

**UNIVERZITET U BEOGRADU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**Srđan D. Tanasilović**

**ANALIZA POLIMORFIZAMA GENA ZA CD86,  
CTLA-4, TNF I IL-10 KOD BOLESNIKA SA  
PEMFIGUSOM U SRBIJI**

**Doktorska disertacija**

**Beograd, 2016**

**UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF MEDICINE**

**Srđan D. Tanasilović**

**ANALYSIS OF POLYMORPHISM IN *CD86*,  
*CTLA4*, *TNF* AND *IL10* GENES IN  
SERBIAN PATIENTS WITH PEMPHIGUS**

**Doctoral dissertation**

**Belgrade, 2016**

## **Mentor**

---

Prof dr Ljiljana Medenica  
Medicinski fakultet u Beogradu

## **Komentor**

---

Prof dr Dušan Popadić  
Medicinski fakultet u Beogradu

## **Članovi Komisije**

---

Doc dr Snežana Minić  
Medicinski fakultet u Beogradu  
Predsednik Komisije

---

Prof dr Miloš Marković  
Medicinski fakultet u Beogradu

---

Prof dr Ivana Binić  
Medicinski fakultet u Nišu

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

# ANALIZA POLIMORFIZAMA GENA ZA CD86, CTLA-4, TNF I IL-10 KOD BOLESNIKA SA PEMFIGUSOM U SRBIJI

Srđan D. Tanasilović

## Sažetak

**Uvod:** Oboljenja iz grupe pemfigusa - pemfigus vulgaris (PV) i pemfigus foliaceus (PF) su autoimunska bulozna oboljenja kože i sluznica. U patogenezi su od značaja autoantitela na dezmogleine i druge molekule koja dovode do akantolize i formiranja intraepidermalnog rascepa. Za aktivaciju autoreaktivnih T-ćelija u pemfigusu neophodno je prepoznavanja dezmogleinskih peptida i angažovanje CD28 molekula, koji je najznačajniji kostimulatorni receptor u aktivaciji naivnih T ćelija. CD28 molekul se vezuje za B7 familiju molekula kao što su CD80 i CD86. Pored toga, B7 molekuli mogu da aktiviraju inhibitorni receptor na T-ćelijama, CTLA-4, koji kontroliše mehanizam održavanja tolerancije na sopstvene peptide. Na značaj genetskih faktora u patogenezi pemfigusa ukazuju prethodna istraživanja kojima su definisani određeni genetski faktori kao što su i polimorfizmi pojedinačnih nukleotida u genima molekula od značaja za patogenezu pemfigusa.

**Ciljevi istraživanja:** Odrediti distribuciju alela u genima za molekule CD86, CTLA-4, TNF i IL-10 kod pacijenata sa PV i PF, kao i kod zdravih osoba (dobrovoljni davaoci krvi) u Srbiji, ispitati da li je neki od ispitivanih polimorfizama faktor rizika za nastanak oboljenja (PV i PF) i uporediti ih sa podacima iz literature koji su dobijeni ispitivanjem istih polimorfizama kod geografski i etnički različitih populacija.

**Pacijenti i metode:** Istraživanje je obuhvatilo 61 bolesnika sa pemfigusom od kojih je PV imalo 48, a PF 13 bolesnika i 486 zdravih osoba-kontrola (dobrovoljni davaoci krvi). Dijagnoza pacijenata sa pemfigusom postavljena je na osnovu kliničke slike i testa direktne imunofluorescencije (DIF test). Za detekciju i analizu polimorfizama gena za *CD86*, *CTLA-4*, *TNF* i *IL-10* korišćene su komercijalne optimizovane smeše specifičnih oligonukleotida i TaqMan proba obeleženih FAM i VIC fluorohromima i to: *CD86* rs1129055, *CTLA4* rs733618 i rs5742909, *TNF* rs1800629 i rs361525 i *IL-10* rs1800896 i rs1800871 (*PE, Applied Biosystems*). Amplifikacija fragmenata DNK Real-time PCR metodom vršena je pomoću navedenih smeša komercijalnih oligonukleotida i

Maxima™ Probe qPCR 2X Master Mix, (Fermentas) uzimajući u obzir preporuke proizvođača reagenasa. Statistička analiza uključivala je primenu  $\chi^2$  testa ili Fišerovog testa tačne verovatnoće za procenu značajnosti razlike u frekvenciji alela i genotipova kod pacijenata i kontrola.

**Rezultati:** U ovom istraživanju utvrđeno da je A alel gena za *CD86* rs1129055 znatno češći kod pacijenata sa pemfigusom, kao i kod pacijenata sa PV u odnosu na zdrave kontrole. Kod nosioca A alela na genu za *CD86* rs1129055 povećan je rizik za oboljevanje od pemfigusa. T alela gena za *CD86* rs1129055 znatno je češće prisutan kod bolesnika sa PF u odnosu na obolele od PV.

**Rezultati:** U ovom istraživanju utvrđene su distribucije alela ispitivanih gena u uzorku populacije zdravih osoba sa teritorije Srbije i iznosile su: *CD86* (rs1129055) G/A→0,743/0,257; *CTLA4* (rs733618) T/C→0,902/0,092; (rs5742909) i C/T→0,895/0,105; *TNF* (rs1800629) G/A→0,866/0,134 i (rs361525) G/A→0,968/0,032; *IL10* (rs1800896) G/A→0,421/0,579 i (rs1800871) C/T →0,743/0,257. Frekvencije alela ispitivanih gena obolelih od pemfigusa hospitalno lečenih na Klinici za dermatovenerologiju Kliničkog centra Srbije (u periodu od januara 2011. do decembra 2013. godine) iznosile su: *CD86* (rs1129055) G/A→0,656/0,344; *CTLA4*: (rs733618) T/C→0,893/0,107 i (rs5742909) C/T→0,919/0,082; *TNF* (rs1800629) G/A→0,926/0,074 i (rs361525) G/A→0,975/0,025; *IL10* (rs1800896) G/A→0,377/0,623 i (rs1800871) C/T →0,754/0,246.

**Zaključak:** Frekvencija A alela u okviru rs1129055 polimorfizma gena za *CD86* je značajno viša među obolelim od pemfigusa (PV i PF) i PV nego među zdravim osobama, saglasno tome, GG genotip je protektivan. Nosioca T alela rs5742909 polimorfizma u genu za *CTLA4* je značajno više u grupi pacijenata sa PF u odnosu na grupu sa PV.

**KLJUČNE REČI:** Pemphigus vulgaris, Pemphigus foliaceus, Polimorfizmi pojedinačnih nukleotida, rs1129055, rs733618, rs5742909, rs1800629, rs361525, rs1800896, rs1800871

**NAUČNA OBLAST:** Medicina

**UŽA NAUČNA OBLAST:** Dermatovenerologija

**UDK:**

# **ANALYSIS OF POLYMORPHISM IN *CD86*, *CTLA4*, *TNF* AND *IL10* GENES IN SERBIAN PATIENTS WITH PEMPHIGUS**

Srdan D. Tanasilović

## **Abstract**

**Introduction:** Pemphigus vulgaris (PV) and pemphigus foliaceus (PF) are rare autoimmune blistering diseases with presumed T cell dependent pathology. Activation of naïve T cells is dependent on antigen recognition, subsequent signaling through the T cell receptor complex (signal 1), and various other interactions of T cells with antigen presenting cells that may be collectively designated as signal 2, which is unconditionally required for T cell activation both in response to infection and to autoantigens. Among the best described interactions contributing to signal 2 are those mediated by B7 family molecules such as CD80 and CD86 with their ligands, CD28, providing activation signals, and cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4), conferring inhibition. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) within genes encoding those molecules may alter the signaling process. It is not known whether functional genetic polymorphisms within genes encoding the aforementioned proteins may increase risk for developing PV and PF and, if so, whether they might serve as biomarkers for susceptibility to these diseases.

**Aims of the investigation:** To examine functional single nucleotide polymorphisms within *CD86* (rs1129055), *CTLA4* (rs733618 and rs5742909), *TNF* (rs1800629 and rs361525), and *IL-10* (rs1800896 and rs1800871) genes in 61 pemphigus patients and 486 healthy controls, and to compare results in Serbian pemphigus patients and healthy controls with results obtained in different populations groups.

**Patients and methods:** Our study included 61 pemphigus patients, among them 48 with PV and 13 with PF, treated at the Dermatovenereology Clinics of the Clinical Centre of Serbia. Patients were stratified according to clinical presentation of the disease as a PV or PF patients. Diagnosis in all patients was established by merging clinical findings, histopathologic analysis, and the results of direct immunofluorescence tests. Blood samples from 486 healthy blood donors were obtained from the National Blood

Transfusion Institute. Genomic DNA was isolated from the blood of patients and controls as described previously. Detection and analysis of CD86 rs1129055, CTLA-4 rs733618 and rs5742909, TNF rs1800629 and rs361525 i IL-10 rs1800896 and rs1800871 was performed with a commercial SNP genotyping assay (PE, Applied Biosystems Inc.). Comparison between genotype and allele frequencies in different populations was performed using the Pearson Chi-square or Fisher's exact test, as appropriate.

**Results:** In our study, distribution of alleles of tested genes in sample population of healthy person from Serbia, were as follows: *CD86* (rs1129055) G/A→0,743/0,257; *CTLA4* (rs733618) T/C→0,902/0,092 and (rs5742909) C/T→0,895/0,105; *TNF* (rs1800629) G/A→0,866/134 and (rs361525) G/A→0,968/0,032; *IL10* (rs1800896) G/A→0,421/0,579 and (rs1800871) C/T →0,743/0,257. The distribution of alleles of tested genes in patients with pemphigus hospitalized in Clinic of Dermatovenereology, Clinical Center of Serbia from January 2011. to December 2013 were as follows: *CD86* (rs1129055) G/A→ 0,656/0,344; *CTLA4*: (rs733618) T/C→0,893/0,107 and (rs5742909) C/T→0,919/0,082; *TNF* (rs1800629) G/A→0,926/0,074 and (rs361525) G/A→0,975/0,025; *IL10* (rs1800896) G/A→0,377/0,623 and (rs1800871) C/T →0,754/0,246.

**Conclusions:** We found that the *CD86* rs1129055 A allele was significantly more frequent among patients with pemphigus (p=0.040) and PV (p=0.040) than among controls. Carriage of the *CD86* rs1129055 A allele clearly increased risk for pemphigus. Carriage of *CTLA4* (rs5742909) T allele was significantly more frequent among patients with PF compared to those with PV.

**KEY WORDS:** Pemphigus vulgaris, Pemphigus foliaceus, single nucleotide polymorphisms, rs1129055, rs733618, rs5742909, rs1800629, rs361525, rs1800896, rs1800871

**SCIENTIFIC FIELD:** Medicine

**SPECIALISED SCIENTIFIC FIELD:** Dermatovenereology

**UDK:**



<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
1.1. DEFINICIJA PEMFIGUSA I EPIDEMIOLOŠKE ODLIKE	2
1.2. PATOGENEZA PEMFIGUSA	2
1.3. KLASIFIKACIJA PEMFIGUSA, KLINIČKE MANIFESTACIJE OBOLJENJA	5
1.4. HISTOPATOLOGIJA PEMFIGUSA	7
1.5. IMUNOHISTOPATOLOGIJA - TESTOVI DIREKTNE I INDIRECTNE IMUNOFLUORESCENCIJE (DIF I IIF TEST)	8
1.6. TERAPIJA	9
1.7. GENETSKA OSNOVA PEMFIGUSA	10
1.8. POLIMORFIZMI POJEDINAČNIH NUKLEOTIDA	11
1.8.1. POLIMORFIZAM RS1129055 U GENU ZA CD86	12
1.8.2. POLIMORFIZMI RS733618 I RS5742909 U GENU ZA CTLA-4	13
1.8.3. POLIMORFIZMI RS1800629 I RS361525 U GENU ZA TNF	13
1.8.4. POLIMORFIZMI RS1800896 I RS 1800871 U GENU ZA IL-10	14
<b>2. CILJEVI</b>	<b>15</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE</b>	<b>17</b>
3.1. PACIJENTI OBOLELI OD PEMFIGUSA	18
3.1.1. SELEKCIJA ISPITANIKA	18
3.1.2. KRITERIJUMI ZA POSTAVLJANJE DIJAGNOZE	18
3.1.3. UZORCI KOŽE PACIJENATA OBOLELIH OD PEMFIGUSA	18
3.2. DIF DETEKCIJA IMUNOGLOBULINA I KOMPONENTI KOMPLEMENTA U UZORCIMA TKIVA	19
3.3. UZIMANJE UZORAKA KRVI OD ISPITANIKA	19
3.4. PRIPREMA DNK IZ UZORAKA KRVI ISPITANIKA ZA ANALIZU POLIMORFIZAMA	20
3.4.1. IZOLACIJA DNK	20
3.4.2. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE I ČISTOĆE IZOLOVANE DNK	21
3.5. ODREĐIVANJE POLIMORFIZAMA CD86 (RS1129055), CTLA4 (RS733618 I RS5742909), TNF (RS1800629 RS361525) I IL 10 (RS1800896 I RS1800871)	21
3.6. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	22
<b>4. REZULTATI</b>	<b>23</b>
4.1. ISPITIVANJE POLIMORFIZMA GENA ZA CD86 (RS1129055) KOD KONTROLA I PACIJENATA SA PEMFIGUSOM	24
4.2. ISPITIVANJE POLIMORFIZMA GENA ZA CTLA4 (RS733618) KOD KONTROLA I PACIJENATA SA PEMFIGUSOM	27
4.3. ISPITIVANJE POLIMORFIZMA GENA ZA CTLA4 (RS5742909) KOD KONTROLA I PACIJENATA SA PEMFIGUSOM	30
4.4. ISPITIVANJE POLIMORFIZMA GENA ZA TNF (RS1800629) KOD KONTROLA I PACIJENATA SA PEMFIGUSOM	33

4.5.	ISPITIVANJE POLIMORFIZMA GENA ZA TNF ( <i>rs361525</i> ) KOD KONTROLA I PACIJENATA SA PEMFIGUSOM	37
4.6.	ISPITIVANJE POLIMORFIZMA GENA ZA IL-10 ( <i>rs1800896</i> ) KOD KONTROLA I PACIJENATA SA PEMFIGUSOM	41
4.7.	ISPITIVANJE POLIMORFIZMA GENA ZA IL-10 ( <i>rs1800871</i> ) KOD KONTROLA I PACIJENATA SA PEMFIGUSOM	45
5.	<b>DISKUSIJA</b>	<b>49</b>
6.	<b>ZAKLJUČCI</b>	<b>64</b>
7.	<b>LITERATURA</b>	<b>66</b>

## **1. UVOD**

## 1.1. Definicija pemfigusa i epidemiološke odlike

Naziv oboljenja potiče od grčke reči pemphix (plik, mehur) i označava grupu hroničnih buloznih dermatozoma, kod kojih se stvaraju autoantitela specifična za proteine dezmozoma keratinocita, što rezultira gubitkom adhezije keratinocita i stvaranja rascepa unutar epiderma, histološki ovaj proces se naziva akantoliza, a klinička manifestacija akantolize je pojava bula [1]. Klinički pojam pemfigus prvi put upotrebio je Boissier de Sauvages 1768. godine, opisujući bolesnika sa tranzijentnom buloznom dermatozom, da bi Hebra 1869. godine definisao dva različita klinička entiteta istog oboljenja: pemphigus vulgaris (PV) i pemphigus foliaceus (PF). Patogeneza oboljenja bila je nepoznata do 1964. godine, kada su Beutner i Jordan prvi otkrili cirkulišuća autoantitela na interepidermalne antigene [2].

Pemfigus je podjednako zastupljen kod oba pola, javlja se kod svih rasa, a incidencija oboljenja je različita u zavisnosti od geografske regije i etničke pripadnosti i kreće se od 0,76 (Finska) do 32 na milion godišnje (u populaciji Aškenazi Jevreja) [3, 4]. U većini zemalja PV je češće oboljenje nego PF, a izuzetak su Finska, Tunis i Brazil [5]. U Brazilu je odnos endemske forme PF i PV približno 20:1 [6], u SAD odnos PF i PV iznosi 1:5 dok je u Finskoj odnos obolelih od PF i PV 0,5:1 [7, 8]. Broj novoobolelih od PV u severnoj Grčkoj iznosi oko 0,8/100 000 stanovnika i približan je broju novoobolelih u Hrvatskoj i Nemačkoj [3]. Za čitavu teritoriju Srbije, u sadašnjem trenutku, nema preciznijih epidemioloških podataka o incidenciji pemfigusa međutim ustanovljeno je da je Vojvodini (južno Bački okrug) incidencija pemfigusa 0,66 na 100.000, odnosno 0,85 na 100.000 osoba starijih od 20 godina [9].

