Infant colitis--it's in the genes. *Lancet* 376, 1272. [[PubMed](#)]

61. Glocker EO, Kotlarz D, Boztug K, Gertz EM, Schaffer AA, Noyan F, Perro M, Diestelhorst J, Allroth A, Murugan D, Hatscher N, Pfeifer D, Sykora KW, Sauer M, Kreipe H, Lacher M, Nustede R, Woellner C, Baumann U, Salzer U, Koletzko S, Shah N, Segal AW, Sauerbrey A, Buderus S, Snapper SB, Grimbacher B, Klein C, 2009. Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *N Engl J Med* 361, 2033-2045. [[PubMed](#)]
62. Gonzalez-Gay MA, Hajeer AH, Dababneh A, Garcia-Porrúa C, Matthey DL, Amoli MM, Thomson W, Ollier WE, 2002. IL-6 promoter polymorphism at position -174 modulates the phenotypic expression of polymyalgia rheumatica in biopsy-proven giant cell arteritis. *Clin Exp Rheumatol* 20, 179-184. [[PubMed](#)]
63. Griffiths A, Miller J, Suzuki D, Lewontin R, Gelbart W, 2000. An introduction to genetic analysis. New York: W. H. Freeman and company 7th eds.
64. Grimbacher B, Hutloff A, Schlesier M, Glocker E, Warnatz K, Dräger R, Eibel H, Fischer B, Schaffer AA, Mages HW, Kroczeck RA, Peter HH, 2003. Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. *Nat Immunol* 4, 261-268. [[PubMed](#)]
65. Guarnizo-Zuccardi P, Lopez Y, Giraldo M, Garcia N, Rodriguez L, Ramirez L, Uribe O, Garcia L, Vasquez G, 2007. Cytokine gene polymorphisms in Colombian patients with systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 70, 376-382. [[PubMed](#)]
66. Hauber I, Fischer MB, Eibl MM, 1993. Patients with common variable immunodeficiency (CVID) display aberrant IL-2 and IFN-gamma mRNA levels. *Immunodeficiency* 4, 25-29. [[PubMed](#)]
67. Hindorff LA, Sethupathy P, Junkins HA, Ramos EM, Mehta JP, Collins FS, Manolio TA, 2009. Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 9362-9367. [[PubMed](#)]
68. Hoffmann SC, Stanley EM, Darrin Cox E, Craighead N, DiMercurio BS, Koziol DE, Harlan DM, Kirk AD, Blair PJ, 2001. Association of cytokine polymorphic inheritance and in vitro cytokine production in anti-CD3/CD28-stimulated peripheral blood lymphocytes. *Transplantation* 72, 1444-1450. [[PubMed](#)]
69. Holm AM, Aukrust P, Aandahl EM, Muller F, Tasken K, Froland SS, 2003. Impaired secretion of IL-10 by T cells from patients with common variable immunodeficiency--involvement of protein kinase A type I. *J Immunol* 170, 5772-5777. [[PubMed](#)]
70. Hong R, Agrawal S, Gollapudi S, Gupta S, 2010. Impaired pneumovax-23-induced monocyte-derived cytokine production in patients with common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol* 30, 435-441. [[PubMed](#)]

71. Hua F, Ji L, Zhan Y, Li F, Zou S, Chen L, Gao S, Li Y, Chen H, Cheng Y, 2014. Aberrant frequency of IL-10-producing B cells and its association with Treg/Th17 in adult primary immune thrombocytopenia patients. *Biomed Res Int* 2014, 571302. [[PubMed](#)]
72. Huizinga TW, Westendorp RG, Bollen EL, Keijsers V, Brinkman BM, Langermans JA, Breedveld FC, Verweij CL, van de Gaer L, Dams L, Crusius JB, Garcia-Gonzalez A, van Oosten BW, Polman CH, Pena AS, 1997. TNF-alpha promoter polymorphisms, production and susceptibility to multiple sclerosis in different groups of patients. *J Neuroimmunol* 72, 149-153. [[PubMed](#)]
73. Hunter CA, Jones SA, 2015. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol* 16, 448-457. [[PubMed](#)]
74. Huth C, Illig T, Herder C, Gieger C, Grallert H, Vollmert C, Rathmann W, Hamid YH, Pedersen O, Hansen T, Thorand B, Meisinger C, Doring A, Klopp N, Gohlke H, Lieb W, Hengstenberg C, Lyssenko V, Groop L, Ireland H, Stephens JW, Wernstedt Asterholm I, Jansson JO, Boeing H, Mohlig M, Stringham HM, Boehnke M, Tuomilehto J, Fernandez-Real JM, Lopez-Bermejo A, Gallart L, Vendrell J, Humphries SE, Kronenberg F, Wichmann HE, Heid IM, 2009. Joint analysis of individual participants' data from 17 studies on the association of the IL6 variant -174G>C with circulating glucose levels, interleukin-6 levels, and body mass index. *Ann Med* 41, 128-138. [[PubMed](#)]
75. Ibanez C, Sune P, Fierro A, Rodriguez S, Lopez M, Alvarez A, De Gracia J, Montoro JB, 2005. Modulating effects of intravenous immunoglobulins on serum cytokine levels in patients with primary hypogammaglobulinemia. *BioDrugs* 19, 59-65. [[PubMed](#)]
76. Inoue Y, Kondo N, Motoyoshi F, Inoue R, Orii T, 1994. Interleukin-2 and interferon-gamma production by peripheral blood lymphocytes of patients with common variable immunodeficiency. *J Investig Allergol Clin Immunol* 4, 122-125. [[PubMed](#)]
77. International MHC, Autoimmunity Genetics N, Rioux JD, Goyette P, Vyse TJ, Hammarstrom L, Fernando MM, Green T, De Jager PL, Foisy S, Wang J, de Bakker PI, Leslie S, McVean G, Padyukov L, Alfredsson L, Annese V, Hafler DA, Pan-Hammarstrom Q, Matell R, Sawcer SJ, Compston AD, Cree BA, Mirel DB, Daly MJ, Behrens TW, Klareskog L, Gregersen PK, Oksenberg JR, Hauser SL, 2009. Mapping of multiple susceptibility variants within the MHC region for 7 immune-mediated diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 18680-18685. [[PubMed](#)]
78. International Union of Immunological Societies Expert Committee on Primary I, Notarangelo LD, Fischer A, Geha RS, Casanova JL, Chapel H, Conley ME, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, Hammarstrom L, Nonoyama S, Ochs HD, Puck J, Roifman C, Seger R, Wedgwood J, 2009. Primary immunodeficiencies: 2009 update. *J Allergy Clin Immunol* 124, 1161-1178. [[PubMed](#)]