## 1.2. Patogeneza pemfigusa

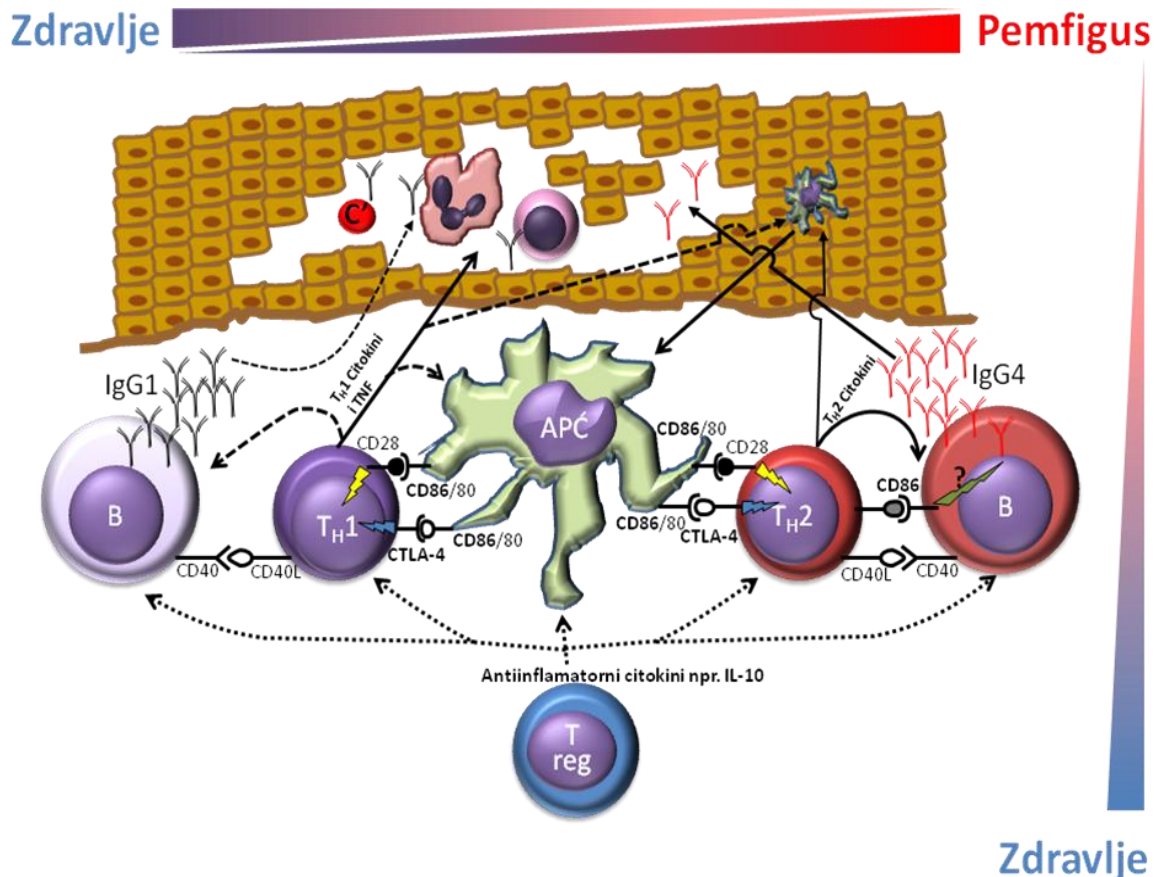
Pemfigus je jedna od najjasnije definisanih autoimunskih bolesti posredovanih antitelima i služi kao pogodan model za izučavanje i upoznavanje kompleksnih mehanizama koji dovode do gubitka tolerancije na sopstveno [10]. Oboljenje se karakteriše prisustvom cirkulišućih imunoglobulina (Ig) najčešće IgG, koji su usmereni prema proteinima međucelijskih veza – dezmozoma, i to dezmozogleinu (Dsg) Dsg-1 i Dsg-3 a ponekad i prema drugim proteinima koji učestvuju u stvaranju dezmozoma. Vezivanje ovih autoantitela za gore pomenute proteine odnosno njihove epitope dovodi

do akantolize odnosno rascepa na nivou epiderma. Dominantni auto-antigen kod obolelih od PF je Dsg-1, dok je autoimunski odgovor kod bolesnika sa PV uglavnom usmeren prema antigenskim determinantama Dsg-3. Pacijenti sa anti Dsg-1 antitelima imaju predominantno kutane manifestacije bolesti, dok pacijenti sa anti Dsg-3 antitelima pored kože, često imaju zahvaćene i sluznice. Kod pacijenata sa PF akantoliza nastaje u površnim slojevima epiderma dok kod obolelih od PV akantoliza nastaje u dubljim slojevima epiderma. Osim vezivanja autoantitela za proteine dezmozoma, u proces akantolize može da bude uključena i aktivacija plazminogena, a u zavisnosti od izotipa autoantitela i aktivacije komplementa [11]. Informatorna kaskada tokom nastanka i razvoja promena na koži nastaje interakcijom ćelija i medijatora stečene i urođene imunosti (Slika 1). Da bi se pokrenuo stečeni imunski odgovor, neophodno je da T-ćelija ostvari kontakt sa profesionalnim antigen prezentujućim ćelijama (APĆ), slika 1. Prvi deo aktivacionog signala naivne CD4<sup>+</sup> T-ćelije dobijaju prepoznavanjem peptida preko T-ćelijskog receptora (TCR). Drugi deo signala proizilazi iz interakcije kostimulatornih molekula (CD80, CD86) koji se nalaze na površini aktivisanih APĆ sa CD28 molekulom na površini T-ćelija kao i citokina koji proizvode APĆ i druge lokalne ćelije [12], slika 1.

Ukoliko, CD80 i CD86 molekuli ligiraju umesto CD28 molekula CD152 (citotoksični T-limfocitni antigen 4, CTLA-4), ne dolazi do aktivacije T-limfocita, slika 1.

Molekuli i CD28 i CTLA-4 imaju do 30% homologu strukturu na proteinskom nivou i vezuju se za iste ligande eksprimirane na APĆ (molekuli CD80 i CD86), pri čemu CTLA-4 ima 500-2500 puta veći afinitet za vezivanje u odnosu na CD28 [13]. Opisani model aktivacije T-ćelija važan je za održavanje tolerancije na sopstvene neizmenjene peptide. Međutim, novija istraživanja ukazuju da rezultat kostimulacije tokom aktivacije T-ćelija i APĆ, ne zavisi samo od višestruke interakcije između receptora i liganda već i od različitih efekata koje ova interakcija ima na efektorske i regulatorne T-ćelije [13]. Angažovanje CTLA-4 na T-ćelijama može da moduliše funkciju APĆ putem nekoliko različitih mehanizama. T ćelije koje eksprimiraju CTLA-4 mogu da smanje ekspresiju CD80 i CD86 molekula na APĆ i na taj način da modulišu kapacitet APĆ da aktiviraju T-ćelije. Takođe, sekretovani, solubilni CTLA-4 može da blokira CD80 i CD86 i na taj način da blokira kostimulaciju preko CD28 molekula [13]. U daljem procesu, direktna interakcija između CD4<sup>+</sup> T-limfocita i B-limfocita i profil sekretovanih citokina, određuju izotip antitela koji će proizvoditi B-limfociti [14] slika 1. Kod aktivnog PV ustanovljeno

je prisustvo  $T_H2$  zavisnih IgG4 At, dok  $T_H1$  zavisni IgG1 subset anti Dsg antitela predominira u periodu remisije [14]. Pored  $T_H2$  i  $T_H1$  subseta citokina, značajnu ulogu u patogenezi pemfigusa imaju i interleukin (IL)-10, IL-6, IL-15 i TNF [11, 14-18].



**Slika 1.** Pretpostavljeni redosled događaja u patogenezi pemfigusa. Antigen prezentujuće ćelije iz epiderma migriraju u limfne čvorove i prikazuju peptide dezogleina naivnim T limfocitima. U zavisnosti od citokinskog miljea i drugih signala CD4 ćelije se diferenciraju u  $T_H1$  ili  $T_H2$  subpopulaciju. Diferencirane  $T_H$  ćelije oblikuju odgovor B limfocita tako da oni sekretuju IgG1/3 ili IgG4 antitela. Antitela indukuju rascep u epidermu sama (IgG4) ili angažujući druge mehanizme (IgG1/3).  $T_H1$  citokini i TNF pojačavaju efektorske funkcije citotoksičnih ćelija i neutrofila.  $T_H2$  utiču na migraciju APC iz kože i maturaciju i angažovanje eozinofila (nije prikazano). Regulatorne T-ćelije mogu da prekinu aktivnost i  $T_H1$  i  $T_H2$  subpopulacija i smanje kapacitet APC za aktivaciju T-limfocita. Efekte ostvaruju kroz direktan kontakt (nije prikazano) ili pomoću solubilnih faktora npr. IL-10. T, T reg regulatorni T limfocit;  $T_H1,2$ , T helper limfocit 1 i 2; B, B limfocit; APC, antigen prezentujuća ćelija; C', komplement.

Mehanizmi oštećenja tkiva u pemfigusu su prema tome kontrolisani efektorskim i regulatornim molekulima imunskog odgovora na čiju ekspresiju značajan uticaj imaju polimorfizmi u njihovim regulatornim a ponekad i kodirajućim sekvencama. Savremenim tehnologijama ispitivanja polimorfizama gena moguće je precizno definisati čak i umeren genetski efekat koji imaju određeni aleli u nastanku ove

kompleksne bolesti. Pored gena unutar HLA lokusa, definisan je veći broj gena čiji su pojedini aleli udruženi sa osetljivošću za nastanak pemfigusa i izvan HLA lokusa [19, 20] uključujući i gene koji kodiraju medijatore imunskog odgovora koji su navedeni niže u tekstu.

### 1.3. Klasifikacija pemfigusa, kliničke manifestacije oboljenja

Oboljenja iz grupe pemfigusa čine nekoliko različitih entiteta koji imaju karakterističnu kliničku sliku i specifične imunopatološke karakteristike. Grupa pemfigusa spada u intraepidermalne autoimunske bulozne bolesti koje su klasifikovane u zavisnosti od visine intraepidermalnog rascepa. Glavni klinički subtipovi su: pemfigus vulgaris i pemfigus foliaceus koji imaju svoje zasebne kliničke varijetete. U prvoj grupi oboljenja, rascep je lokalizovan nisko, često iznad bazalnog sloja epiderma (ciljni antigen je Dsg-3), ovu grupu čine: pemfigus vulgaris (PV) i pemfigus vegetans (PVg). Kod druge grupe rascep je lokalizovan u površnim zonama epiderma, često u ili neposredno ispod kornealnog sloja (ciljni antigen DSG-1) u nju spadaju: Pemfigus foliaceus (PF), njegova endemska forma - Fogo selvagem i Pemphigus erythematodes (PE). Pemfigus koji je izazvan ili pokrenut lekovima može imati kliničke i histopatološke karakteristike slične PV ili PF. Pored opisanih, postoje i retke forme oboljenja iz grupe pemfigusa kao što su paraneoplastični pemfigus, IgA pemfigus, pemfigus herpetiformis i IgG-IgA pemfigus koji su po svojim kliničkim, histopatološkim i imunopatološkim karakteristikama razlikuju od gore pomenutih entiteta u okviru dve glavne grupe bolesti.

Dijagnoza oboljenja iz grupe pemfigusa se postavlja evaluacijom kliničke slike, histopatološkog nalaza, i nalaza direktnog i indirektnog imunofluorescentnog (DIF i IIF) testa. Ukoliko postoje klinička, histopatološka ili imunološka preklapanja precizna dijagnoza zahteva definiciju ciljnog antigena primenom ELISA ili Western blot testova ili imuno/elektronske mikroskopije.

**Pemphigus vulgaris (PV)** nastaje kao posledica stvaranja suprabazalnog rascepa i karakteriše se pojavom bula na koži i sluzokožama. PV je morfološki monomorfna dermatoza, kod koje je primarna eflorescencija bula mlitavog krova na neizmenjenoj koži ili ponekad na eritematoznoj osnovi a kasnije dolazi do pojave sekundarnog polimorfizma koji odlikuje pojava bolnih erozija, krusta, hiperpigmentovane makule. Kod 50-70% pacijenata dolazi i do pojave erozija i/ili ulceracija najčešće u usnoj duplji

(bukalno, usne meko i tvrdo nepce) a ređe i na drugim sluznicama (nazofarinks, konjunktiva, cerviks, vulva, uretra, rektum). Promene na sluznicama mogu da prethode promenama na koži, da se jave istovremeno sa promenama na koži, ili da se pojave nakon promena na koži. Lezije na oralnoj sluznici su bolne i ukoliko oboljenje ne leči šire se na okolne anatomske strukture, uzrokujući otežano žvakanje, gutanje i govor. Promene na koži i/ili usnoj duplji ne pokazuju sklonost ka spontanoj epitelizaciji. Kod ovih pacijenata ukoliko postoje bule pritiskom na njih direktno pod pravim uglom, ili lateralno, dolazi do daljeg odlublivanja epiderma i širenja bule, što se opisuje kao pozitivan Nikolsky znak (I i II). Predilekciona mesta za pojavu bula na koži su kapilicijum, gornje partije trupa i leđa, vrat, lice, intertriginozne regije, u nekim slučajevima prisutne su i lezije na perionihijumu, bule imaju tendenciju da se pojavljuju na medijalnoj liniji trupa. [21, 22].

Tokom primene adekvatne terapije dolazi do potpune epitelizacije erozija, a ukoliko prethodno nije postojala bakterijska superinfekcija, erozije epitelizuju u potpunosti, bez ožiljaka, sa stvaranjem rezidualnih hiperpigmentacija na mestima primarnih eflorescencija. Ukoliko se ne leči, PV je letalno oboljenje, pri čemu do letalnog ishoda dolazi od jedne do tri godine od početka oboljenja. Citodijagnostičkim Tzanck-ovim testom detektuju se akantolitičke ćelije. Pojedini autori navode da faktori iz spoljašnje sredine mogu dovesti do egzacerbacije oboljenja, to su prvenstveno pojedini lekovi, UV radijacija, pesticidi, mehanička trauma kože, neke stomatološke intervencije, pojedine namirnice (beli luk, tanini, kana) i drugo [23].

**Pemphigus vegetans (PVg)** je manje agresivna, lokalizovana forma PV. kod koga je ciljani antigen takođe Dsg-3, rascep je intraepidermalni obično u nivou spinoznog sloja. Postoje dve forme oboljenja, prva kod koje vegetacije nastaju na mestima prethodnih bula i erozija u toku evolucije PV (Neuman tip), kod druge forme vegetacije nastaju de novo, očinju kao pustule i zarastaju stvaranjem vegetantnih plakova (Hallopeau tip). Predilekciona mesta za PVg su intertriginozne regije, kapilicijum, nazolabijalne brazde, uglovi usana, jezik i vulva [1].

**Pemphigus foliaceus (PF)** je retka i relativno benigna forma pemfigusa. Oboljenje veoma retko zahvata oralnu sluznicu ili druge mukoze. S obzirom da bule nastaju subkornealno, veoma često kliničkom slikom dominiraju plitke, suve, erozije nepravilnog oblika, delimično prekrivene ostacima krovova bula. PF je jedina forma



pemfigusa koja se klinički može manifestovati u vidu eritrodermije. Ukoliko su promene lokalizovane na licu, u zigomatičnoj regiji, a osim intraepidermalnih postoje i granularni depoziti imunoreaktanata u zoni bazalne membrane oboljenje se zove Pemphigus erythematosus, pojedini autori smatraju da se radi o PF udruženim sa lupus eritematodesom. Forma PF, kod koje su lezije lokalizovane u seboroičnim zonama na licu i trupu naziva se Pemphigus seborrhosicus. Endemski PF u Južnoj Americi (Brazilu), poznat i kao fogo selvagem, klinički odgovara PF a nastaje kao posledica ukrštene reaktivnosti dezmogleina-1 sa proteinima pljuvačke mušice *Simulium nigrimanum* koja živi u blizini rečnih korita u Brazilu [24]. U većini drugih delova sveta PF javlja sporadično [24].