79. Isgro A, Marziali M, Mezzaroma I, Luzi G, Mazzone AM, Guazzi V, Andolfi G, Cassani B, Aiuti A, Aiuti F, 2005. Bone marrow clonogenic capability, cytokine production, and thymic output in patients with common variable immunodeficiency. *J Immunol* 174, 5074-5081. [[PubMed](#)]
80. Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M, Dilillo DJ, Yanaba K, Venturi GM, Szabolcs PM, Bernstein SH, Magro CM, Williams AD, Hall RP, St Clair EW, Tedder TF, 2011. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood* 117, 530-541. [[PubMed](#)]
81. Jolles S, 2013. The variable in common variable immunodeficiency: a disease of complex phenotypes. *J Allergy Clin Immunol Pract* 1, 545-556; quiz 557. [[PubMed](#)]
82. Jourdan M, Cren M, Robert N, Bollere K, Fest T, Duperray C, Guilloton F, Hose D, Tarte K, Klein B, 2014. IL-6 supports the generation of human long-lived plasma cells in combination with either APRIL or stromal cell-soluble factors. *Leukemia* 28, 1647-1656. [[PubMed](#)]
83. Kanegane H, Agematsu K, Futatani T, Sira MM, Suga K, Sekiguchi T, van Zelm MC, Miyawaki T, 2007. Novel mutations in a Japanese patient with CD19 deficiency. *Genes Immun* 8, 663-670. [[PubMed](#)]
84. Kasztalska K, Ciebiada M, Cebula-Obrzut B, Gorski P, 2011. Intravenous immunoglobulin replacement therapy in the treatment of patients with common variable immunodeficiency disease: an open-label prospective study. *Clin Drug Investig* 31, 299-307. [[PubMed](#)]
85. Kelsen JR, Dawany N, Moran CJ, Petersen BS, Sarmady M, Sasson A, Pauly-Hubbard H, Martinez A, Maurer K, Soong J, Rappaport E, Franke A, Keller A, Winter HS, Mamula P, Piccoli D, Artis D, Sonnenberg GF, Daly M, Sullivan KE, Baldassano RN, Devoto M, 2015. Exome sequencing analysis reveals variants in primary immunodeficiency genes in patients with very early onset inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 149, 1415-1424. [[PubMed](#)]
86. Khabour OF, Barnawi JM, 2010. Association of longevity with IL-10 -1082 G/A and TNF-alpha-308 G/A polymorphisms. *Int J Immunogenet* 37, 293-298. [[PubMed](#)]
87. Kimura A, Kishimoto T, 2010. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol* 40, 1830-1835. [[PubMed](#)]
88. Kotlarz D, Zietara N, Milner JD, Klein C, 2014. Human IL-21 and IL-21R deficiencies: two novel entities of primary immunodeficiency. *Curr Opin Pediatr* 26, 704-712. [[PubMed](#)]
89. Kotlarz D, Zietara N, Uzel G, Weidemann T, Braun CJ, Diestelhorst J, Krawitz PM, Robinson PN, Hecht J, Puchalka J, Gertz EM, Schaffer AA, Lawrence MG, Kardava L, Pfeifer D, Baumann U, Pfister ED, Hanson EP, Schambach A, Jacobs R, Kreipe H, Moir S, Milner JD, Schwille P, Mundlos S, Klein C, 2013. Loss-of-function mutations

in the IL-21 receptor gene cause a primary immunodeficiency syndrome. *J Exp Med* 210, 433-443. [[PubMed](#)]

90. Kubota T, McNamara DM, Wang JJ, Trost M, McTiernan CF, Mann DL, Feldman AM, 1998. Effects of tumor necrosis factor gene polymorphisms on patients with congestive heart failure. VEST Investigators for TNF Genotype Analysis. Vesnarinone Survival Trial. *Circulation* 97, 2499-2501. [[PubMed](#)]

91. Kuehn HS, Boisson B, Cunningham-Rundles C, Reichenbach J, Stray-Pedersen A, Gelfand EW, Maffucci P, Pierce KR, Abbott JK, Voelkerding KV, South ST, Augustine NH, Bush JS, Dolen WK, Wray BB, Itan Y, Cobat A, Sorte HS, Ganesan S, Prader S, Martins TB, Lawrence MG, Orange JS, Calvo KR, Niemela JE, Casanova JL, Fleisher TA, Hill HR, Kumanovics A, Conley ME, Rosenzweig SD, 2016. Loss of B Cells in Patients with Heterozygous Mutations in IKAROS. *N Engl J Med* 374, 1032-1043. [[PubMed](#)]

92. Kuehn HS, Ouyang W, Lo B, Deenick EK, Niemela JE, Avery DT, Schickel JN, Tran DQ, Stoddard J, Zhang Y, Frucht DM, Dumitriu B, Scheinberg P, Folio LR, Frein CA, Price S, Koh C, Heller T, Seroogy CM, Huttenlocher A, Rao VK, Su HC, Kleiner D, Notarangelo LD, Rampertaap Y, Olivier KN, McElwee J, Hughes J, Pittaluga S, Oliveira JB, Meffre E, Fleisher TA, Holland SM, Lenardo MJ, Tangye SG, Uzel G, 2014. Immune dysregulation in human subjects with heterozygous germline mutations in CTLA4. *Science* 345, 1623-1627. [[PubMed](#)]

93. Kuijpers TW, Bende RJ, Baars PA, Grummels A, Derks IA, Dolman KM, Beaumont T, Tedder TF, van Noesel CJ, Eldering E, van Lier RA, 2010. CD20 deficiency in humans results in impaired T cell-independent antibody responses. *J Clin Invest* 120, 214-222. [[PubMed](#)]

94. Lee WY, Chang YH, Lo MK, Chang CP, Yang SC, Yang TP, Ho KT, Juan CW, Shiau MY, 2010. Polymorphisms of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4 and cytokine genes in Taiwanese patients with ankylosing spondylitis. *Tissue Antigens* 75, 119-126. [[PubMed](#)]

95. Li J, Jorgensen SF, Maggadottir SM, Bakay M, Warnatz K, Glessner J, Pandey R, Salzer U, Schmidt RE, Perez E, Resnick E, Goldacker S, Buchta M, Witte T, Padyukov L, Videm V, Folseraas T, Atschekzei F, Elder JT, Nair RP, Winkelmann J, Gieger C, Nothen MM, Buning C, Brand S, Sullivan KE, Orange JS, Fevang B, Schreiber S, Lieb W, Aukrust P, Chapel H, Cunningham-Rundles C, Franke A, Karlsen TH, Grimbacher B, Hakonarson H, Hammarstrom L, Ellinghaus E, 2015. Association of CLEC16A with human common variable immunodeficiency disorder and role in murine B cells. *Nat Commun* 6, 6804. [[PubMed](#)]

96. Li WH, Sadler LA, 1991. Low nucleotide diversity in man. *Genetics* 129, 513-523. [[PubMed](#)]

97. Ling V, Wu PW, Finnerty HF, Agostino MJ, Graham JR, Chen S, Jussiff JM, Fisk GJ, Miller CP, Collins M, 2001. Assembly and annotation of human chromosome 2q33

sequence containing the CD28, CTLA4, and ICOS gene cluster: analysis by computational, comparative, and microarray approaches. *Genomics* 78, 155-168. [[PubMed](#)]

98. Lio D, Marino V, Serauto A, Gioia V, Scola L, Crivello A, Forte GI, Colonna-Romano G, Candore G, Caruso C, 2002. Genotype frequencies of the +874T-->A single nucleotide polymorphism in the first intron of the interferon-gamma gene in a sample of Sicilian patients affected by tuberculosis. *Eur J Immunogenet* 29, 371-374. [[PubMed](#)]

99. Liu Y, Hanson S, Gurugama P, Jones A, Clark B, Ibrahim MA, 2014. Novel NFKB2 mutation in early-onset CVID. *J Clin Immunol* 34, 686-690. [[PubMed](#)]

100. Lo B, Zhang K, Lu W, Zheng L, Zhang Q, Kanellopoulou C, Zhang Y, Liu Z, Fritz JM, Marsh R, Husami A, Kissell D, Nortman S, Chaturvedi V, Haines H, Young LR, Mo J, Filipovich AH, Blesing JJ, Mustillo P, Stephens M, Rueda CM, Chougnet CA, Hoebe K, McElwee J, Hughes JD, Karakoc-Aydiner E, Matthews HF, Price S, Su HC, Rao VK, Lenardo MJ, Jordan MB, 2015. AUTOIMMUNE DISEASE. Patients with LRBA deficiency show CTLA4 loss and immune dysregulation responsive to abatacept therapy. *Science* 349, 436-440. [[PubMed](#)]

101. Lopez-Herrera G, Tampella G, Pan-Hammarstrom Q, Herholz P, Trujillo-Vargas CM, Phadwal K, Simon AK, Moutschen M, Etzioni A, Mory A, Srugo I, Melamed D, Hultenby K, Liu C, Baronio M, Vitali M, Philippet P, Dideberg V, Aghamohammadi A, Rezaei N, Enright V, Du L, Salzer U, Eibel H, Pfeifer D, Veelken H, Stauss H, Lougaris V, Plebani A, Gertz EM, Schaffer AA, Hammarstrom L, Grimbacher B, 2012. Deleterious mutations in LRBA are associated with a syndrome of immune deficiency and autoimmunity. *Am J Hum Genet* 90, 986-1001. [[PubMed](#)]

102. Lucas CL, Kuehn HS, Zhao F, Niemela JE, Deenick EK, Palendira U, Avery DT, Moens L, Cannons JL, Biancalana M, Stoddard J, Ouyang W, Frucht DM, Rao VK, Atkinson TP, Agharahimi A, Hussey AA, Folio LR, Olivier KN, Fleisher TA, Pittaluga S, Holland SM, Cohen JI, Oliveira JB, Tangye SG, Schwartzberg PL, Lenardo MJ, Uzel G, 2014. Dominant-activating germline mutations in the gene encoding the PI(3)K catalytic subunit p110delta result in T cell senescence and human immunodeficiency. *Nat Immunol* 15, 88-97. [[PubMed](#)]

103. Malamut G, Zioli M, Suarez F, Beaugrand M, Viallard JF, Lascaux AS, Verkarre V, Bechade D, Poynard T, Hermine O, Cellier C, 2008. Nodular regenerative hyperplasia: the main liver disease in patients with primary hypogammaglobulinemia and hepatic abnormalities. *J Hepatol* 48, 74-82. [[PubMed](#)]

104. Malphettes M, Gerard L, Carmagnat M, Mouillot G, Vince N, Boutboul D, Berezne A, Nove-Josserand R, Lemoing V, Tetu L, Viallard JF, Bonnotte B, Pavic M, Haroche J, Larroche C, Brouet JC, Feraud JP, Rabian C, Fieschi C, Oksenhendler E, Group DS, 2009. Late-onset combined immune deficiency: a subset of common variable immunodeficiency with severe T cell defect. *Clin Infect Dis* 49, 1329-1338. [[PubMed](#)]

105. Manry J, Laval G, Patin E, Fornarino S, Tichit M, Bouchier C, Barreiro LB, Quintana-Murci L, 2011. Evolutionary genetics evidence of an essential, nonredundant role of the IFN-gamma pathway in protective immunity. *Hum Mutat* 32, 633-642. [[PubMed](#)]
106. Martinez-Gallo M, Radigan L, Almejun MB, Martinez-Pomar N, Matamoros N, Cunningham-Rundles C, 2013. TACI mutations and impaired B-cell function in subjects with CVID and healthy heterozygotes. *J Allergy Clin Immunol* 131, 468-476. [[PubMed](#)]
107. Mellekjaer L, Hammarstrom L, Andersen V, Yuen J, Heilmann C, Barington T, Bjorkander J, Olsen JH, 2002. Cancer risk among patients with IgA deficiency or common variable immunodeficiency and their relatives: a combined Danish and Swedish study. *Clin Exp Immunol* 130, 495-500. [[PubMed](#)]
108. Morse HR, Olomolaiye OO, Wood NA, Keen LJ, Bidwell JL, 1999. Induced heteroduplex genotyping of TNF-alpha, IL-1beta, IL-6 and IL-10 polymorphisms associated with transcriptional regulation. *Cytokine* 11, 789-795. [[PubMed](#)]
109. Mullighan CG, Fanning GC, Chapel HM, Welsh KI, 1997. TNF and lymphotoxin-alpha polymorphisms associated with common variable immunodeficiency: role in the pathogenesis of granulomatous disease. *J Immunol* 159, 6236-6241. [[PubMed](#)]
110. Mullighan CG, Marshall SE, Bunce M, Welsh KI, 1999. Variation in immunoregulatory genes determines the clinical phenotype of common variable immunodeficiency. *Genes Immun* 1, 137-148. [[PubMed](#)]
111. Naidoo N, Pawitan Y, Soong R, Cooper DN, Ku CS, 2011. Human genetics and genomics a decade after the release of the draft sequence of the human genome. *Hum Genomics* 5, 577-622. [[PubMed](#)]
112. North ME, Ivory K, Funauchi M, Webster AD, Lane AC, Farrant J, 1996. Intracellular cytokine production by human CD4+ and CD8+ T cells from normal and immunodeficient donors using directly conjugated anti-cytokine antibodies and three-colour flow cytometry. *Clin Exp Immunol* 105, 517-522. [[PubMed](#)]
113. Novaković I, Maksimović N, Cvetković S, Cvetković D, 2010. Gene polymorphisms as markers of disease susceptibility. *J Med Biochem* 29, 135-138.
114. Oksenhendler E, Gerard L, Fieschi C, Malphettes M, Mouillot G, Jaussaud R, Viallard JF, Gardembas M, Galicier L, Schleinitz N, Suarez F, Soulas-Sprauel P, Hachulla E, Jaccard A, Gardeur A, Theodorou I, Rabian C, Debre P, Group DS, 2008. Infections in 252 patients with common variable immunodeficiency. *Clin Infect Dis* 46, 1547-1554. [[PubMed](#)]
115. Olerup O, Smith CI, Bjorkander J, Hammarstrom L, 1992. Shared HLA class II-associated genetic susceptibility and resistance, related to the HLA-DQB1 gene, in IgA