**Lekovima pokrenut ili izazvan pemfigus** može se klinički manifestovati kao PV ili PF, najčešće se povezuje sa uzimanjem tiolskih (katopila, enalaprila, penicilamina) ili netiolskih lekova (penicilini, cefalosporini, piroksikam). U nekim slučajevima ove vrste oboljenja, imunopatološki testovi (DIF i IIF) mogu biti negativni. [25]. Smatra se da je 50% verovatnoća da oboljenje uđe u trajnu remisiju kada se obustavi primena leka koji je okidač.

**Paraneoplastični pemfigus (PPN)** se manifestuje teškom kliničkom slikom, uz brojne kutane lezije prisutne su i izrazito bolne erozije na orogenitalnoj sluznici i konjunktivi, uz teško opšte stanje bolesnika, često praćeno i febrilnošću. Ciljni antigeni za PP, osim Dsg-3 i Dsg-1 su i dezmokolin, plakoglobin, dezmoplakin, holinergički receptori, pemfaksin. Najčešće se javlja udružen sa hematološkim malignitetima (non-Hodgkin limfomima, hroničnom limfocitnom leukemijom, "giant cell" limfomom, timomom i dr.), a nešto ređe sa loše diferenciranim sarkomima, bronhogenim i drugim karcinomima. Po pravilu ova forma pemfigusa je rezistentna na terapiju sa izuzetno visokim mortalitetom [26].

#### **1.4. Histopatologija pemfigusa**

Glavna histopatološka karakteristika oboljenja iz grupe pemfigusa je akantoliza, koja dovodi do intraepidermalnog rascepa, koji može biti lokalizovan na različitim nivoima epiderma. Kod PV i PVg je prisutan suprabazalni rascep („niska akantoliza“), u spinoznom sloju epiderma, neposredno iznad samog bazalnog sloja, a ćelije bazalnog sloja morfološki liče na nadgrobni spomenik („tombstone effect“), dokazano je da je

koncentracija Dsg-3 najveća u ovim regijama epiderma. Rane lezije mogu pokazivati i znake eozinofilne spongioze epiderma, dok u starijim lezijama može postojati i inflamatorni infiltrat u dermu, nekroza keratinocita i formiranje krusti.

Kod PF akantoliza je subkornealna („visoka akantoliza“), rascep je u najvišim slojevima epiderma, neposredno ispod, ili čak u samom kornealnom sloju, dok srednji i duboki deo epiderma ostaje intaktan, u ovim regijama epiderma je i koncentracija Dsg-1 najveća. Osim ovih promena, u histopatološkoj slici PF mogu biti prisutna i diskeratoza (keratinociti sa prevremeno završenim procesom keratinizacije), kao i reaktivna akantoliza (zadebljanje spinoznog sloja) i papilomatoza (izdužene epidermalne prečke i proširene dermalne papile).

### **1.5. Imunohistopatologija - testovi direktne i indirektno imunofluorescencije (DIF i IIF test)**

Jedna od glavnih karakteristika svih vrsta pemfigusa je prisustvo cirkulišućih i tkivno fiksiranih autoantitela usmerenih prema proteinima dezmozoma.

Testom direktne imunofluorescencije (DIF) testom otkriva se prisustvo tkivno fiksiranih autoantitela u koži odnosno epidermu obolelih od pemfigusa. U epidermu je prisutna karakteristična retikularna fluorescencija IgG autoantitela, takođe može biti prisutna i C3c frakcija komplementa, ređe IgM ili IgA antitela. DIF test je pozitivan u više od 90% obolelih i na klinički neizmenjenoj koži [27] ili folikularnim delovima omotača dlake [28]. Pozitivan DIF test ima znatno veću specifičnost i senzitivnost u odnosu na detekciju specifičnih cirkulišućih autoantitela.

Testom indirektno imunofluorescencije (IIF) testom detektuju se cirkulišuća autoantitela usmerena ka epidermalnim epitopima u serumu obolelih od pemfigusa, pri čemu se kao supstrat koristi ezofagus majmuna, svinjska ili humana koža. Ukoliko je klinička slika i DIF test ukazuju na pemfigus, a IIF test je negativan, savetuje se da se test ponovi na drugom suspratu. Pozitivna cirkulišuća autoantitela pozitivna su kod oko 80% obolelih od pemfigusa, ali mogu biti i lažno pozitivna, obično u niskom titru i kod obolelih od mijastenije gravis, opekotina, gljivičnih infekcija, prisustva autoantitela na ABO antigene krvnih grupa. Klinički značaj IIF testa je u činjenici da titar cirkulišućih autoantitela najčešće je u direktnoj korelaciji sa aktivnosti pemfigusa, a koristi se i za

praćenje terapijskog odgovora, dobar odgovor na terapiju manifestuje se sniženjem titra IIF testa [29-31].

## 1.6. Terapija

Terapija pemfigus vulgarisa/foiaceusa zavisi od aktivnosti oboljenja, težine kliničke slike, kao i od prisutnih komorbiditeta.

Inicijalna - indukciona terapija podrazumeva upotrebu većih doza lekova, dok se tokom terapije održavanja postepeno doze lekova snižavaju. Na terapiju održavanja se prelazi ukoliko najmanje 2 nedelje nema novih bula - erozija i ukoliko je minimalno 80% postojećih lezija epitelizovalo. Dobar terapijski odgovor podrazumeva prestanak pojave novih lezija, kao i epitelizacija postojećih erodovanih površina.

Inicijalna terapija oboljenja iz grupe pemfigusa zasnovana je na sistemske upotrebi imunosupresiva, prvenstveno sistemskih kortikosteroida (klasična-prednizolon u dozi od 1-2 mg/kg, ili pulsna terapija - 500-1000 mg ekvivalenta prednizolona na svake 3-4. nedelje). Kasnije se kortikosteroidi kombinuju sa imunosupresivnim agensima prvenstveno: azatioprinom (2-2, 5 mg/kg dnevno), mikofenolat-mofetilom (2 g dnevno.) i mikofenolnom kiselinom (1440 mg dnevno), imunosupresivi drugoga reda koji se kombinuju sa steroidnom terapijom su: ciklofosamid (1-2 mg/kg dnevno), metotreksat (10-20 mg nedeljno) i dapson (do maksimalno 1,5 mg/kg dnevno ukoliko su serumske vrednosti glukozo-6 fosfat dehidrogenaze u fiziološkim granicama[32].

Ukoliko dođe do izostajanja terapijskog odgovora savetuje se primena Rituximaba (1000mg i. v. dva puta dnevno tokom 1. i 14. dana, ili 375 mg/m<sup>2</sup> i.v. 4 puta nedeljno) i/ili intravenskih imunoglobulina - IVIg (2g/kg svakih 4-6 nedelja), imunoafereze (2-3 puta dnevno, tokom 3-4 dana) [33, 34].

Lokalna terapija podrazumeva: upotrebu topikalnih kortikosteroida, inhibitora kalcineurina za oralnu i genitalnu sluznicu (0,1% pimekrolimus), prevenciju bakterijske superinfekcije - antibakterijska i antiseptička sredstva, topikalne analgetike za sluznice[32].

Simptomatska terapija se upotrebljava u slučajevima infekcije - sepsa (sistemski - parenteralni antibiotici), malnutricije, hipoproteinemije, anemije, metaboličkog

disbalansa (susptituciona terapija albuminima, preparatima gvožđa, elektrolitima, rehidracija), analgetici, antipiretici, anksiolitici [32].

Ukoliko se radi o klinički teškoj formi pemfigusa, potrebno je isključiti i postojanje udruženog maligniteta. Ukoliko se radi o paraneoplastičnom pemfigusu, sprovodi se prvenstveno terapija neoplazme (hirurška, radio, citostatska, kombinovana), uz imunosupresivnu terapiju pemfigusa [26].

## 1.7. Genetska osnova pemfigusa

Dosadašnja istraživanja su pokazala da pemfigus pripada takozvanim kompleksnim genetskim oboljenjima, kod kojih postoji umeren rizik od nasleđivanja bolesti kroz višestruku interakciju gena i faktora spoljašnje sredine. Do sada su u literaturi kao najznačajniji aleli koji su udruženi sa nastankom pemfigusa navođeni HLA-DRB1\*04, DRB1\*08 i DRB1\*14, KIR3DS1 i HLA-Bw4 [35, 36], a najjasnije povezani faktori spoljašnje sredine sa nastankom ove bolesti su primena lekova sa tiol grupom (penicilamin, soli zlata, kaptopril i dr), kao i konzumiranje namirnica koje sadrže jedinjenja sa tiol grupom: penicilamin, katopril, soli zlata, natrijum-tiomalat, penicilin, piroksikam) [37].

Udruženost HLA-DRB1\*0402, DRB1\*1401 i DQB1\*0503 alela sa pemfigus vulgarisom ustanovljeni su kod pacijenata u više etnički udaljenih populacija [38-40]. Zanimljivo je da je ustanovljeno da autoreaktivne T-ćelije pacijenata sa pemfigus vulgarisom prepoznaju određene Dsg-3 fragmente na HLA-DRB1\*0402 i DQB1\*0503.7 [41]. Slično tome, kod pacijenata sa PF ustanovljena je udruženost sa HLA-DRB1\*04, DRB1\*14 i DRB1\*16 i smatra se da su ovi HLA molekuli direktno uključeni u prezentaciju fragmenata Dsg-1 [42, 43]. Nedavno publikovani podaci istraživanja sprovedenog na pacijentima obolelim od pemfigus vulgarisa iz Srbije ukazuju da su HLA-DRB1\*04:02, DRB1\*14:04, HLA-DQB1\* 03:02 i DQB1\*05:03 aleli kao i HLA-DRB1\*04:02- DQB1\*03:02 i HLA-DRB1\*14:04- DQB1\*05:03 haplotipovi genetski markeri podložnosti za pemfigus vulgaris dok je DRB1\*11 grupa alela protektivna u populaciji Srbije [44]. Rezultati analize gena u celokupnom genomu (engl. GWAS, genome-wide association study) kojom je obuhvaćeno 100 pacijenata jevrejskog porekla i 397 zdravih ustanovljeno je da je ST18 gen koji je u blizini 8q11.23 značajno udružen sa PV. Istom studijom su kasnije obuhvaćeni egipatski i nemački pacijenti sa pemfigus vulgarisom i ista udruženost je

ustanovljena kod egipatskih, ali ne i kod nemačkih pacijenata sa PV što ukazuje da ST-18 udružene varijante mogu da budu specifične za određene populacije [20].

Rezultati brojnih istraživanja sprovedenih u svetu ukazuju na postojanje specifičnosti u različitim populacionim grupama, i različitim geografskim regionima [20, 38, 45].

## **1.8. Polimorfizmi pojedinačnih nukleotida**

Genski polimorfizam je pojam koji označava promenu DNK sekvence koja može biti posledica zamene, insercije ili delecije nukleotida unutar DNK sekvence [46, 47]. Najbolje su opisana dva tipa polimorfizama sekvenci DNK i to su: polimorfizmi dužina sekvenci i polimorfizmi nukleotidne sekvence koji su rezultat zamena nukleotida. Zamena nukleotida u DNK molekulu je uobičajena u populaciji, pri čemu se niti jedan alel ne smatra "standardnim". Razlike u sekvenci DNK koje normalno postoje između individua jedne vrste sa učestalošću većom od 1% su označene kao polimorfizmi sekvence DNK [46]. Ako je učestalost manja od 1%, tada se promena u sekvenci DNK smatra mutacijom [46]. Projektom Genom čoveka (engl. Human Genome Project), koji se temeljio na sekvencioniranju DNK molekula, pokazano je da polimorfizmi pojedinačnih nukleotida (SNP, engl. single nucleotide polymorphism) postoje unutar celog genoma kako u kodirajućim tako i nekodirajućim delovima DNK [45]. SNP se u proseku pojavljuju jednom na 250 baza, čineći tako više od 3 miliona varijacija u genomu čoveka [45]. U svim do sada ispitivanim genima postoje SNP. Kod većine SNP postoje samo dve mogućnosti odnosno varijacije alela. Učestalost SNP na autozomnim hromozomima je veća nego na polnim hromozomima [48-50]. Smatra se da 70% SNP u opštoj populaciji ima frekvenciju manju od 5%. Do danas je otkriveno preko 2 miliona SNP. Većina do sada otkrivenih SNPova ne utiče na promenu fenotipa [49].

Najviše pažnje pobuđuju SNP koji utiču na ispoljavanje (ekspresiju) gena, odnosno menjaju građu proteina. Pretpostavlja se da broj takvih SNP u genomu čoveka između 50 000 - 250 000 [48, 51-54].

Promena ekspresije gena može da nastane usled promena u 5' i 3' regulatornim sekvencama, promena u intronima koje menjaju stabilnost ili način obrade primarnog transkripta RNK ili promena u sekvencama koje kodiraju regulatorne mikroRNK. SNP u kodirajućim sekvencama naročito na pozicijama 1 i 2 u DNK kodovima mogu da promene aminokiseline u proteinu, uvedu prerano STOP kodone ili na drugi način

poremete funkcionalnost proteina. Ponekad, SNP ne mora da izaziva nijednu od navedenih promena ali postojanje određene alelske varijante može da bude udruženo sa određenom bolešću zbog toga što se ta alelska varijanta nasleđuje vezana za neki drugi deo genoma koji kodira ili reguliše produkte bitne u patogenezi te bolesti. U takvim slučajevima SNP predstavlja marker te bolesti [47].

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

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

### **1.8.1. Polimorfizam rs1129055 u genu za CD86**

CD86 je kostimulatorni molekul koji ima sposobnost ligiranja CD28 molekula i CTLA-4 molekula što dalje određuje diferencijaciju u efektorske ili regulatorne T ćelije. CD86 +1057 G/A (rs1129055) tranzicija dovodi do A304T supstitucije i stvaranja novog potencijalnog mesta za fosforilaciju u citoplazmatskom delu CD86, što dalje potencijalno menja unutarćelijski signal posredovan ovim molekulom unutar antigen prezentujućih ćelija [55]. Pored toga, ustanovljeno je da CD86 molekul utiče i na B ćelije i omogućava signalizaciju neophodnu za produkciju IgG4 [56], koji se dalje vezuje za dezmogleine i dovodi do procesa akantolize bez aktivacije komplementa [57]. U studiji rađenoj u Brazilu, ispitivan je polimorfizam na poziciji +1057 (G/A) u genu za CD86 (rs1129055), i

ustanovljeno je da je prisustvo G alela češće u grupi pacijenta sa PF dok je prisustvo A alela češće u kontrolnoj grupi, kod zdravih kao i da homozigotne osobe za A alel imaju veću rezistenciju od oboljevanja. Analizom ovog polimorfizma pronađena je statistički značajna razlika kod pacijenata afro-brazilskog, ali ne i kod pacijenata evro-brazilskog porekla [19].

### **1.8.2. Polimorfizmi rs733618 i rs5742909 u genu za CTLA-4**

CTLA-4 molekul koji posreduje u kasnoj fazi aktivacije T ćelija eksprimiran je na aktivisanim CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T ćelijama i učestvuje u održavanju periferne T-ćelijske tolerancije. Ustanovljeno je da je C alel rs733618 povezan sa povećanom ekspresijom solubilne forme CTLA-4 [58], koja može da ometa dalju interakciju sa CD28 molekulom i da na taj način inhibiše proliferaciju T ćelija [58]. U studiji rađenoj u Brazilu ispitivan je i rs733618 i rs5742909 odnosno polimorfizmi na poziciji -1772 (T/C) i -318 (C/T) u genu za CTLA-4, U ovoj studiji, ispitano je 269 pacijenata sa PF i 395 zdravih kontrola, i pronađena je statistički značajna razlika u polimorfizmu genima na poziciji -318, za T alel i T/T genotip. Nije ustanovljena razlika između pacijenata afro i evro brazilskog porekla. Takođe ustanovljeno je pri SNP na poziciji -1722, prisustvo C alela i C/C genotipa ukazuju na povećanu predispoziciju u ukupnom broju pacijenata sa PF [19].