deficiency and common variable immunodeficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10653-10657. [[PubMed](#)]

116. Oliva A, Scala E, Quinti I, Paganelli R, Ansotegui IJ, Giovannetti A, Pierdominici M, Aiuti F, Pandolfi F, 1997. IL-10 production and CD40L expression in patients with common variable immunodeficiency. *Scand J Immunol* 46, 86-90. [[PubMed](#)]

117. Orange JS, Glessner JT, Resnick E, Sullivan KE, Lucas M, Ferry B, Kim CE, Hou C, Wang F, Chiavacci R, Kugathasan S, Sleasman JW, Baldassano R, Perez EE, Chapel H, Cunningham-Rundles C, Hakonarson H, 2011. Genome-wide association identifies diverse causes of common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* 127, 1360-1367 e1366. [[PubMed](#)]

118. Pandolfi F, Paganelli R, Cafaro A, Oliva A, Giovannetti A, Scala E, Quinti I, Aiuti F, 1993. Abnormalities of lymphocyte subpopulations in CVI do not correlate with increased production of IL-6. *Immunodeficiency* 4, 19-23. [[PubMed](#)]

119. Pandolfi F, Paganelli R, Oliva A, Quinti I, Polidori V, Fanales-Belasio E, Guerra E, Aiuti F, 1993. Increased IL-6 gene expression and production in patients with common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunol* 92, 239-244. [[PubMed](#)]

120. Park J, Munagala I, Xu H, Blankenship D, Maffucci P, Chaussabel D, Banchereau J, Pascual V, Cunningham-Rundles C, 2013. Interferon signature in the blood in inflammatory common variable immune deficiency. *PLoS One* 8, e74893. [[PubMed](#)]

121. Park JH, Levinson AI, 2010. Granulomatous-lymphocytic interstitial lung disease (GLILD) in common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Immunol* 134, 97-103. [[PubMed](#)]

122. Patente TA, Monteiro MB, Vieira SM, Rossi da Silva ME, Nery M, Queiroz M, Azevedo MJ, Canani LH, Parisi MC, Pavin EJ, Mainardi D, Javor J, Velho G, Coimbra CN, Correa-Giannella ML, 2015. Linkage disequilibrium with HLA-DRB1-DQB1 haplotypes explains the association of TNF-308G>A variant with type 1 diabetes in a Brazilian cohort. *Gene* 568, 50-54. [[PubMed](#)]

123. Picard C, Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, Chatila T, Conley ME, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, Holland SM, Klein C, Nonoyama S, Ochs HD, Oksenhendler E, Puck JM, Sullivan KE, Tang ML, Franco JL, Gaspar HB, 2015. Primary Immunodeficiency Diseases: an Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency 2015. *J Clin Immunol* 35, 696-726. [[PubMed](#)]

124. Pieper K, Rizzi M, Speletas M, Smulski CR, Sic H, Kraus H, Salzer U, Fiala GJ, Schamel WW, Lougaris V, Plebani A, Hammarstrom L, Recher M, Germeis AE, Grimbacher B, Warnatz K, Rolink AG, Schneider P, Notarangelo LD, Eibel H, 2014. A common single nucleotide polymorphism impairs B-cell activating factor receptor's multimerization, contributing to common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* 133, 1222-1225. [[PubMed](#)]

125. Piqueras B, Lavenu-Bombled C, Galicier L, Bergeron-van der Cruyssen F, Mouthon L, Chevret S, Debre P, Schmitt C, Oksenhendler E, 2003. Common variable immunodeficiency patient classification based on impaired B cell memory differentiation correlates with clinical aspects. *J Clin Immunol* 23, 385-400. [[PubMed](#)]
126. Pons J, Ferrer JM, Martinez-Pomar N, Iglesias-Alzueta J, Matamoros N, 2006. Costimulatory molecules and cytokine production by T lymphocytes in common variable immunodeficiency disease. *Scand J Immunol* 63, 383-389. [[PubMed](#)]
127. Popadic D, Savic E, Spuran Z, Markovic M, Mostarica Stojkovic M, Ramic Z, Pravica V, 2012. Distinctive frequencies of +874T/A IFN-gamma gene polymorphism in a healthy Serbian population. *Clin Transl Sci* 5, 461-463. [[PubMed](#)]
128. Popadic S, 2014. Genetski markeri inflamacije kod pacijenata sa psoriasis vulgaris. Doktorska disertacija, Beograd. Univerzitet u Beogradu, Beograd.
129. Popadic S, Savic E, Markovic M, Ramic Z, Medenica L, Pravica V, Spuran Z, Trajkovic V, Popadic D, 2015. TNF, IL12B, and IFNG Gene Polymorphisms in Serbian Patients with Psoriasis. *Ann Dermatol* 27, 128-132. [[PubMed](#)]
130. Pravica V, Asderakis A, Perrey C, Hajeer A, Sinnott PJ, Hutchinson IV, 1999. In vitro production of IFN-gamma correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN-gamma gene. *Eur J Immunogenet* 26, 1-3. [[PubMed](#)]
131. Pravica V, Perrey C, Stevens A, Lee JH, Hutchinson IV, 2000. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production. *Hum Immunol* 61, 863-866. [[PubMed](#)]
132. Ranganath P, Tripathi G, Sharma RK, Sankhwar SN, Agrawal S, 2009. Role of non-HLA genetic variants in end-stage renal disease. *Tissue Antigens* 74, 147-155. [[PubMed](#)]
133. Reid-Lombardo KM, Petersen GM, 2010. Understanding genetic epidemiologic association studies Part 1: fundamentals. *Surgery* 147, 469-474. [[PubMed](#)]
134. Rennick DM, Fort MM, Davidson NJ, 1997. Studies with IL-10^{-/-} mice: an overview. *J Leukoc Biol* 61, 389-396. [[PubMed](#)]
135. Resnick ES, Moshier EL, Godbold JH, Cunningham-Rundles C, 2012. Morbidity and mortality in common variable immune deficiency over 4 decades. *Blood* 119, 1650-1657. [[PubMed](#)]
136. Rezaei N, Aghamohammadi A, Mahmoudi M, Shakiba Y, Kardar GA, Mahmoudi M, Moradi B, Amirzargar AA, 2010. Association of IL-4 and IL-10 gene promoter polymorphisms with common variable immunodeficiency. *Immunobiology* 215, 81-87. [[PubMed](#)]