### **1.8.3. Polimorfizmi rs1800629 i rs361525 u genu za TNF**

TNF je potentan proinflamatorni citokin za koji je ustanovljeno da je povišen u serumu i kutanim lezijama pacijenata sa PV [15], međutim nije ustanovljeno da je povišen kod pacijenata sa PF [59]. Moguće je da 1800629 A alel povećava ekspresiju TNF [60]. Ustanovljeno je da je TNF-308 A alel udružen sa HLA-A1/B8/DR3 haplotipom [61].

TNF utiče na povećanje produkcije C3 komponente komplemента i na aktivaciju plazminogena što može da doprinese procesu akantolize [11, 17]. U studiji rađenoj u Egiptu na 70 pacijenata i 203 zdravih kontrola, ispitivan je G/A polimorfizam rs1800629 i nije ustanovljena značajna razlika u frekvenciji alela između egipatskih pacijenata sa PV i PF i zdravih kontrola. U studiji rađenoj u Poljskoj [21], pored polimorfizma rs1800629 ispitivan je i polimorfizam rs361525 na poziciji -238 G/A kod 53 pacijenata sa pemfigusom i 87 kontrola. Nije ustanovljena značajna razlika u polimorfizmu na poziciji -308 G/A između pacijenata sa PV i zdravih kontrola dok je frekvencija A alela bila češća kod pacijenata sa PF nego kod zdravih kontrola. U istoj studiji ustanovljeno je

da polimorfizam na poziciji -238 G/A nije bio značajno udružen sa PV i PF. U studiji u Argentini rađenoj na 20 pacijenata i 24 zdrave kontrole analiziran je polimorfizam na poziciji -308 u genu za TNF, i nije ustanovljena značajna razlika između pacijenata sa pemfigusom i zdravih kontrola [18].

#### **1.8.4. Polimorfizmi rs1800896 i rs 1800871 u genu za IL-10**

IL-10 je pleotropni citokin koji može da utiče na produkciju imunoglobulina, ali takođe pokazuje i značajne regulatorne efekte uključujući i smanjenje sinteze različitih citokina kao što su IL-1, IL-6, TNF, IL-12 i drugi [62]. Dosadašnje studije ukazuju da je produkcija citokina barem delom regulisana polimorfizmima gena koji ih kodiraju [16, 37]. U skladu sa tim IL-10 može da učestvuje u patogenezi PV indukcijom sinteze autoantitela na sistemskom nivou dok lokalno u koži, može da utiče na smanjenje inflamacije, supresiju akantolize i prevenciju daljeg oštećenja kože [63]. Do sada je ispitivano nekoliko polimorfizama u promotoru gena za IL 10, uključujući i SNP -1082 G/A (rs 1800896), -819 C/T i na poziciji -592 C/A (rs1800871). Ustanovljeno je da rs1800872 (-592 C/A), rs1800896 (-1082 A/G) i rs1800871 (-819 C/T) utiču na transkripciju i sekreciju IL-10 rs1800896 (-1082 A/G) i rs1800871 (-819 C/T) utiču na transkripciju i sekreciju IL-10 [64-66].

U studiji u Slovačkoj analizom ovih polimorfizma nije ustanovljena udruženost sa povećanom predispozicijom za PV. Međutim ustanovljeno je da je kombinacija nekih alela, na primer ACC haplotip navedenih polimorfnihih mesta promotora IL-10 češća kod pacijenata nego kod zdravih kontrola [16]. Pored toga u studiji rađenoj u Argentini koja je obuhvatila 20 pacijenata i 24 zdrave kontrole analiziran je polimorfizam na poziciji -1082 G/A i -819 C/T i ustanovljeno je da je frekvencija IL-10 (-819) T alela veća kod pacijenata u odnosu na kontrole [18].



## **2. Ciljevi**

Savremena istraživanja ukazuju da je pemfigus multifaktorijelna bolest posredovana imunskim mehanizmima, sa jasnom genetskom predispozicijom i služi kao model za izučavanje kompleksnih mehanizama autoimunosti.

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

Zbog toga su ciljevi istraživanja obuhvaćenih ovom doktorskom disertacijom bili:

1. Utvrditi distribuciju relevantnih alela (*CD86*, *CTLA4*, *TNF*, i *IL10*) u populaciji zdravih osoba na teritoriji Republike Srbije (dobrovoljni davaoci krvi).
2. Odrediti distribuciju relevantnih alela (*CD86*, *CTLA4*, *TNF*, i *IL10*) u grupi pacijenata sa pemfigusom.
3. Utvrditi da li neki od ispitivanih polimorfizama predstavlja faktor rizika za nastanak pemfigusa.
4. Utvrditi da li se distribucije ispitivanih polimorfizama kod pacijenata sa pemfigusom i dobrovoljnih davaoca krvi u našoj sredini razlikuju u odnosu na studije u kojima su ovi polimorfizmi ispitivani u drugim populacijama (različitim etničkim grupama i na drugim geografskim lokacijama).

### **3. Materijal i metode**

### **3.1. Pacijenti oboleli od pemfigusa**

#### **3.1.1. Selekcija ispitanika**

Izvedena je studija preseka u koju su bili uključeni bolesnici oboleli od pemfigusa lečeni na Klinici za dermatovenerologiju Kliničkog centra Srbije u periodu od 2011 do 2013 godine. Studija je planirana u skladu sa etičkim standardima datim u Helsinškoj deklaraciji (prema revidiranoj verziji iz 1983. godine) i u skladu sa pravilima Etičkog komiteta Kliničkog centra Srbije i Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Definisani kriterijumi za uzimanje uzorka krvi podrazumevali su da pacijenti budu stariji od 18 godina i da su potpisali dobrovoljni pristanak za učešće u ispitivanju. Sakupljeni su uzorci od 61 konsekutivnih pacijenata obolelih od pemfigus vulgarisa i pemfigus foliaceusa lečenih na Klinici za dermatovenerologiju Kliničkog centra Srbije. Pacijenti su podeljeni u dve grupe na osnovu forme bolesti tako da je 48 pacijenata bilo sa PV a 13 sa PF.

Kontrolnu grupu činilo je 486 su dobrovoljnih davaoca krvi, čija je krv uzimana u Institutu za transfuziju krvi Srbije i koji nisu oboleli od pemfigusa ili drugih zapaljenjskih ili autoimunskih bolesti.

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

Uslov za isključivanje iz istraživanja bila je želja ispitanika da ne učestvuje u istraživanju.

#### **3.1.2. Kriterijumi za postavljanje dijagnoze**

Kriterijumi za postavljanje dijagnoze bili su klinička slika, pozitivan nalaz DIF testa kao i histopatološki nalaz koji potvrđuje postojanje intraepidermalnog rascepa.

#### **3.1.3. Uzorci kože pacijenata obolelih od pemfigusa**

Od pacijenata obolelih od pemfigusom uzimani su uzorci kože za direktni imunofluorescentni test i hematoksilin – eozin bojenje. Svi pacijenti nalazili su se na bolničkom lečenju tokom 2011 do 2013. godine na Klinici za dermatovenerologiju Kliničkog Centra Srbije. Uzorci perilezione kože za DIF test i sa ivice bule dobijeni su elipsastom ekscizionom biopsijom. Na koži je obeleženo mesto uzimanja uzorka, koža je očišćena 70% etanolom i ostavljena da se osuši. Zatim je iz šprica u koji je prethodno

uvučeno 0,5 ml rastvora 1% lidokaina sa adrenalinom, potkožno, insulinskom iglom, ubrizgavan anestetik. Skalpelom su pravljene rezovi na obodu infiltriranog tkiva a zatim je deo kože zahvatan pincetom i povlačen blago na gore, a skalpelom je horizontalnim potezima dalje vršena ekscizija željenog tkiva što je rezultovalo pojavom elipsastog defekta sa dužom osovinom elipse koja odgovara linijama tenzije kože.

Tako dobijeno tkivo prenošeno je u na staniol i u tečnom azotu transportovano u laboratoriju za pripremu za direktni imunofluorescentni test ili fiksirano u 4% formaldehidu u cilju pripreme za hematoksilin eozin bojenje.

### **3.2. DIF detekcija imunoglobulina i komponenti komplekta u uzorcima tkiva**

Reprezentativni uzorak kože na kome se izvodi DIF predstavlja perileziona, klinički neizmenjena koža. Tehnika uzimanja biopsije kože izvođena je na način koji je opisan u odeljku 3.1.3. Uzorci kože su pincetom spuštani su na staniol a zatim su stavljani u transportnu bocu sa tečnim azotom kako bi se transportovali do laboratorije. Neposredno po prijemu uzorka, uzorci su sečeni u kriokatu (debljina isečka je do 4 $\mu$ m) a zatim su na preseke nakapavana antihumana antitela (IgG, IgA, C3c i IgM) obeležena fluorescein izotiocijanatom. Čitanje nalaza DIF testa vršeno je fluorescentnim mikroskopom Leica DFC 295 [27]. DIF testom, su otkrivani depoziti imunoglobulina u intercelularnim prostorima perileziona kože i mukoza kod svih pacijenata sa aktivnim pemfigusom. Tipična je bila retikularna fluorescencija intercelularnih prostora koja nastaje usled vezivanja antitela za dezmozomalne proteine na površini keratinocita. Pored imunoglobulina kod većine pacijenata, detektovani su i C3c depoziti.

### **3.3. Uzimanje uzoraka krvi od ispitanika**

Uzorci krvi za analizu genskih polimorfizama pacijenata obolelih od pemfigusa uzeti su venepunkcijom u Klinici za dermatovenerologiju KCS, dok su uzorci krvi od zdravih ispitanika uzimani u Institutu za transfuziju krvi Srbije. Od svakog ispitanika uzet je uzorak pune krvi (3 ml) u vacutainer epruvetu sa EDTA kao antikoagulantom. Uzorci krvi su čuvani na 4°C i transportovani unutar 4h do laboratorije za imunologiju, Medicinskog fakulteta u Beogradu gde su dalje obrađivani, i gde je izolovana i čuvana genomska DNK.

### **3.4. Priprema DNK iz uzoraka krvi ispitanika za analizu polimorfizama**

#### **3.4.1. Izolacija DNK**

Za izolaciju DNK iz krvi ispitanika korišćen je GeneJet Genomic DNA Purification Kit (Fermentas) prema uputstvu proizvođača. Pre početka izolacije puferima Wash buffer I i Wash buffer II dodata je potrebna količina 100% etanola (Zorka). Ukratko, krv u vacutainer epruvetama je promešana invertovanjem osam puta nakon čega je iz svake uzimano po 200 µl krvi i prenošeno u ependorf epruvete od 1,5 ml (Sarsted). Zatim je svakom uzorku dodavano po 400 µl rastvora za liziranje (Lysis Solution) i 20 µl proteinaze K. Nakon toga svi uzorci su kratko vorteksirani i inkubirani 10 minuta u vodenom kupatilu na 56°C uz povremeno mešanje (2-3 puta) invertovanjem epruveta. Posle toga, u svaki uzorak je dodavano po 200 µl 100% etanola a zatim vorteksirano. Po vorteksiranju, sav sadržaj je prebacivan u kolone ubačene u ependorf epruvete od 2ml sa odsečenim poklopcem. Sadržaj kolona je potom centrifugiran 1 minut na 6000 x g (na sobnoj temperaturi) nakon čega su kolone sa vezanom DNK prebacivane u kivete za otpad koje su sastavni deo je GeneJet Genomic DNA Purification kompleta. DNK vezane za matriks kolona su ispirane dodavanjem po 500 µl Wash Buffer I i centrifugiranjem kolona u trajanju od 1 minut na 8000 x g. Sadržaj kiveti za otpad je zatim odlivan a u kolone je dodavano po 500 µl Wash Buffer II. Nakon toga, kolone su centrifugirane 3 minuta na maksimalnoj brzini (14 000 x g) a ukoliko bi u njima ostalo još tečnosti, nakon pražnjenja kiveti za otpad centrifugiranje se ponavljalo još još 1 minut na istoj brzini. Posle toga kolone sa vezanom DNK su prebacivane u nove Eppendorf Safe Lock epruvete od 1,5 ml (Eppendorf) i pristupalo se izdvajanju DNK vezane za matriks kolone na sledeći način. U svaku kolonu dodavano 200 µl pufera za eluciju (Elution Buffer), zatim su kolone inkubirane 2 minuta na sobnoj temperaturi i centrifugirane 1 minut na 8000 x g. Izolovanim DNK je zatim određivana koncentracija i čistoća spektrofotometrijski.

### 3.4.2. Određivanje koncentracije i čistoće izolovane DNK

Uzorak od 8  $\mu$ l izolovane DNK nanošen je u mikrokivetu Gene Quant Pro Calculatora (Pharmacia) 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 je ponavljana izolacija DNK iz uzorka krvi. Izolovane DNK su po pravilu bile koncentracije od oko 20 ng/ $\mu$ l. Iz izolovane DNK uzimani su uzorci od 500 ng i dopunjavani do zapremine od 125  $\mu$ l čime su dobijana razblaženja od 4 ng/ $\mu$ l koja su korišćena za određivanje polimorfizama. Ostatak DNK je čuvan na -20°C.

### 3.5. Određivanje polimorfizama *CD86* (rs1129055), *CTLA4* (rs733618 i rs5742909), *TNF* (rs1800629 rs361525) i *IL 10* (rs1800896 i rs1800871)

Za detekciju i analizu polimorfizama gena za CD86, CTLA-4, TNF i IL-10 korišćene su komercijalne optimizovane smeše specifičnih oligonukleotida i TaqMan proba obeleženih FAM i VIC fluorohromima i to: CD86 rs1129055 (C\_\_7504226\_10), CTLA-4 rs733618 (C\_\_2415791\_10) i rs5742909 (C\_\_27834180\_10), TNF rs1800629 (C\_\_7514879\_10) i rs361525 (C\_\_2215707\_10) i IL-10 rs1800896 (C\_\_1747360\_10) i rs 1800871 (C\_\_1747362\_10) (PE, Applied Biosystems). Amplifikacija fragmenata DNK Real-time PCR metodom vršena je pomoću navedenih smeša komercijalnih oligonukleotida i Maxima™ Probe qPCR 2X Master Mix, (Fermentas) uzimajući u obzir preporuke proizvođača reagenasa. Ukratko, amplifikacija je vršena u optičkim pločama za PCR, formata 8 x 12 bunarčića (PE, Applied Biosystems), u koje su sipane reakcione smeše od 5  $\mu$ l 2 x Real Master Mix Probe (Fermentas), 0,25  $\mu$ l komercijalne smeše oligonukleotida za detekciju navedenih polimorfizama i 4,75  $\mu$ l ispitivanog DNK uzorka (4 ng /  $\mu$ l). Ploče su zatim zatvarane lepljenjem optičkog filma (PE, Applied Biosystems), kratko centrifugirane na 1500 x g i smeštane u termoblok Realplex<sup>2</sup> PCR mašine (Eppendorf). Ploče su pre amplifikacije inkubirane u termobloku 4 minuta na 95°C da bi se aktivirala DNK polimeraza. Temperaturni profil amplifikacije je bio 95°C 15 sec →

60°C 1 minut sa 39 ponavljanja. Merenje fluorescencije u svakom ciklusu vršeno je na 60°C. Po završetku amplifikacije određivani su aleli pomoću Realplex 2.0 softvera uz ručno podešavanje linije praga detekcije.

### **3.6. Statistička obrada podataka**

Distribucije frekvencija alela i genotipova određivane su kod pacijenata sa pemfigusom i zdravih osoba (kontrolna grupa). Testiranje Hardy-Weinberg ravnoteže vršeno je pomoću online kalkulatora [67]. Statistička analiza uključivala je primenu  $\chi^2$  testa ili Fišerovog testa tačne verovatnoće za procenu značajnosti razlike u frekvenciji alela i genotipova kod pacijenata i kontrola. Efekti genetskog polimorfizma, i rizika za oboljevanje od pemfigusa su procenjivani određivanjem OR (odds ratio) sa intervalom poverenja od 95% (95% IP) za svaki ispitivani polimorfizam.

U svim testovima vrednosti verovatnoće, p-vrednosti manje od 0,05 smatrane su značajnima, a manje od 0,01 visoko značajnim.



## **4. Rezultati**

#### 4.1. Ispitivanje polimorfizma gena za CD86 (*rs1129055*) kod kontrola i pacijenata sa pemfigusom

Ispitivanje **rs1129055** polimorfizma u genu za CD86 vršeno je TaqMan PCR metodom pomoću komercijalnih oligonukleotida. Rezultati distribucije alela i genotipova prikazani su u tabeli 1.