137. Rezaei N, Amirzargar AA, Shakiba Y, Mahmoudi M, Moradi B, Aghamohammadi A, 2009. Proinflammatory cytokine gene single nucleotide polymorphisms in common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunol* 155, 21-27. [[PubMed](#)]
138. Rizzi M, Neumann C, Fielding AK, Marks R, Goldacker S, Thaventhiran J, Tarzi MD, Schlesier M, Salzer U, Eibel H, Warnatz K, Finke J, Grimbacher B, Peter HH, 2011. Outcome of allogeneic stem cell transplantation in adults with common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* 128, 1371-1374 e1372. [[PubMed](#)]
139. Roach DR, Bean AG, Demangel C, France MP, Briscoe H, Britton WJ, 2002. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. *J Immunol* 168, 4620-4627. [[PubMed](#)]
140. Ronnblom L, Eloranta ML, 2013. The interferon signature in autoimmune diseases. *Curr Opin Rheumatol* 25, 248-253. [[PubMed](#)]
141. Ruiz-Linares A, 1993. Dinucleotide repeat polymorphism in the interferon-gamma (IFNG) gene. *Hum Mol Genet* 2, 1508. [[PubMed](#)]
142. Salzer E, Kansu A, Sic H, Majek P, Ikinogullari A, Dogu FE, Prengemann NK, Santos-Valente E, Pickl WF, Bilic I, Ban SA, Kuloglu Z, Demir AM, Ensari A, Colinge J, Rizzi M, Eibel H, Boztug K, 2014. Early-onset inflammatory bowel disease and common variable immunodeficiency-like disease caused by IL-21 deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 133, 1651-1659 e1612. [[PubMed](#)]
143. Salzer E, Santos-Valente E, Klaver S, Ban SA, Emminger W, Prengemann NK, Garnarcz W, Mullauer L, Kain R, Boztug H, Heitger A, Arbeiter K, Eitelberger F, Seidel MG, Holter W, Pollak A, Pickl WF, Forster-Waldl E, Boztug K, 2013. B-cell deficiency and severe autoimmunity caused by deficiency of protein kinase C delta. *Blood* 121, 3112-3116. [[PubMed](#)]
144. Salzer U, Chapel HM, Webster AD, Pan-Hammarstrom Q, Schmitt-Graeff A, Schlesier M, Peter HH, Rockstroh JK, Schneider P, Schaffer AA, Hammarstrom L, Grimbacher B, 2005. Mutations in TNFRSF13B encoding TACI are associated with common variable immunodeficiency in humans. *Nat Genet* 37, 820-828. [[PubMed](#)]
145. Samuel JM, Kelberman D, Smith AJ, Humphries SE, Woo P, 2008. Identification of a novel regulatory region in the interleukin-6 gene promoter. *Cytokine* 42, 256-264. [[PubMed](#)]
146. Sanchez R, Levy E, Costea F, Sinnott D, 2009. IL-10 and TNF-alpha promoter haplotypes are associated with childhood Crohn's disease location. *World J Gastroenterol* 15, 3776-3782. [[PubMed](#)]
147. Schaffer AA, Salzer U, Hammarstrom L, Grimbacher B, 2007. Deconstructing common variable immunodeficiency by genetic analysis. *Curr Opin Genet Dev* 17, 201-212. [[PubMed](#)]

148. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA, 2004. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 75, 163-189. [[PubMed](#)]
149. Schubert D, Bode C, Kenefeck R, Hou TZ, Wing JB, Kennedy A, Bulashevskaya A, Petersen BS, Schaffer AA, Gruning BA, Unger S, Frede N, Baumann U, Witte T, Schmidt RE, Dueckers G, Niehues T, Seneviratne S, Kanariou M, Speckmann C, Ehl S, Rensing-Ehl A, Warnatz K, Rakhmanov M, Thimme R, Hasselblatt P, Emmerich F, Cathomen T, Backofen R, Fisch P, Seidl M, May A, Schmitt-Graeff A, Ikemizu S, Salzer U, Franke A, Sakaguchi S, Walker LS, Sansom DM, Grimbacher B, 2014. Autosomal dominant immune dysregulation syndrome in humans with CTLA4 mutations. *Nat Med* 20, 1410-1416. [[PubMed](#)]
150. Seifart C, Dempfle A, Plagens A, Seifart U, Clostermann U, Muller B, Vogelmeier C, von Wichert P, 2005. TNF-alpha-, TNF-beta-, IL-6-, and IL-10-promoter polymorphisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Tissue Antigens* 65, 93-100. [[PubMed](#)]
151. Sekine H, Ferreira RC, Pan-Hammarstrom Q, Graham RR, Ziembra B, de Vries SS, Liu J, Hippen K, Koeuth T, Ortmann W, Iwahori A, Elliott MK, Offer S, Skon C, Du L, Novitzke J, Lee AT, Zhao N, Tompkins JD, Altshuler D, Gregersen PK, Cunningham-Rundles C, Harris RS, Her C, Nelson DL, Hammarstrom L, Gilkeson GS, Behrens TW, 2007. Role for Msh5 in the regulation of Ig class switch recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 7193-7198. [[PubMed](#)]
152. Serrano D, Becker K, Cunningham-Rundles C, Mayer L, 2000. Characterization of the T cell receptor repertoire in patients with common variable immunodeficiency: oligoclonal expansion of CD8(+) T cells. *Clin Immunol* 97, 248-258. [[PubMed](#)]
153. Sharifi L, Mirshafiey A, Rezaei N, Azizi G, Magaji Hamid K, Amirzargar AA, Asgardoost MH, Aghamohammadi A, 2016. The role of toll-like receptors in B-cell development and immunopathogenesis of common variable immunodeficiency. *Expert Rev Clin Immunol* 12, 195-207. [[PubMed](#)]
154. Smith AJ, Humphries SE, 2009. Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality. *Cytokine Growth Factor Rev* 20, 43-59. [[PubMed](#)]
155. Stoneking M, 2001. Single nucleotide polymorphisms. From the evolutionary past. *Nature* 409, 821-822. [[PubMed](#)]
156. Sullivan KE, Wooten C, Schmeckpeper BJ, Goldman D, Petri MA, 1997. A promoter polymorphism of tumor necrosis factor alpha associated with systemic lupus erythematosus in African-Americans. *Arthritis Rheum* 40, 2207-2211. [[PubMed](#)]
157. Takahashi N, Matsumoto K, Saito H, Nanki T, Miyasaka N, Kobata T, Azuma M, Lee SK, Mizutani S, Morio T, 2009. Impaired CD4 and CD8 effector function and decreased memory T cell populations in ICOS-deficient patients. *J Immunol* 182, 5515-5527. [[PubMed](#)]

158. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T, 2014. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6, a016295. [[PubMed](#)]
159. Taubenheim N, von Hornung M, Durandy A, Warnatz K, Corcoran L, Peter HH, Eibel H, 2005. Defined blocks in terminal plasma cell differentiation of common variable immunodeficiency patients. *J Immunol* 175, 5498-5503. [[PubMed](#)]
160. Thatayatikom A, Thatayatikom S, White AJ, 2005. Infliximab treatment for severe granulomatous disease in common variable immunodeficiency: a case report and review of the literature. *Ann Allergy Asthma Immunol* 95, 293-300. [[PubMed](#)]
161. Thiel J, Kimmig L, Salzer U, Grudzien M, Lebrecht D, Hagen T, Draeger R, Voelxen N, Bergbreiter A, Jennings S, Gutenberger S, Aichem A, Illges H, Hannan JP, Kienzler AK, Rizzi M, Eibel H, Peter HH, Warnatz K, Grimbacher B, Rump JA, Schlesier M, 2012. Genetic CD21 deficiency is associated with hypogammaglobulinemia. *J Allergy Clin Immunol* 129, 801-810 e806. [[PubMed](#)]
162. Trujillo CM, Muskus C, Arango J, Patino PJ, Montoya CJ, 2011. Quantitative and functional evaluation of innate immune responses in patients with common variable immunodeficiency. *J Investig Allergol Clin Immunol* 21, 207-215. [[PubMed](#)]
163. Tseng CW, Lai KL, Chen DY, Lin CH, Chen HH, 2015. The Incidence and Prevalence of Common Variable Immunodeficiency Disease in Taiwan, A Population-Based Study. *PLoS One* 10, e0140473. [[PubMed](#)]
164. Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV, 1997. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet* 24, 1-8. [[PubMed](#)]
165. Turnpenny P, Ellard S, 2007. Emery's elements of medical genetics. . Churchill Livingstone Elsevier; 13th eds.
166. Ubaldi de Capei MU, Dametto E, Fasano ME, Rendine S, Curtoni ES, 2003. Genotyping for cytokine polymorphisms: allele frequencies in the Italian population. *Eur J Immunogenet* 30, 5-10. [[PubMed](#)]
167. Vale AM, Schroeder HW, Jr., 2010. Clinical consequences of defects in B-cell development. *J Allergy Clin Immunol* 125, 778-787. [[PubMed](#)]
168. Vallinoto AC, Graca ES, Araujo MS, Azevedo VN, Cayres-Vallinoto I, Machado LF, Ishak MO, Ishak R, 2010. IFNG +874T/A polymorphism and cytokine plasma levels are associated with susceptibility to Mycobacterium tuberculosis infection and clinical manifestation of tuberculosis. *Hum Immunol* 71, 692-696. [[PubMed](#)]
169. van Zelm MC, Reisli I, van der Burg M, Castano D, van Noesel CJ, van Tol MJ, Woellner C, Grimbacher B, Patino PJ, van Dongen JJ, Franco JL, 2006. An antibody-deficiency syndrome due to mutations in the CD19 gene. *N Engl J Med* 354, 1901-1912. [[PubMed](#)]

170. van Zelm MC, Smet J, Adams B, Mascart F, Schandene L, Janssen F, Ferster A, Kuo CC, Levy S, van Dongen JJ, van der Burg M, 2010. CD81 gene defect in humans disrupts CD19 complex formation and leads to antibody deficiency. *J Clin Invest* 120, 1265-1274. [[PubMed](#)]
171. Varzaneh FN, Keller B, Unger S, Aghamohammadi A, Warnatz K, Rezaei N, 2014. Cytokines in common variable immunodeficiency as signs of immune dysregulation and potential therapeutic targets - a review of the current knowledge. *J Clin Immunol* 34, 524-543. [[PubMed](#)]
172. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di Francesco V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nuskern D, Rusch DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng ML, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferriera S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkoch C, Pratts E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers YH, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigo R, Campbell MJ, Sjolander KV, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yooseph S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang YH, Coyne M, Dahlke C, Mays A, Dombroski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, Nodell M, Pan S, Peck J, Peterson M, Rowe W, Sanders R, Scott J, Simpson M, Smith T, Sprague A, Stockwell T, Turner R, Venter E, Wang M, Wen M, Wu D, Wu M, Xia A, Zandieh A, Zhu X, 2001. The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304-1351. [[PubMed](#)]

173. Vlkova M, Ticha O, Nechvatalova J, Kalina T, Litzman J, Mauri C, Blair PA, 2015. Regulatory B cells in CVID patients fail to suppress multifunctional IFN-gamma+ TNF-alpha+ CD4+ T cells differentiation. *Clin Immunol* 160, 292-300. [[PubMed](#)]
174. Volanakis JE, Zhu ZB, Schaffer FM, Macon KJ, Palermos J, Barger BO, Go R, Campbell RD, Schroeder HW, Jr., Cooper MD, 1992. Major histocompatibility complex class III genes and susceptibility to immunoglobulin A deficiency and common variable immunodeficiency. *J Clin Invest* 89, 1914-1922. [[PubMed](#)]
175. Vorechovsky I, Zetterquist H, Paganelli R, Koskinen S, Webster AD, Bjorkander J, Smith CI, Hammarstrom L, 1995. Family and linkage study of selective IgA deficiency and common variable immunodeficiency. *Clin Immunol Immunopathol* 77, 185-192. [[PubMed](#)]
176. Wang HY, Ma CA, Zhao Y, Fan X, Zhou Q, Edmonds P, Uzel G, Oliveira JB, Orange J, Jain A, 2013. Antibody deficiency associated with an inherited autosomal dominant mutation in TWEAK. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 5127-5132. [[PubMed](#)]
177. Ward C, Lucas M, Piris J, Collier J, Chapel H, 2008. Abnormal liver function in common variable immunodeficiency disorders due to nodular regenerative hyperplasia. *Clin Exp Immunol* 153, 331-337. [[PubMed](#)]
178. Warnatz K, Bossaller L, Salzer U, Skrabl-Baumgartner A, Schwinger W, van der Burg M, van Dongen JJ, Orlowska-Volk M, Knoth R, Durandy A, Draeger R, Schlesier M, Peter HH, Grimbacher B, 2006. Human ICOS deficiency abrogates the germinal center reaction and provides a monogenic model for common variable immunodeficiency. *Blood* 107, 3045-3052. [[PubMed](#)]
179. Warnatz K, Denz A, Drager R, Braun M, Groth C, Wolff-Vorbeck G, Eibel H, Schlesier M, Peter HH, 2002. Severe deficiency of switched memory B cells (CD27(+)-IgM(-)-IgD(-)) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease. *Blood* 99, 1544-1551. [[PubMed](#)]
180. Warnatz K, Salzer U, Rizzi M, Fischer B, Gutenberger S, Bohm J, Kienzler AK, Pan-Hammarstrom Q, Hammarstrom L, Rakhmanov M, Schlesier M, Grimbacher B, Peter HH, Eibel H, 2009. B-cell activating factor receptor deficiency is associated with an adult-onset antibody deficiency syndrome in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 13945-13950. [[PubMed](#)]
181. Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, Thompson CB, Griesser H, Mak TW, 1995. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in CtlA-4. *Science* 270, 985-988. [[PubMed](#)]
182. Wehr C, Gennery AR, Lindemans C, Schulz A, Hoenig M, Marks R, Recher M, Gruhn B, Holbro A, Heijnen I, Meyer D, Grigoleit G, Einsele H, Baumann U, Witte T, Sykora KW, Goldacker S, Regairaz L, Aksoylar S, Ardeniz O, Zecca M, Zdziarski P,

Meyts I, Matthes-Martin S, Imai K, Kamae C, Fielding A, Seneviratne S, Mahlaoui N, Slatter MA, Gungor T, Arkwright PD, van Montfrans J, Sullivan KE, Grimbacher B, Cant A, Peter HH, Finke J, Gaspar HB, Warnatz K, Rizzi M, Inborn Errors Working Party of the European Society for B, Marrow T, the European Society for I, 2015. Multicenter experience in hematopoietic stem cell transplantation for serious complications of common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* 135, 988-997 e986. [[PubMed](#)]

183. Wehr C, Kivioja T, Schmitt C, Ferry B, Witte T, Eren E, Vlkova M, Hernandez M, Detkova D, Bos PR, Poerksen G, von Bernuth H, Baumann U, Goldacker S, Gutenberger S, Schlesier M, Bergeron-van der Cruyssen F, Le Garff M, Debre P, Jacobs R, Jones J, Bateman E, Litzman J, van Hagen PM, Plebani A, Schmidt RE, Thon V, Quinti I, Espanol T, Webster AD, Chapel H, Vihinen M, Oksenhendler E, Peter HH, Warnatz K, 2008. The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood* 111, 77-85. [[PubMed](#)]

184. Wheat WH, Cool CD, Morimoto Y, Rai PR, Kirkpatrick CH, Lindenbaum BA, Bates CA, Ellison MC, Serls AE, Brown KK, Routes JM, 2005. Possible role of human herpesvirus 8 in the lymphoproliferative disorders in common variable immunodeficiency. *J Exp Med* 202, 479-484. [[PubMed](#)]

185. Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AI, Duff GW, 1992. Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. *Hum Mol Genet* 1, 353. [[PubMed](#)]

186. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW, 1997. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3195-3199. [[PubMed](#)]

187. Yazdani R, Hakemi MG, Sherkat R, Homayouni V, Farahani R, 2014. Genetic defects and the role of helper T-cells in the pathogenesis of common variable immunodeficiency. *Adv Biomed Res* 3, 2. [[PubMed](#)]

188. Yong PF, Salzer U, Grimbacher B, 2009. The role of costimulation in antibody deficiencies: ICOS and common variable immunodeficiency. *Immunol Rev* 229, 101-113. [[PubMed](#)]

189. Yong PF, Workman S, Wahid F, Exley A, Webster AD, Ibrahim MA, 2008. Selective deficits in blood dendritic cell subsets in common variable immunodeficiency and X-linked agammaglobulinaemia but not specific polysaccharide antibody deficiency. *Clin Immunol* 127, 34-42. [[PubMed](#)]

190. Zhou Z, Huang R, Danon M, Mayer L, Cunningham-Rundles C, 1998. IL-10 production in common variable immunodeficiency. *Clin Immunol Immunopathol* 86, 298-304. [[PubMed](#)]