Pored toga, u tabeli 1 prikazana je i distribucija nosioca G i A alela kod ispitanika, pri čemu su nosioci A osobe sa GA i AA genotipovima, a nosioci G su osobe sa GA i GG genotipovima. Pacijenti sa pemfigusom u tabeli 1 su prikazani kao jedna grupa (ukupni pemfigus) i podeljeni u dve podgrupe (PV i PF) u odnosu na kliničku sliku pemfigusa.

**Tabela 1.** Aleli i genotipovi rs1129055 polimorfizma kod zdravih kontrola i pacijenata

CD86 rs1129055		Kontrole		Pemfigus					
		n	f	Ukupno		PV		PF	
		n	f	n	f	n	f	n	f
Aleli	<b>G</b>	722	0,743	80	0,656	62	0,646	18	0,692
	<b>A</b>	250	0,257	42	0,344	34	0,354	8	0,308
Genotipovi	<b>GG</b>	273	0,562	25	0,410	18	0,375	7	0,538
	<b>GA</b>	176	0,362	30	0,492	26	0,542	4	0,308
	<b>AA</b>	37	0,076	6	0,098	4	0,083	2	0,154
Nosioci	<b>G</b>	449	0,924	55	0,902	44	0,917	11	0,846
	<b>A</b>	213	0,438	36	0,590	30	0,625	6	0,462

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

**Tabela 2.** Testiranje odstupanja distribucije genotipova od Hardy-Weinberg ravnoteže CD86 rs1129055

CD86 rs1129055	Kontrole	Pemfigus	Ukupno
<b>GG</b>	273	25	298
<b>GA</b>	176	30	206
<b>AA</b>	37	6	43
Ukupno	486	61	547
HWE*	$X^2=1,33$	$X^2=0,49$	$X^2=0,77$

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

Dobijeni rezultati pokazuju da je distribucija genotipova **rs1129055** polimorfizma gena za CD86 bila u Hardy-Weinberg ravnoteži,  $p>0,05$ .

Kao što je prikazano u tabeli 3, ustanovljeno je A alel *CD86* rs1129055 statistički značajno češći kod pacijenata sa pemfigusom ( $P=0,40$ ) i kod pacijenata sa PV ( $p=0,040$ ) u odnosu na zdrave kontrole. Nije ustanovljena statistički značajna razlika u odnosu na distribuciju alela kod pacijenata sa PF i PV. Ustanovljeno je takođe, na osnovu vrednosti OR da su nosioci *CD86* rs1129055 A alela od značajno većim rizikom da razviju pemfigus ( $OR=1,52$ ,  $95\% CI=1,02-2,26$ ) i pemfigus vulgaris ( $OR=1,58$ ,  $95\% CI=1,02-2,46$ ). Sa druge strane GG genotip je protektivan za nastanak pemfigusa i naročito PV ( $p=0,025$  i  $p=0,013$ ). Shodno tome, nosioci A alela su bili pod većim rizikom za nastanak pemfigusa ( $OR=1,85$ ,  $95\% CI=1,07-3,17$ )  $p=0,025$  i to naročito PV forme ovog oboljenja ( $OR=2,14$ ,  $95\% CI=1,16-3,94$ ).

**Tabela 3.** Statistička analiza distribucija alela, genotipova, nosioca alela rs1129055 polimorfizma gena za *CD86* između pacijenata sa pemfigusom i kontrola

<i>CD86</i> rs1129055		Pemfigus/Kontrole		PV/Kontrole	
		p	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)
Aleli	G	<b>0,040</b>	0,66 (0,44-0,98)	<b>0,040</b>	0,63 (0,41-0,98)
	A	<b>0,040</b>	1,52 (1,02-2,26)	<b>0,040</b>	1,58 (1,02-2,46)
Genotipovi	GG	<b>0,025</b>	0,54 (0,32-0,93)	<b>0,013</b>	0,47 (0,25-0,86)
	GA	<b>0,049</b>	1,70 (1,00-2,91)	<b>0,014</b>	2,08 (1,15-3,78)
	AA	0,611	1,32 (0,53-3,28)	1,000	1,10 (0,38-3,24)
Nosioci	G	0,611	0,76 (0,31-1,87)	1,000	0,91 (0,31-2,66)
	A	<b>0,025</b>	1,85 (1,07-3,17)	<b>0,013</b>	2,14 (1,16-3,94)

U tabeli 4 prikazani su rezultati poređenja distribucije alela i genotipova **rs1129055** polimorfizma kod svih pacijenata obolelih od PF i zdravih kontrola kao i između podgrupa pacijenata obolelih od pemfigusa. Statistička analiza je pokazala da nema značajne razlike u distribuciji alela i genotipova između pacijenata obolelih od PF i zdravih kontrola kao ni između podgrupa obolelih od pemfigusa.

**Tabela 4.** Statistička analiza distribucija alela, genotipova, nosioca alela rs1129055 polimorfizma gena za CD86 između pacijenata sa PF i kontrola kao i pacijenata obolelih od PF i PV

CD86 rs1129055		PF/Kontrole		PF/PV	
		p	OR (95% IP)	p	OR (95% CI)
Aleli	<b>G</b>	0,560	0,78 (0,33-1,81)	0,655	1,23 (0,49-3,13)
	<b>A</b>	0,560	1,28 (0,55-2,99)	0,655	0,81 (0,32-2,06)
Genotipovi	<b>GG</b>	0,862	0,91 (0,30-2,75)	0,288	1,94 (0,56-6,70)
	<b>GA</b>	0,778	0,78 (0,24-2,58)	0,134	0,38 (0,10-1,39)
	<b>AA</b>	0,612	2,21 (0,47-10,3)	0,599	2,00 (0,32-12,3)
Nosioći	<b>G</b>	0,612	0,45 (0,10-2,12)	0,599	0,50 (0,08-3,09)
	<b>A</b>	0,862	1,10 (0,36-3,32)	0,288	0,51 (0,15-1,77)

PF, *Pemfigus foliaceus*; PV, *Pemfigus vulgaris*; OR, Odds ratio (odnos šansi); IP, interval poverenja

Kako bi se utvrdilo da li postoje razlike između frekvencija G i A alela rs1129055 polimorfizma gena za CD86 između uzoraka dobijenih od zdravih osoba iz Srbije i zdravih osoba sa drugih geografskih područja, raspodela alela u populaciji zdravih osoba iz Srbije je upoređena sa podacima za druge populacione grupe. Ovi rezultati su prikazani u tabeli 5.

**Tabela 5.** rs1129055 polimorfizam gena za CD86 kod zdravih osoba u različitim populacijama

Referenca	Populacija	Broj	Metod	G alel (%)	A alel (%)	p
[ST]	Srbija	486	TaqMan	74,3	25,7	NP
[68]	Kina	150	PCR/RLFP	47,0	53,0	<b>0,0001</b>
[69]	Iran	128	ARMS PCR	55,1	44,9	<b>0,0001</b>
[70]	Kina	303	PCR/RFLP	45,8	54,2	<b>0,0001</b>
[71]	Kina	412	PCR/RFLP	47,2	52,8	<b>0,0001</b>

NP, nije primenjivo; [ST], Ova disertacija.

Rezultati prikazani u tabeli 5 pokazuju da je ustanovljena je visoko statistički značajna razlika u frekvenciji G i A alela između zdrave populacije Srbije i populacija Kine i Irana.

#### 4.2. Ispitivanje polimorfizma gena za CTLA4 (*rs733618*) kod kontrola i pacijenata sa pemfigusom

Ispitivanje *rs733618* polimorfizma u genu za CTLA4 vršeno je TaqMan PCR metodom pomoću komercijalnih oligonukleotida. Rezultati distribucije alela i genotipova prikazani su u tabeli 6.

Pored toga, u tabeli 6 prikazana je i distribucija nosioca C i T alela kod ispitanika, pri čemu su nosioci C osobe sa CC i CT genotipovima, a nosioci T su osobe sa CT i TT genotipovima. Pacijenti sa pemfigusom u tabeli 6 su prikazani kao jedna grupa (ukupni pemfigus) i podeljeni u dve podgrupe (PF i PV) u odnosu na kliničku sliku pemfigusa.

**Tabela 6.** CTLA4 *rs733618* aleli, genotipovi, nosioci i frekvencije kod zdravih kontrola i pacijenata

CTLA4 <i>rs733618</i>		Kontrole		Pemfigus					
		n	f	Ukupno		PV		PF	
		n	f	n	f	n	f	n	f
Aleli	T	877	0,902	109	0,893	85	0,885	24	0,923
	C	95	0,098	13	0,107	11	0,115	2	0,077
Genotipovi	TT	396	0,815	48	0,787	37	0,771	11	0,846
	TC	85	0,175	13	0,213	11	0,229	2	0,154
	CC	5	0,010	0	0,000	0	0,000	0	0,000
Nosioci	T	481	0,990	61	1,000	48	1,000	13	1,000
	C	90	0,185	13	0,213	11	0,229	2	0,154

U cilju testiranja da li distribucija genotipova odgovara distribuciji alela koji su određeni za ispitanike u ovom istraživanju izračunato je da li se dobijeni rezultati učestalosti genotipova nalaze u Hardy-Weinberg ravnoteži (Tabela 7).

**Tabela 7.** Testiranje odstupanja distribucije genotipova od Hardy-Weinberg ravnoteže *rs733618*

CTLA4 <i>rs733618</i>	Kontrole	Pemfigus	Ukupno	
Genotipovi	CC	5	0	5
	CT	85	13	98
	TT	396	48	444
Ukupno		486	61	547
HWE*		$X^2=0,03$	$X^2=0,87$	$X^2=0,03$

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

Dobijeni rezultati pokazuju da je distribucija genotipova *rs733618* polimorfizma gena za CTLA4 bila u Hardy-Weinberg ravnoteži,  $p>0,05$ .

U tabeli 8 su prikazani rezultati poređenja distribucije alela i genotipova rs733618 polimorfizma kod pacijenata sa pemfigusom i kontrola. Statistička analiza je pokazala da ne postoji statistički značajna razlika u distribuciji alela i genotipova između pacijenata sa pemfigusom i kontrola, kao ni između podgrupe pacijenata sa PV i PF i kontrola. Ipak, na osnovu odnosa šansi (OR) u okviru intervala poverenja od 95% (95% IP) rezultati ukazuju da bi C alel potencijalno predstavljao faktor rizika za nastanak pemfigusa jer vrednosti odnosa šansi iznose 1.10 (95% IP) kada se poredi zdrave osobe i oboleli od pemfigusa. Pored toga C alel bi mogao da predstavlja povećan rizik od razvoj PV OR 1.19 (IP 95%), dok T alel nosi povišen rizik od razvoja PF OR 1,30 (IP 95%). Takođe nije ustanovljena statistički značajna razlika kada su se poredile grupe obolelih od PV i PF

**Tabela 8.** Statistička analiza distribucija alela, genotipova, nosioca alela rs733618 polimorfizma gena za *CTLA4* između pacijenata sa pemfigusom i kontrola kao i pacijenata obolelih od pemfigus vulgarisa i kontrola

<i>CTLA4</i> rs733618		Pemfigus/Kontrola		PV/ Kontrola	
		p	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)
Aleli	T	0,764	0,91 (0,49-1,68)	0,596	0,84 (0,43-1,62)
	C	0,764	1,10 (0,60-2,03)	0,596	1,19 (0,61-2,32)
Genotipovi	TT	0,596	0,84 (0,43-1,61)	0,458	0,76 (0,38-1,56)
	TC	0,462	1,27 (0,66-2,46)	0,350	1,40 (0,69-2,86)
	CC	1,000*	NP	1,000*	NP
Nosioći	T	1,000*	NP	1,000*	NP
	C	0,596	1,19 (0,62-2,29)	0,458	1,31 (0,64-2,66)

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

U tabeli 9, prikazani su rezultati poređenja distribucije alela i genotipova rs733618 polimorfizma kod svih pacijenata obolelih od PF i zdravih kontrola kao i kod podgrupa pacijenata obolelih od PF i PV. Statistička analiza je pokazala da ne postoji statistički značajna razlika u distribuciji alela i genotipova između pacijenata obolelih od PF i zdravih kontrola kao ni između podgrupa obolelih od PV i PF.

**Tabela 9.** Statistička analiza distribucija alela, genotipova, nosioca alela rs733618 polimorfizma gena za *CTLA4* između pacijenata sa PF i kontrola kao i pacijenata obolelih od PF i PV

<i>CTLA4</i> rs733618		PF/Kontrole		PF/PV	
		p	OR (95% IP)	p	OR (95% CI)
Aleli	T	1,000*	1,30 (0,30-5,59)	0,733*	1,55 (0,32-7,49)
	C	1,000*	0,77 (0,18-3,31)	0,733*	0,64 (0,13-3,11)
Genotipovi	TT	1,000*	1,25 (0,27-5,74)	0,715*	1,63 (0,31-8,51)
	TC	1,000*	0,86 (0,19-3,94)	0,715*	0,61 (0,12-3,19)
	CC	1,000*	NP	1,000*	NP
Nosioći	T	1,000*	NP	1,000*	NP
	C	1,000*	0,80 (0,17-3,67)	0,715*	0,61 (0,12-3,19)

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

Kako bi se utvrdilo da li postoje razlike između frekvencija C i T alela rs733618 polimorfizma gena za *CTLA4* između uzoraka dobijenih od zdravih osoba (kontrolna grupa) iz Srbije i zdravih osoba sa drugih geografskih područja, izvršena je raspodela alela u populaciji zdravih osoba iz Srbije i upoređena je sa podacima za druge populacione grupe. Ovi rezultati su prikazani u tabeli 10,

**Tabela 10.** rs733618 polimorfizam gena za *CTLA4* kod zdravih osoba u različitim populacijama

Referenca	Populacija	Broj	Metod	G alel (%)	A alel (%)	p
[ST]	Srbija	486	TaqMan	90,2	9,8	NP
[72]	Španija	1517	TaqMan	94,3	5,7	<b>0,0001</b>
[73]	Kina	233	PCR/ RFLP	67,2	32,8	<b>0,0001</b>
[74]	Kina	657	PCR/LDR	58,6	41,4	<b>0,0001</b>
[75]	Nemačka	100	PCR/ASRA	83,9	16,1	0,4348

NP, nije primenjivo; [ST], Ova disertacija.

Rezultati prikazani u tabeli 10 pokazuju da je ustanovljena je visoko statistički značajna razlika u frekvenciji C i T alela između zdrave populacije Srbije i populacija Španije i Kine, dok nije ustanovljena statistički značajna razlika u frekvenciji C i T alela između zdrave populacije Srbije i zdrave populacije Nemačke.

### 4.3. Ispitivanje polimorfizma gena za CTLA4 (*rs5742909*) kod kontrola i pacijenata sa pemfigusom

Ispitivanje *rs5742909* polimorfizma u genu za CTLA4 vršeno je TaqMan PCR metodom pomoću komercijalnih oligonukleotida. Rezultati distribucije alela i genotipova prikazani su u tabeli 11.

Pored toga, u tabeli 11 prikazana je i distribucija nosioca C i T alela kod ispitanika, pri čemu su nosioci C osobe sa CC i CT genotipovima, a nosioci T su osobe sa CT i TT genotipovima. Pacijenti sa pemfigusom u tabeli 11 su prikazani kao jedna grupa (ukupni pemfigus) i podeljeni u dve podgrupe (PF i PV) u odnosu na kliničku sliku pemfigusa.

**Tabela 11.** Aleli i genotipovi *rs5742909* polimorfizma kod zdravih kontrola i pacijenata

<i>CTLA4</i> ( <i>rs5742909</i> )	Kontrole				Pemfigus				
		n	f	Ukupno		PV		PF	
				n	f	n	f	n	f
Aleli	C	870	0,895	112	0,918	91	0,948	21	0,808
	T	102	0,105	10	0,082	5	0,052	5	0,192
	CC	392	0,807	51	0,836	43	0,896	8	0,615
Genotipovi	CT	86	0,177	10	0,164	5	0,104	5	0,385
	TT	8	0,016	0	0,000	0	0,000	0	0,000
Nosioci	C	478	0,984	61	1,000	48	1,000	13	1,000
	T	94	0,193	10	0,164	5	0,104	5	0,385

U cilju testiranja da li distribucija genotipova odgovara distribuciji alela koji su određeni za ispitanike u ovom istraživanju izračunato je da li se dobijeni rezultati učestalosti genotipova nalaze u Hardy-Weinberg ravnoteži (Tabela 12).