SPISAK SKRAĆENICA

AIHA	autoimunska hemolitička anemija
ALPS	autoimunski limfoproliferativni sindrom
APRIL	(<i>engl.</i> A Proliferation Inducing Ligand)
BAFF	(<i>engl.</i> B cell Activating Factor), B-ćelijski faktor aktivacije
BAFF-R	receptor za BAFF
CD	(<i>engl.</i> Cluster of Differentiation), diferencijacijska grupa molekula EBV
CLEC16A	(<i>engl.</i> C type lectin domain family 16 member A)
CMV	citomegalovirus
CNV	(<i>engl.</i> Copy Number Variations), varijacije u broju ponovaka
CTLA-4	citotoksični T limfocit antigen-4
CVID	česta varijabilna imunodeficijencija
DEFI	francuska nacionalna studija o adultnim primarnim imunodeficijencijama
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
EBV	Epštajn Bar virus
EDTA	(<i>engl.</i> Ethylenediaminetetraacetic acid) etilen diamin tetrasirćetna kiselina
ELISA	(<i>engl.</i> Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), enzimski imunotest
EM	(<i>engl.</i> Estimation Maximization), maksimizacija očekivanja
ESID	(<i>engl.</i> European Society for Immunodeficiencies), Evropsko udruženje za imunodeficijencije
FAM	fluorescentna boja neobjavljene stukture, patent Applied Biosystems
FBS	(<i>engl.</i> Fetal Bovine Serum), goveđi fetalni serum
GIT	gastrointestinalni trakt
GLILD	(<i>engl.</i> Granulomatous-Lymphocytic Interstitial Lung Disease), granulomatozna limfocitna intersticijalna bolest pluća
GWAS	(<i>engl.</i> Genome-Wide Association Study), ispitivanje polimorfizama gena u celokupnom genomu
HGP	(<i>engl.</i> Human Genome Project,), projekat „Genom čoveka”
HIV	(<i>engl.</i> Human Immunodeficiency Virus), virus humane imunodeficijencije
HLA	humani leukocitni antigen
HSCT	(<i>engl.</i> Haematopoetic Stem Cell Therapy), terapije matičnim ćelijama hematopeze
ICOS	(<i>engl.</i> Inducible T-cell Co-stimulator, ICOS)
IFN	interferon
IgA	imunoglobulin klase A
IgAD	IgA selektivna imunodeficijencija
IgD	imunoglobulin klase D
IgG	imunoglobulin klase G
IL-10	interleukin-10
IL-10RA	interleukin receptor A
IL-21	interleukin-21

IL-6	interleukin-6
IP 95%	interval poverenja od 95%
iRNK	informaciona RNK
ITP	idiopatska trombocitopenijska purpura
IUIS	(<i>engl.</i> International Union of Immunological Societies), Međunarodno udruženje imunoloških društava
IVIG	intravenski imunoglobulini
Kb	kilobaza
KCS	Klinički centar Srbije
LD	(<i>engl.</i> Linkage Disequilibrium), neravnoteža vezanosti
LIP	limfocitna intersticijalna pneumonija
LOCID	(<i>engl.</i> Late Onset Combined ImmunoDeficiency), kombinovana imunodeficijencija sa kasnim početkom
LRBA	(<i>engl.</i> Lipopolysaccharide Responsive Beige-like Anchor protein)
MHC	(<i>engl.</i> Major Histocompatibility Complex), glavni kompleks tkivne podudarnosti
miRNK	mikroRNK
NFκB	(<i>engl.</i> Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
NGS	(<i>engl.</i> Next Generation Sequencing), sekvenciranje sledeće generacije
ORC4L	(<i>engl.</i> Origin Recognition Complex 4L)
OŠ	odnos šansi
PBMC	(<i>engl.</i> Peripheral Blood Mononuclear Cells), mononuklearne ćelije periferne krvi
PCR	polimerazna reakcija lančanog umnožavanja
PCR-SSP	PCR sa specifičnim prajmerom za sekvencu
PMA	forbol 12-miristat 13-acetat
PRKCD	protein C kinaza δ
RFLP	(<i>engl.</i> Restriction Fragment Length Polymorphism), polimorfizam dužine fragmenata nastalih restrikcionom digestijom
RNK	ribonukleinska kiselina
SAD	Sjedinjene američke države
SCID	(<i>engl.</i> Severe Combined ImmunoDeficiency), teška kombinovana imunodeficijencija
SNP	(<i>engl.</i> Single Nucleotide Polymorphism), polimorfizmi pojedinačnih nukleotida
TACI	(<i>engl.</i> Transmembrane Activator and CAML Interactor)
TH	(<i>engl.</i> T-helper cell), pomoćnička T-ćelija
TNF	(<i>engl.</i> Tumor Necrosis Factor), faktor nekroze tumora
tRNK	transportna RNK
UTR	(<i>engl.</i> untranslated region), region koji se ne prepisuje
VEO-IBD	(<i>engl.</i> Very Early Onset Inflammatory Bowel Disease), inflamatorna bolest creva sa veoma ranim početkom
VIC	fluorescentna boja neobjavljene strukture, patent Applied Biosystems
WB	(<i>engl.</i> Wash Buffer), pufer za ispiranje

BIOGRAFIJA

Dijana Perović je rođena 7. januara 1974. godine u Žegar u Hrvatskoj.

Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je školske 1992/1993. godine a diplomirala je 1999. godine sa prosečnom ocenom 8,77. Magisterijum iz oblasti medicinske genetike upisala je 1999. godine i zvanje magistra medicinskih nauka stekla u junu 2006. godine, odbranom magistarskog rada „Molekularno genetička analiza familijarnih febrilnih konvulzija“, mentor prof. dr Milena Đurić. Specijalizaciju iz pedijatrije započela je 2000. godine u Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije “Dr Vukan Čupić”, a zvanje specijaliste pedijatra stekla u maju 2006, položivši specijalistički ispit sa odličnom ocenom.

U periodu od 2002. do 2007. godine bila je zaposlena u Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta „Dr V, Čupić“. Od 2007. do 2009. godine boravila je u Sjedinjenim Američkim Državama, gde je stekla sertifikat o nostrifikovanoj diplomi Medicinskog fakulteta u okviru programa ECFMG (Educational Commission of Foreign Medical Graduates). Od novembra 2009. godine zaposlena je na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu kao saradnik u nastavi za užu naučnu oblast humana genetika. U zvanje asistenta za istu naučnu oblast unapređena je novembra 2012. godine. Saradnik je na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja br. 175091 (rukovodilac projekta Prof dr Ivana Novaković).

Autor je ili koautor 2 publikacije objavljene u celini u časopisima indeksiranim u Institute of Science Index bazama podataka (SCI i SCIE).

PRILOZI

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisana **Dijana Perović**

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Ispitivanje polimorfizama gena za citokine kod pacijenata sa čestom varijabilnom imunodeficijencijom

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

Potpis doktoranta

U Beogradu, 30.05.2016. godine

Dijana Perović

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora **Dijana Perović**

Naslov rada **Ispitivanje polimorfizama gena za citokine kod pacijenata sa čestom varijabilnom imunodeficijencijom**

Mentor: **Prof. dr Vera Bunjevački**

Komentor: **Prof. dr Branka Bonači - Nikolić**

Potpisani **Dijana Perović**

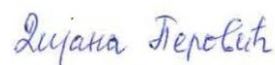
izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

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

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

Potpis doktoranda

U Beogradu, 30.05.2016. godine



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

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

ISPITIVANJE POLIMORFIZAMA GENA ZA CITOKINE KOD PACIJENATA SA ČESTOM VARIJABILNOM IMUNODEFICIJENCIJOM

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

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

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

Potpis doktoranta

U Beogradu, 30.05.2016. godine

Lujana Tepoluh