**Tabela 12.** Testiranje odstupanja distribucije genotipova od Hardy-Weinberg ravnoteže *CTLA4* *rs5742909*

<i>CTLA4</i> <i>rs5742909</i>	Kontrole	Pemfigus	Ukupno
CC	392	51	443
CT	86	10	96
TT	8	00	8
Ukupno	486	61	547
HWE*	$X^2=1,64$	$X^2=0,49$	$X^2= 1,11$

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



Dobijeni rezultati pokazuju da je distribucija genotipova rs5742909 polimorfizma gena za CTLA4 bila u Hardy-Weinberg ravnoteži,  $p > 0,05$ .

U tabeli 13 su prikazani rezultati poređenja distribucije alela i genotipova rs5742909 polimorfizma kod pacijenata sa pemfigusom i kontrola kao i poređenje između grupa pacijenata sa PV i PF. Ustanovljena je statistički značajna razlika u zastupljenosti T alela koji češći kod pacijenata sa PF u odnosu na pacijente sa PV ( $p = 0,028$ , OR=5.37, 95% CI=1.26-22.9). Nije ustanovljena statistički značajna razlika u zastupljenosti alela, genotipova kao i nosiocima C i T alela u poređenju ostalih grupa. Međutim na osnovu vrednosti odnosa šansi, može se pretpostaviti da je prisustvo C alela nosi povećan rizik od razvoja PV (OR 2.13, IP 95%) dok prisustvo T alela nosi povećan rizik od razvoja PF (OR 2,03 IP 95%) kada se grupe pacijenata porede sa zdravom, kontrolnom populacijom.

**Tabela 13.** Statistička analiza distribucija alela, genotipova, nosioca alela rs5742909 polimorfizma gena za CTLA4 između pacijenata sa pemfigusom i kontrola kao i pacijenata obolelih od PV i kontrola

<i>CTLA4 rs5742909</i>		Pemfigus/Kontrola		PV/ Kontrola	
		p	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)
Aleli	C	0,431	1,31 (0,67-2.59)	0,100	2,13 (0,85-5,37)
	T	0,431	0,76 (0,39-1.50)	0,100	0,47 (0,19-1,18)
	CC	0,578	1.22 (0,60-2.50)	0,129	2,06 (0,80-5,35)
Genotipovi	CT	0,806	0,91 (0,45-1.87)	0,200	0,54 (0,21-1.41)
	TT	0,607*	NP	0,625*	NP
Nosioći	C	0,607*	NP	0,625*	NP
	T	0,578	0,82 (0,40-1.67)	0,129	0,48 (0,19-1,26)

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

U tabeli 14, prikazani su rezultati poređenja distribucije alela i genotipova rs5742909 polimorfizma kod pacijenata obolelih od PF i zdravih kontrola kao i kod podgrupa pacijenata obolelih od PF i PV. Statistička analiza je pokazala da ne postoji statistički značajna razlika u distribuciji alela i genotipova između pacijenata obolelih od PF i zdravih kontrola. Analizom podataka ustanovljena je statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) između pacijenata obolelih od PF i PV. Dobijeni rezultati OR u okviru IP 95% ukazuju da je prisustvo T alela bilo zastupljenije kod pacijenata sa PF u poređenju sa obolelima od PV ( $p = 0,035$ , OR=4.33, 95% CI=1.15-16.3).

**Tabela 14.** Statistička analiza distribucija alela, genotipova, nosioca alela rs5742909 polimorfizma gena za CTLA-4 između pacijenata sa PF i kontrola kao i pacijenata obolelih od PF i PV

<i>CTLA4</i> rs5742909		PF/Kontrole		PF/PV	
		p	OR (95% IP)	p	OR (95% CI)
Aleli	<b>C</b>	0,187*	0,49 (0,18-1,33)	<b>0,035*</b>	0,23 (0,06-0,87)
	<b>T</b>	0,187*	2,03 (0,75-5,50)	<b>0,035*</b>	4,33 (1,15-16,3)
Genotipovi	<b>CC</b>	0,148*	0,38 (0,12-1,20)	<b>0,028*</b>	0,19 (0,04-0,79)
	<b>CT</b>	0,069*	2,91 (0,93-9,10)	<b>0,028*</b>	5,37 (1,26-22,9)
	<b>TT</b>	1,000*	NP	1,000*	NP
Nosioći	<b>C</b>	1,000*	NP	1,000*	NP
	<b>T</b>	0,148*	2,61 (0,83-8,15)	<b>0,028*</b>	5,37 (1,26-22,9)

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

Kako bi se utvrdilo da li postoje razlike između frekvencija C i T alela rs5742909 polimorfizma gena za CTLA4 između uzoraka dobijenih od zdravih osoba (kontrolna grupa) iz Srbije i zdravih osoba sa drugih geografskih područja, izvršena je raspodela alela u populaciji zdravih osoba iz Srbije i upoređena je sa podacima za druge populacione grupe. Ovi rezultati su prikazani u tabeli 15.

**Tabela 15.** rs5742909 polimorfizam gena za CTLA4 kod zdravih osoba u različitim populacijama

Referenca	Populacija	Broj	Metod	G alel (%)	A alel (%)	p
[ST]	Srbija	486	TaqMan	89,5	10,5	NP
[69]	Iran	128	PCR/ ARMS	92,1	7,9	0,2017
[70]	Kina	303	PCR/RFLP	83,2	16,8	<b>0,0003</b>
[76]	Poljska	509	TaqMan	90,4	9,6	0,7083
[72]	Španija	1515	TaqMan	89,9	10,1	0,7518
[77]	Kina	150	MarsArray	85,0	15,0	<b>0,0452</b>
[78]	Estonija	230	PCR/ ARMS	88,0	12,0	0,4095
[79]	SAD	92	PCR/SSP	95,1	4,9	<b>0,0198</b>

NP, nije primenjivo; [ST], ova disertacija

Rezultati prikazani u tabeli 15 pokazuju da je ustanovljena je visoko statistički značajna razlika u frekvenciji C i T alela između zdrave populacije Srbije i populacije Kine, statistički značajna razlika u frekvenciji C i T alela između zdrave populacije Srbije i populacija Kine i SAD dok nije ustanovljena statistički značajna razlika između populacija Srbije, Irana, Poljske, Španije i Estonije.

#### 4.4. Ispitivanje polimorfizma gena za TNF (*rs1800629*) kod kontrola i pacijenata sa pemfigusom

Ispitivanje *rs1800629* polimorfizma u promotoru gena za TNF vršeno je TaqMan PCR metodom pomoću komercijalnih oligonukleotida. Rezultati distribucije alela i genotipova prikazani su u tabeli 16. Pored toga, u tabeli prikazana je i distribucija nosioca G i A alela kod ispitanika, pri čemu su nosioci G osobe sa GG i GA genotipovima, a nosioci A su osobe sa GA i AA genotipovima. Pacijenti sa pemfigusom u tabeli 16 su prikazani kao jedna grupa (ukupno pemfigus) i podeljeni u dve podgrupe (PF i PV) u odnosu kliničku formu pemfigusa. Kontrole su prikazane zbirno kao rezultati ovog istraživanja sabrani sa prethodno objavljenim rezultatima za populaciju Srbije koji su dobijeni korišćenjem iste metodologije [80].

**Tabela 16.** Aleli i genotipovi *rs1800629* polimorfizma gena za TNF kod kontrola i pacijenata

TNF <i>rs1800629</i>		Kontrole <sup>§</sup>				Pemfigus			
		Ukupno		PV		PF			
		n	f	n	f	n	f		
Aleli	<b>G</b>	842	0,866	113	0,926	88	0,917	25	0,962
	<b>A</b>	130	0,134	9	0,074	8	0,083	1	0,038
Genotipovi	<b>GG</b>	362	0,745	52	0,852	40	0,833	12	0,923
	<b>GA</b>	118	0,243	9	0,148	8	0,167	1	0,077
	<b>AA</b>	6	0,012	0	0,000	0	0,000	0	0,000
Nosioci	<b>G</b>	480	0,988	61	1,000	48	1,000	13	1,000
	<b>A</b>	124	0,255	9	0,148	8	0,167	1	0,077

<sup>§</sup>Sabrane kontrole iz ove disertacije sa prethodno objavljenim podacima za populaciju Srbije [80]

Da bi se testiralo 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-Weinbergovoj ravnoteži (Tabela 17).

**Tabela 17.** Testiranje odstupanja distribucije genotipova od Hardy-Weinberg ravnoteže

TNF <i>rs1800629</i>	Kontrole	Kontrole <sup>§</sup>	Pemfigus	Ukupno	
Genotipovi	<b>GG</b>	166	362	52	413
	<b>GA</b>	56	118	9	127
	<b>AA</b>	5	6	0	6
Ukupno		227	486	60	546
HWE*		$X^2=0,01$	$X^2=1,11$	$X^2=0,39$	$X^2=1,20$

\*Hardy-Weinberg ekvilibrijum, nivo značajnosti;  $p>0,05$ ; <sup>§</sup>Sabrane kontrole iz ove disertacije sa prethodno objavljenim podacima za populaciju Srbije [80]

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

U tabeli 18. prikazani su rezultati poređenja distribucije alela i genotipova rs1800629 polimorfizma kod svih pacijenata obolelih od pemfigusa i zdravih kontrola kao i kod podgrupa pacijenata obolelih od PV i zdravih kontrola. Statistička analiza je pokazala da ne postoji statistički značajna razlika u distribuciji alela i genotipova između pacijenata obolelih od pemfigusa i zdravih kontrola kao ni između podgrupa obolelih od pemfigus vulgarisa i pemfigus foliaceusa i zdravih kontrola.

Ipak, na osnovu vrednosti odnosa šansi (OR) u okviru intervala poverenja od 95% (95% IP) rezultati ukazuju da bi prisustvo G alela potencijalno predstavljao faktor rizika za oboljevanje od pemfigusa jer vrednost odnosa šansi iznosi 1,94 (95% IP 0,94-3,85). Takođe, na osnovu vrednosti OR u okviru intervala poverenja od 95% prisustvo G alela potencijalno povećava i rizik od razvoja pemfigus vulgarisa 1,69 (95% IP 0,80-3,58). Kao što je prikazano u tabeli 18. Prisustvo GG genotipa povećava rizik od razvoja pemfigusa, na osnovu vrednosti odnosa šansi OR 1,97 (95% IP 0,95-4,13) kao i PV OR 1,71 (95% IP 0,78-3,76). Podaci navedeni u tabeli 18 ukazuju da bi A alel mogao da ima donekle protektivnu ulogu tako da bi nosioci A alela imali manji rizik za nastanak pemfigusa. Međutim nijedna od razlika nije dostigla nivo statističke značajnosti.

**Tabela 18.** Statistička analiza distribucija alela, genotipova, nosioca alela rs1800629 polimorfizma gena za TNF između pacijenata sa pemfigusom i kontrola kao i pacijenata obolelih od PV i kontrola

<i>TNF</i> rs1800629		Pemfigus/Kontrole <sup>§</sup>		PV/ Kontrole <sup>§</sup>	
		p	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)
Aleli	<b>G</b>	0,060	1,94 (0,94-3,85)	0,160	1,69 (0,80-3,58)
	<b>A</b>	0,060	0,51 (0,25-1,04)	0,160	0,58 (0,28-1,24)
Genotipovi	<b>GG</b>	0,065	1,97 (0,95-4,13)	0,175	1,71 (0,78-3,76)
	<b>GA</b>	0,097	0,54 (0,26-1,13)	0,237	0,62 (0,28-1,37)
	<b>AA</b>	0,627*	NP	0,627*	NP
Nosioci	<b>G</b>	0,629*	NP	1,000	NP
	<b>A</b>	0,065	0,51 (0,24-1,05)	0,175	0,58 (0,26-1,28)

OR odnos šansi, IP interval poverenja, \*Fišerov test tačne verovatnoće, <sup>§</sup>Sabrane kontrole iz ove disertacije sa prethodno objavljenim podacima za populaciju Srbije [80]. NP nije primenjivo

U tabeli 19 prikazani su rezultati poređenja distribucije alela i genotipova rs1800629 polimorfizma kod pacijenata obolelih od pemfigus foliaceusa i zdravih kontrola kao i kod podgrupa pacijenata obolelih od PF i PV. Na osnovu dobijenih podataka i vrednosti odnosa šansi (OR) uz interval poverenja od 95% u poređenju obolelih od PF i zdravih kontrola nosioci G alela imaju povećan rizik za razvoj pemfigus foliaceusa OR 3,86 (95% IP 0,52-28,3).

Pored toga GG genotip povezan je sa povećanim rizikom za razvoj oboljenja kada se podgrupa obolelih od pemfigus foliaceusa poredi sa zdravom, kontrolnom grupom OR 4,11 (95% IP 0,53-31,93). Na osnovu podataka prikazanih u tabeli 5, nosioci A alela imaju smanjen rizik od razvoja pemfigus foliaceusa, tako da bi A alel mogao da se smatra donekle protektivnim. Međutim nijedna od razlika nije dostigla nivo statističke značajnosti.

**Tabela 19,** Statistička analiza distribucija alela, genotipova, nosioca alela rs1800629 polimorfizma gena za TNF između pacijenata sa PF i kontrola kao i pacijenata obolelih od PF i PV

<i>TNF</i> rs1800629		PF/Kontrole <sup>§</sup>		PF/PV	
		<b>p</b>	<b>OR (95% IP)</b>	<b>p</b>	<b>OR (95% CI)</b>
Aleli	<b>G</b>	0,237*	3,86 (0,52-28,3)	0,682*	2,27 (0,27-19,0)
	<b>A</b>	0,237*	0,26 (0,03-1,93)	0,682*	0,44 (0,05-3,69)
Genotipovi	<b>GG</b>	0,200*	4,11 (0,53-31,9)	0,667*	2,40 (0,27-21,2)
	<b>GA</b>	0,206*	0,26 (0,03-2,02)	0,668*	0,42 (0,05-3,67)
	<b>AA</b>	1,000*	NP	1,000*	NP
Nosioci	<b>G</b>	1,000*	NP	1,000*	NP
	<b>A</b>	0,200*	0,24 (0,03-1,89)	0,668*	0,42 (0,04-3,67)

OR odnos šansi, IP interval poverenja, \*Fišerov test tačne verovatnoće, <sup>§</sup>Sabrane kontrole iz ove disertacije sa prethodno objavljenim podacima za populaciju Srbije [80]. NP nije primenjivo

Da bi se utvrdilo da li postoje razlike između frekvencija G i A alela rs1800629 polimorfizma gena za TNF između uzoraka dobijenih od zdravih osoba (kontrolna grupa) iz Srbije i zdravih osoba sa drugih geografskih područja, izvršena je raspodela alela u populaciji zdravih osoba iz Srbije i upoređena je sa podacima za druge populacione grupe. Ovi rezultati su prikazani u tabeli 20.

**Tabela 20.** rs1800629 polimorfizam gena za TNF kod zdravih osoba u različitim populacijama

Referenca	Populacija	Broj	Metod	G alel (%)	A alel (%)	p
[ST]	Srbija	227	TaqMan	85,5	14,5	NP
[80]	Srbija	259	TaqMan	87,6	12,4	0,3453
[81]	Srbija	123	PCR/RFLP	87,8	12,2	0,4220
[82]	Japan	87	PCR	97,1	2,9	<b>0,0001</b>
[83]	Nemačka	345	PCR/RFLP	83,9	16,1	<b>0,0155</b>
[84]	Poljska	74	PCR/SSP	87,8	12,2	0,6891
[16]	Slovačka	140	PCR/SSP	86,8	13,2	1,0000
[85]	Hrvatska	144	PCR/RFLP	83,3	16,7	0,1593
[86]	Egipat	98	PCR/SSP	47,4	52,6	<b>0,0001</b>
[87]	Indija	208	ARMS-PCR	92,8	7,2	<b>0,0009</b>
[17]	Poljska	87	PCR/RFLP	86,8	13,2	1,0000
[88]	Španija	55	TaqMan	88,0	12,0	0,4665
[11]	Egipat	203	ARMS-PCR	76,6	23,4	<b>0,0001</b>
[89]	Indija	39	PCR/RFLP	92,3	7,7	0,1502
[90]	Brazil	300	TaqMan	89,0	11,0	0,2367
[91]	Austrija	204	TaqMan	86,5	13,5	1,0000

NP, nije primenjivo; [ST], ova disertacija

U tabeli 20 prikazano je da se frekvencije G i A alela rs1800629 polimorfizma gena za TNF u zdravoj populaciji Srbije nisu značajno statistički razlikovale u odnosu na populaciju Nemačke, Poljske, Slovačke, Hrvatske, Španije, Indije, Brazila i Austrije. Visoko statistički značajna razlika u frekvenciji G i A alela rs1800629 ustanovljena je između zdrave populacije Srbije i zdravih populacija Japana, Egipta i Indije.

#### 4.5. Ispitivanje polimorfizma gena za TNF (*rs361525*) kod kontrola i pacijenata sa pemfigusom

Komercijalni oligonukleotidi i TaqMan PCR metoda korišćeni su i za ispitivanje *rs361525* u 5' promotorskom regionu gena za TNF. Rezultati distribucije alela i genotipova prikazani su u tabeli 21.

Pored toga, u tabeli 21, prikazana je i distribucija nosioca G i A alela kod ispitanika, pri čemu su nosioci G osobe sa GG i GA genotipovima, a nosioci A su osobe sa GA i AA genotipovima. Pacijenti sa pemfigusom u tabeli 21 su prikazani kao jedna grupa (ukupni pemfigus) i podjeljeni u dve podgrupe (PF i PV) u odnosu kliničku formu pemfigusa.

**Tabela 21.** Aleli i genotipovi *rs361525* polimorfizma kod zdravih kontrola i pacijenata

<i>TNF rs361525</i>		Kontrole		Pemfigus					
		n	f	Ukupno		PV		PF	
		n	f	n	f	n	f	n	f
Aleli	<b>G</b>	941	0,968	119	0,975	93	0,969	26	1,000
	<b>A</b>	31	0,032	3	0,025	3	0,031	0	0,000
Genotipovi	<b>GG</b>	455	0,936	58	0,951	45	0,938	13	1,000
	<b>GA</b>	31	0,064	3	0,049	3	0,063	0	0,000
	<b>AA</b>	0	0,000	0	0,000	0	0,000	0	0,000
Nosioci	<b>G</b>	484	1,000	61	1,000	48	1,000	13	1,000
	<b>A</b>	31	0,064	3	0,049	3	0,063	0	0,000

Da bi se testiralo da li distribucija genotipova odgovara distribuciji alela koji su određeni za ispitanike u ovom istraživanju izračunato je da li se dobijeni rezultati učestalosti genotipova nalaze u Hardy-Weinberg ravnoteži (Tabela 22).

**Tabela 22.** Testiranje odstupanja distribucije genotipova od Hardy-Weinberg ravnoteže *rs361525*

<i>TNF rs361525</i>	Kontrole	Pemfigus	Ukupno	
Genotipovi	<b>GG</b>	455	58	513
	<b>GA</b>	31	3	34
	<b>AA</b>	0	0	0
Ukupno		486	61	547
HWE*		$X^2= 0,53$	$X^2= 0,04$	$X^2= 0,56$

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

Dobijeni rezultati pokazuju da je distribucija genotipova rs361525 polimorfizma gena za TNF bila u Hardy-Weinberg ravnoteži,  $p > 0,05$ .

Da bi se utvrdilo da li postoje razlike između frekvencija G i A alela rs361525 polimorfizma gena za TNF između uzoraka dobijenih od zdravih osoba (kontrolna grupa) iz Srbije i zdravih osoba sa drugih geografskih područja, izvršena je raspodela alela u populaciji zdravih osoba iz Srbije i upoređena je sa podacima za druge populacione grupe. Ovi rezultati su prikazani u tabeli 23.

**Tabela 23.** Statistička analiza distribucija alela, genotipova, nosioca alela rs361525 polimorfizma gena za TNF između ukupnih pacijenata sa pemfigusom i kontrola kao i pacijenata obolelih od pemfigus vulgarisa i kontrola

<i>TNF</i> rs361525		Pemfigus/Kontrole		PV/ Kontrole	
		p	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)
Aleli	<b>G</b>	1,000	1,31 (0,39-3,80)	0,100	1,02 (0,31-3,40)
	<b>A</b>	1,000	0,76 (0,23-2,57)	0,100	0,98 (0,29-3,26)
Genotipovi	<b>GG</b>	0,786	1,32 (0,39-4,44)	1,000*	1,02 (0,30-3,47)
	<b>GA</b>	0,786	0,76 (0,22-2,56)	1,000*	0,98 (0,29-3,33)
	<b>AA</b>	1,000*	NP	1,000*	NP
Nosioći	<b>G</b>	1,000*	NP	1,000*	NP
	<b>A</b>	0,786*	0,76 (0,22-2,56)	1,000*	0,98 (0,29-3,33)

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

Kao što je prikazano u tabeli 23, frekvencija G i A alela rs361525 polimorfizma u kontrolnoj, zdravoj, populaciji Srbije nije se značajno statistički razlikovala u odnosu na frekvencije G i A alela u zdravim populacijama Tajlanda, Brazila, Irana, Poljske, Kine, Meksika, Nemačke, Austrije i Hrvatske.

U tabeli 24. prikazani su rezultati poređenja distribucije alela i genotipova rs361525 polimorfizma kod svih pacijenata obolelih od pemfigusa i zdravih kontrola kao i kod podgrupa pacijenata obolelih od pemfigus vulgarisa i zdravih kontrola. Statistička analiza je pokazala da ne postoji statistički značajna razlika u distribuciji alela i genotipova između pacijenata obolelih od pemfigusa i zdravih kontrola kao ni između podgrupa obolelih od pemfigus vulgarisa i pemfigus foliaceusa i zdravih kontrola.



**Tabela 24.** Statistička analiza distribucija alela, genotipova, nosioca alela rs361525 polimorfizma gena za TNF između pacijenata sa pemfigus foliaceusom i kontrola kao i pacijenata obolelih od pemfigus foliaceusa i pemfigus vulgarisa

<i>TNF</i> rs361525		PF/Kontrole		PF/PV	
		<b>p</b>	<b>OR (95% IP)</b>	<b>p</b>	<b>OR (95% CI)</b>
Aleli	<b>G</b>	0,627*	NP	0,598*	NP
	<b>A</b>	0,627*	NP	0,598*	NP
Genotipovi	<b>GG</b>	0,620*	NP	0,592*	NP
	<b>GA</b>	0,620*	NP	0,592*	NP
	<b>AA</b>	1,000*	NP	1,000*	NP
Nosioci	<b>G</b>	1,000*	NP	1,000*	NP
	<b>A</b>	0,620*	NP	0,592*	NP

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

Međutim, na osnovu odnosa šansi (OR) u okviru intervala poverenja od 95% (95% IP) rezultati ukazuju da bi G alel potencijalno predstavljao faktor rizika za oboljevanje od pemfigusa jer vrednost OR iznosi 1.31 (95% IP 0,39-3,80). Na osnovu podataka iz tabele 9, G alel bi predstavljao i povećan rizik za oboljevanje od pemfigus vulgarisa s obzirom da vrednost odnosa šansi iznosi 1,02 (95% IP 0,31-3,40). Kao što je prikazano prisustvo GG genotipa uvećava OR vrednosti na 1.32 (95% IP 0,39-4,44) kod ukupno obolelih od pemfigusa u poređenju sa zdravom, kontrolnom populacijom kao i OR 1,02 (0,31-3,40) kada se uporede podgrupa obolelih od pemfigus vulgarisa i zdrava, kontrolna grupa. Prikazani podaci ukazuju da bi A alel mogao da ima protektivnu ulogu, odnosno da nosioci A alela imaju manji rizik za nastanak pemfigusa OR 0,76 (95% IP 0,22-2,56) i pemfigus vulgarisa OR 0,98 (95% IP 0,29-3,33).

U tabeli 25, prikazani su rezultati poređenja distribucije alela i genotipova rs361525 polimorfizma kod pacijenata obolelih od pemfigus foliaceusa i zdravih kontrola kao i kod podgrupa pacijenata obolelih od pemfigus foliaceusa i pemfigus vulgarisa. Statistička analiza je pokazala da ne postoji statistički značajna razlika u distribuciji alela i genotipova između podgrupe pacijenata obolelih od pemfigus foliaceusa i zdravih kontrola kao ni između podgrupa obolelih od pemfigus foliaceusa i pemfigus vulgarisa.

**Tabela 25.** rs361525 polimorfizam gena za TNF kod zdravih osoba u različitim populacijama

Referenca	Populacija	Broj	Metod	G alel (%)	A alel (%)	p
[ST]	Srbija	486	TaqMan	96,8	3,2	NP
[92]	Tajland	130	PCR	98,1	2,7	0,6629
[93]	Brazil	96	TaqMan	94,8	5,2	0,1658
[94]	Iran	95	PCR/RFLP	88,9	10,1	0,0547
[17]	Poljska	87	PCR/RFLP	97,7	2,3	0,5271
[95]	Kina	806	PCR/RFLP	96,6	4,3	0,1625
[96]	Maroko	90	PCR	93,8	6,2	0,0547
[97]	Nemačka	303	MassARRAY	94,7	5,3	0,0648
[91]	Austrija	204	TaqMan	96,3	3,7	0,6467
[85]	Hrvatska	144	PCR/RFLP	96,5	3,5	0,8065

NP, nije primenjivo; [ST], ova disertacija

#### 4.6. Ispitivanje polimorfizma gena za IL-10 (*rs1800896*) kod kontrola i pacijenata sa pemfigusom

Ispitivanje *rs1800896* polimorfizma u genu za IL-10 (-1082 G/A) vršeno je TaqMan PCR metodom pomoću komercijalnih oligonukleotida. Rezultati distribucije alela i genotipova prikazani su u tabeli 26.

Pored toga, u tabeli 26. prikazana je i distribucija nosioca G i A alela kod ispitanika, pri čemu su nosioci G osobe sa GG i GA genotipovima, a nosioci A su osobe sa GA i AA genotipovima. Pacijenti sa pemfigusom u tabeli 26 su prikazani kao jedna grupa (ukupni pemfigus) i podeljeni u dve podgrupe (PF i PV) u odnosu kliničku formu pemfigusa. Kontrole su prikazane zbirno kao rezultati ovog istraživanja sabrani sa prethodno objavljenim rezultatima za populaciju Srbije koji su dobijeni korišćenjem iste metodologije [98].

**Tabela 26.** Aleli i genotipovi *rs1800896* polimorfizma kod zdravih kontrola i pacijenata

<i>IL10</i> <i>rs1800896</i>		Kontrole <sup>§</sup>		Pemfigus					
		n	f	Ukupno		PV		PF	
		n	f	n	f	n	f	n	f
Aleli	<b>G</b>	409	0,421	46	0,377	34	0,354	12	0,462
	<b>A</b>	563	0,579	76	0,623	62	0,646	14	0,538
Genotipovi	<b>GG</b>	91	0,187	8	0,131	6	0,125	2	0,154
	<b>GA</b>	227	0,467	30	0,492	22	0,458	8	0,615
	<b>AA</b>	168	0,346	23	0,377	20	0,417	3	0,231
Nosioći	<b>G</b>	318	0,654	38	0,623	28	0,583	10	0,476
	<b>A</b>	395	0,813	53	0,869	42	0,875	11	0,846

<sup>§</sup>Sabrane kontrole iz ove disertacije sa prethodno objavljenim podacima za populaciju Srbije [98]

U cilju testiranja da li distribucija genotipova odgovara distribuciji alela koji su određeni za ispitanike u ovom istraživanju izračunato je da li se dobijeni rezultati učestalosti genotipova nalaze u Hardy-Weinberg ravnoteži (Tabela 27).

**Tabela 27.** Testiranje odstupanja distribucije genotipova od Hardy-Wenberga ravnoteže rs1800896

<i>IL10 rs1800896</i>	<b>Kontrole</b>	<b>Kontrole<sup>§</sup></b>	<b>Pemfigus</b>	<b>Ukupno</b>	
Genotipovi	<b>GG</b>	47	91	39	99
	<b>GA</b>	109	227	61	257
	<b>AA</b>	80	168	30	191
Ukupno		236	486	61	547
HWE*		$X^2= 0,79$	$X^2= 0,85$	$X^2=0,13$	$X^2= 0,59$

\*Hardy-Weinberg ekvilibrijum, nivo značajnosti;  $p>0,05$ . <sup>§</sup>Sabrane kontrole iz ove disertacije sa prethodno objavljenim podacima za populaciju Srbije [98]

Dobijeni rezultati pokazuju da je distribucija genotipova rs1800896 polimorfizma gena za IL10 bila u Hardy-Weinberg ravnoteži,  $p>0,05$ .

U tabeli 28, prikazani su rezultati poređenja distribucije alela i genotipova rs1800629 polimorfizma kod svih pacijenata obolelih od pemfigusa i zdravih kao i kod podgrupa pacijenata obolelih od PV i zdravih kontrola. Statistička analiza je pokazala da ne postoji statistički značajna razlika u distribuciji alela i genotipova između pacijenata obolelih od pemfigusa i kontrola kao ni između podgrupa obolelih od PV i PF i zdravih osoba. Međutim, na osnovu odnosa šansi (OR) u okviru intervala poverenja od 95% (95% IP) rezultati ukazuju da bi A alel potencijalno predstavljao faktor rizika za oboljevanje od pemfigusa, kada se poredi ukupna grupa obolelih od pemfigusa sa kontrolnom grupom jer vrednost OR iznosi 1,20 (95% IP 0,81-1,77). Takođe, kao što je prikazano u tabeli 28, A alel bi mogao da bude povezan sa povećanim rizikom od razvoja pemfigus vulgarisa u poređenju sa zdravim kontrolama (OR 1,32; IP 0,85-2,05).

**Tabela 28.** Statistička analiza distribucija alela, genotipova, nosioca alela 1800896 polimorfizma gena za IL-10 između pacijenata sa pemfigusom i kontrola kao i pacijenata obolelih od PV i kontrola

<i>IL10 rs1800896</i>		<b>Pemfigus/Kontrole<sup>§</sup></b>		<b>PV/ Kontrole</b>	
		<b>p</b>	<b>OR (95% CI)</b>	<b>p</b>	<b>OR (95% CI)</b>
Aleli	<b>G</b>	0,356	0,83 (0,56-1,22)	0,205	0,75 (0,48-1,17)
	<b>A</b>	0,356	1,20 (0,81-1,77)	0,205	1,32 (0,85-2,05)
Genotipovi	<b>GG</b>	0,284	0,65 (0,30-1,43)	0,286	0,62 (0,26-1,50)
	<b>GA</b>	0,718	1,10 (0,64-1,89)	0,920	0,97 (0,53-1,75)
	<b>AA</b>	0,631	1,14 (0,66-1,99)	0,325	1,35 (0,74-2,47)
Nosioći	<b>G</b>	0,631*	0,87 (0,50-1,51)	0,325	0,74 (0,40-1,35)
	<b>A</b>	0,283	1,53 (0,70-3,32)	0,285	1,61 (0,66-3,91)

<sup>§</sup>Sabrane kontrole iz ove disertacije sa prethodno objavljenim podacima za populaciju Srbije [98]; OR odnos šansi, IP interval poverenja, \*Fišerov test tačne verovatnoće, NP nije primenjivo

U tabeli 29, prikazani su rezultati poređenja distribucije alela i genotipova 1800896 polimorfizma kod pacijenata obolelih od PF i zdravih osoba- kontrola kao i kod podgrupa pacijenata obolelih od PF i PV. Statistička analiza je pokazala da ne postoji statistički značajna razlika u distribuciji alela i genotipova između podgrupe pacijenata obolelih od PF i zdravih kontrola kao ni između podgrupa obolelih od PF i PV.

**Tabela 29.** Statistička analiza distribucija alela, genotipova, nosioca alela 1800896 polimorfizma gena za IL-10 između pacijenata sa PF i kontrola kao i pacijenata obolelih od PF i PV

<i>IL10 rs1800896</i>		<b>PF/Kontrole<sup>§</sup></b>		<b>PF/PV</b>	
		<b>p</b>	<b>OR (95% IP)</b>	<b>p</b>	<b>OR (95% CI)</b>
Aleli	<b>G</b>	0,680	1,18 (0,54-2,58)	0,312	1,56 (0,65-3,76)
	<b>A</b>	0,680	0,85 (0,39-1,85)	0,312	0,64 (0,26-1,54)
Genotipovi	<b>GG</b>	1,000*	0,79 (0,17-3,62)	1,000*	1,27 (0,22-7,19)
	<b>GA</b>	0,289	1,83 (0,59-5,66)	0,315	1,89 (0,54-6,62)
	<b>AA</b>	0,399*	0,52 (0,14-1,87)	0,168*	0,38 (0,09-1,55)
Nosioći	<b>G</b>	0,557*	1,76 (0,48-6,48)	0,335*	2,38 (0,58-9,77)
	<b>A</b>	1,000*	1,27 (0,28-5,82)	1,000*	0,78 (0,14-4,44)

<sup>§</sup>Sabrane kontrole iz ove disertacije sa prethodno objavljenim podacima za populaciju Srbije [98]; OR odnos šansi, IP interval poverenja, \*Fišerov test tačne verovatnoće, NP nije primenjivo

Kako bi se utvrdilo da li postoje razlike između frekvencija G i A alela 1800896 polimorfizma gena za IL-10 između uzoraka dobijenih od zdravih osoba (kontrolna grupa) iz Srbije i zdravih osoba sa drugih geografskih područja, izvršena je raspodela alela u populaciji zdravih osoba iz Srbije i upoređena je sa podacima za druge populacione grupe. Ovi rezultati su prikazani u tabeli 30,

**Tabela 30,** 1800896 polimorfizam gena za IL-10 kod zdravih osoba u različitim populacijama

Referenca	Populacija	Broj	Metod	G alel (%)	A alel (%)	p
[ST]	Srbija	236	TaqMan	43,0	57,0	NP
[98]	Srbija	250	TaqMan	41,2	58,8	0,6031
[99]	Kina	677	MassARRAY	17,4	82,6	<b>0,0001</b>
[16]	Slovačka	140	PCR/SSP	43,2	56,8	0,7401
[18]	Argentina	24	ARMS-PCR	43,8	56,2	0,8230
[100]	Meksiko	47	PCR/RFLP	72,3	27,7	<b>0,0001</b>
[101]	Turska	112	PCR/RFLP	36,6	63,4	0,1336
[102]	Italija	349	PCR	40,9	59,1	0,6547
[103]	Tunis	748	PCR/ASA	64,1	35,9	<b>0,0001</b>
[104]	Indija	202	PCR	16,6	83,4	<b>0,0001</b>
[105]	Grčka	39	PCR/SSP	34,6	65,4	0,1976

NP, nije primenjivo; [ST], Ova disertacija

Kao što je prikazano u tabeli 30, ustanovljena je visoko statistički značajna razlika u frekvenciji G i A alela između zdrave populacije Srbije i populacija Kine, Meksika, Tunisa, Indije i Nemačke. Nije ustanovljena statistički značajna razlika u frekvenciji G i A alela između zdrave populacije Srbije i populacija Egipta, Turske, Italije, Tajvana i Grčke.

#### 4.7. Ispitivanje polimorfizma gena za IL-10 (rs1800871) kod kontrola i pacijenata sa pemfigusom

Ispitivanje rs1800871 polimorfizma u genu za IL-10 (-819 C/T) vršeno je TaqMan PCR metodom pomoću komercijalnih oligonukleotida. Rezultati distribucije alela i genotipova prikazani su u tabeli 31.

Pored toga, u tabeli 31 prikazana je i distribucija nosioca C i T alela kod ispitanika, pri čemu su nosioci C osobe sa CC i CT genotipovima, a nosioci T su osobe sa CT i TT genotipovima. Pacijenti sa pemfigusom u tabeli 31 su prikazani kao jedna grupa (ukupni pemfigus) i podjeljeni u dve podgrupe (PF i PV) u odnosu na kliničku sliku pemfigusa. Kontrole su prikazane zbirno kao rezultati ovog istraživanja sabrani sa prethodno objavljenim rezultatima za populaciju Srbije koji su dobijeni korišćenjem iste metodologije [98].

**Tabela 31.** Aleli i genotipovi rs1800871 polimorfizma kod zdravih kontrola i pacijenata

<i>IL10</i> rs1800871		Kontrole <sup>§</sup>		Pemfigus					
		n	f	Ukupno		PV		PF	
		n	f	n	f	n	f	n	f
Aleli	C	722	0,743	92	0,754	70	0,729	22	0,846
	T	250	0,257	30	0,246	26	0,271	4	0,154
Genotipovi	CC	270	0,556	37	0,607	28	0,583	9	0,692
	CT	182	0,374	18	0,295	14	0,292	4	0,308
	TT	34	0,070	6	0,098	6	0,125	0	0,000
Nosioci	C	452	0,930	55	0,902	42	0,875	13	1,000
	T	216	0,444	24	0,393	20	0,417	4	0,308

<sup>§</sup>Sabrane kontrole iz ove disertacije sa prethodno objavljenim podacima za populaciju Srbije [98]

U cilju testiranja da li distribucija genotipova odgovara distribuciji alela koji su određeni za ispitanike u ovom istraživanju izračunato je da li se dobijeni rezultati učestalosti genotipova nalaze u Hardy-Weinberg ravnoteži (Tabela 32.).

**Tabela 32.** Testiranje odstupanja distribucije genotipova od Hardy-Weinberg ravnoteže rs1800871

<i>IL10</i> rs1800871	Kontrole	Kontrole <sup>§</sup>	Pemfigus	Ukupno	
Genotipovi	<b>CC</b>	133	270	37	307
	<b>CT</b>	86	182	18	200
	<b>TT</b>	17	34	6	40
Ukupno	236	486	61	547	
HWE*	$X^2= 0,33$	$X^2= 0,19$	$X^2= 2,55$	$X^2= 0,87$	

\*Hardy-Weinberg ekvilibrijum, nivo značajnosti;  $p>0,05$ ; <sup>§</sup>Sabrane kontrole iz ove disertacije sa prethodno objavljenim podacima za populaciju Srbije [98]

U tabeli 33, prikazani su rezultati poređenja distribucije alela i genotipova rs1800871 polimorfizma kod svih pacijenata obolelih od pemfigusa i zdravih osoba kao i kod podgrupa pacijenata obolelih od PV i zdravih kontrola. Statistička analiza je pokazala da ne postoji statistički značajna razlika u distribuciji alela i genotipova između pacijenata obolelih od pemfigusa i zdravih kontrola kao ni između podgrupe obolelih od PV i zdravih kontrola. Međutim, na osnovu odnosa šansi (OR) u okviru intervala poverenja od 95% (95% IP) rezultati ukazuju da bi C alel mogao da bude povezan sa povećanim rizikom za razvoj pemfigusa a T alel za razvoj PV.

**Tabela 33.** Statistička analiza distribucija alela, genotipova, nosioca alela rs1800871 polimorfizma gena za IL-10 između pacijenata sa pemfigusom i kontrola kao i pacijenata obolelih od PV i kontrola

<i>IL10</i> rs1800871		Pemfigus/Kontrole <sup>§</sup>		PV/ Kontrole <sup>§</sup>	
		p	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)
Aleli	<b>C</b>	0,791	1,06 (0,69-1,64)	0,777	0,93 (0,58-1,49)
	<b>T</b>	0,791	0,94 (0,61-1,46)	0,777	1,07 (0,67-1,72)
Genotipovi	<b>CC</b>	0,450	1,23 (0,72-2,13)	0,708	1,12 (0,61-2,04)
	<b>CT</b>	0,225	0,69 (0,39-1,25)	0,256	0,69 (0,36-1,32)
	<b>TT</b>	0,431*	1,45 (0,58-3,61)	0,243*	1,89 (0,75-4,78)
Nosioći	<b>C</b>	0,431*	0,68 (0,27-1,72)	0,243*	0,53 (0,21-1,33)
	<b>T</b>	0,450	0,81 (0,47-1,40)	0,708	0,89 (0,49-1,63)

<sup>§</sup>Sabrane kontrole iz ove disertacije sa prethodno objavljenim podacima za populaciju Srbije [98]; OR odnos šansi, IP interval poverenja, <sup>†</sup>Fišerov test tačne verovatnoće, NP nije primenjivo

U tabeli 34, prikazani su rezultati poređenja distribucije alela i genotipova rs1800871 polimorfizma kod svih pacijenata obolelih od PF i zdravih kontrola kao i kod podgrupa pacijenata obolelih od PF i PV. Statistička analiza je pokazala da ne postoji statistički



značajna razlika u distribuciji alela i genotipova između pacijenata obolelih od PF i zdravih kontrola kao ni između podgrupa obolelih od PV i PF. Ipak, na osnovu odnosa šansi (OR) u okviru intervala poverenja od 95% (95% IP) rezultati ukazuju da bi C alel mogao da bude povezan sa povećanim rizikom za razvoj PF.

**Tabela 34.** Statistička analiza distribucija alela, genotipova, nosioca alela rs1800871 polimorfizma gena za IL-10 između pacijenata sa PF i kontrola kao i pacijenata obolelih od PF i PV

<i>IL10 rs1800871</i>		PF/Kontrole <sup>§</sup>		PF/PV	
		p	OR (95% IP)	p	OR (95% CI)
Aleli	C	0,232	1,90 (0,65-5,40)	0,219	2,04 (0,64-6,49)
	T	0,232	0,53 (0,18-1,54)	0,219	0,49 (1,15-1,56)
Genotipovi	CC	0,327	1,80 (0,55-5,92)	0,475	1,61 (0,43-5,96)
	CT	0,775	0,74 (0,23-2,44)	1,000*	1,08 (0,28-4,09)
	TT	0,614*	NP	0,326*	NP
Nosioći	C	0,614*	NP	0,326*	NP
	T	0,327	0,55 (0,17-1,83)	0,475*	0,62 (0,17-2,31)

<sup>§</sup>Sabrane kontrole iz ove disertacije sa prethodno objavljenim podacima za populaciju Srbije [98]; OR odnos šansi, IP interval poverenja, <sup>†</sup>Fišerov test tačne verovatnoće, NP nije primenjivo

Kako bi se utvrdilo da li postoje razlike između frekvencija C i T alela 1800871 polimorfizma gena za IL-10 između uzoraka dobijenih od zdravih osoba (kontrolna grupa) iz Srbije i zdravih osoba sa drugih geografskih područja, izvršena je raspodela alela u populaciji zdravih osoba iz Srbije i upoređena je sa podacima za druge populacione grupe. Ovi rezultati su prikazani u tabeli 35.

**Tabela 35.** rs1800871 polimorfizam gena za IL-10 kod zdravih osoba u različitim populacijama

Referenca	Populacija	Broj	Metod	G alel (%)	A alel (%)	p
[ST]	Srbija	236	TaqMan	74,6	25,4	NP
[98]	Srbija	250	TaqMan	74,0	26,0	0,8833
[99]	Kina	677	MassARRAY	68,4	31,6	<b>0,0001</b>
[18]	Argentina	24	ARMS-PCR	72,9	27,1	0,8414
[16]	Slovačka	140	PCR/SSP	73,2	26,8	0,7184
[103]	Tunis	748	PCR/ASA	80,5	19,5	<b>0,0003</b>
[10]	Indija	241	TaqMan	49,8	50,2	<b>0,0001</b>
[106]	Meksiko	248	PCR	58,3	41,7	<b>0,0001</b>
[107]	Danska	779	TaqMan	78,6	21,4	<b>0,0477</b>
[105]	Grčka	39	PCR/SSP	71,8	28,2	0,6315

NP, nije primenjivo; [ST], Ova disertacija

Rezultati prikazani u tabeli 35 pokazuju da je ustanovljena je visoko statistički značajna razlika u frekvenciji C i T alela između zdrave populacije Srbije i populacija Kine, Tunisa, Indije i Meksika. Statistički značajna razlika ustanovljena je između ispitivane zdrave populacije Srbije i Danske dok nije ustanovljena razlika u frekvenciji C i T alela između zdrave populacije Srbije i zdrave populacije Grčke.

## **5. DISKUSIJA**

Pemfigus predstavlja potencijalno životno ugrožavajuće autoimunske bulozne oboljenja kože i sluznica. Stvaranje autoantitela na dezmostoleine i druge molekule dovodi do akantolize i formiranja intraepidermalnog rascjepa. Zavisno od izotipa i specifičnosti antitela zavisi i klinička slika bolesti. Ukoliko su autoantitela usmerena prema dezmostoleinu-1 ili dezmostoleinu-3 dolazi do razvoja pemfigus foliaceus (autoantitela usmerena prema dezmostoleinu 1) ili pemfigus vulgaris (autoantitela usmerena prema dezmostoleinu 3). Autoreaktivna antitela nastaju kroz interakcije B i T-ćelija i taj proces je kontinuirano pod kontrolom T-ćelija [108]. Za aktivaciju autoreaktivnih T-ćelija u pemfigusu neophodno je prepoznavanje dezmostoleinskih peptida i angažovanje CD28 molekula, koji je najznačajniji kostimulatorni receptor u aktivaciji naivnih T ćelija. CD28 molekul se vezuje za B7 familiju molekula kao što su CD80 i CD86 [109]. Pored toga, B7 molekul mogu da aktiviraju inhibicioni receptor na T-ćelijama, CTLA-4, koji kontroliše mehanizam održavanja tolerancije na sopstvene peptide [109].

Na značaj genetskih faktora u patogenezi pemfigusa ukazuju prethodna istraživanja [110] kojima su definisani određeni genetski faktori. Među njima se ističu različiti HLA aleli klase I i II. Do sada je otkriven veći broj HLA alela koji su udruženi sa osetljivošću za nastanak pemfigusa. Polimorfizmi alela HLA molekula klase I razlikuju se između pacijenata sa PV i zdravih kontrola. HLA-A polimorfizmi udruženi su sa rizikom od razvoja PV u jevrejskoj i kineskoj populaciji [35, 111-114]. Varijacije unutar HLA-A, HLA-B i HLA-C ustanovljene su kod pacijenata sa pemfigusom i pokazuju populacionu specifičnost [40, 115, 116]. Ustanovljeno je da preko 95% pacijenata sa PV ima jedan od dve tipa HLA alela klase II HLADRB1\*0402 ili DQB1\*0503, udruženo sa HLA DR4 ili HLA DR6 haplotipovima [41, 117-120].

Prema tome, značaj gena unutar HLA lokusa je više puta potvrđen. Međutim, ponekad bliski rođaci obolelih uprkos tome što su nosioci rizičnih alela ili čak haplotipova ne obolevaju od pemfigusa. Ova činjenica ukazuje da pored poznatih genetskih faktora rizika postoje još neki koji do sada nisu identifikovani. To bi mogli da budu pojedini polimorfizmi izvan HLA lokusa, u genima koji kodiraju molekule koji su uključeni u imunski odgovor ili pak geni koji kodiraju autoantigene od značaja za razvoj pemfigusa [16, 40, 63, 108, 113, 121-126]. Imajući u vidu autoimunske fenomene uključene u patogenezu pemfigusa, kao logični kandidati se izdvajaju geni čiji produkti učestvuju u započinjanju i održavanju imunskog odgovora.

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitana je učestalost polimorfizama pojedinačnih nukleotida u genima za molekule: CD86 rs1129055, CTLA-4 rs733618 i rs5742909, TNF rs1800629 i rs361525 i IL-10 rs1800896 i rs1800871 u populaciji zdravih ljudi u Srbiji i grupi pacijenata obolelih od pemfigusa odnosno pemfigus vulgarisa i pemfigus foliaceusa. Za sada nema dovoljno podataka o polimorfizmima prethodno navedenih gena iako je jasno da su njihovi produkti jasno uključeni u imunska zbivanja pa prema tome potencijalno mogu biti i od značaja za patogenezu pemfigusa.

Do sada u Srbiji nisu vršena genetska istraživanja kod pacijenata sa pemfigusom izuzev u okviru gena HLA II klase. Imajući u vidu tendenciju individualizovanog pristupa u terapiji pemfigusa, od značaja je da se definišu genetske specifičnosti naše populacije pacijenata obolelih od pemfigusa kao i da se uporede sa nalazom u kontrolnoj, zdravoj populaciji. Identifikacija distribucije alela u navedenim genima molekula odgovornih za pokretanje i održavanje imunskog odgovora je sprovedena sa ciljem da se utvrdi njihova potencijalna vrednost kao biomarkera podložnosti za nastanak pemfigusa.

S obzirom da je distribucija alela ispitivanih gena u populaciji Srbije nepoznata, ispitana je učestalost alela ovih gena i u populaciji zdravih osoba, dobrovoljnih davalaca krvi. Konačno, u cilju definisanja specifičnosti naše populacije utvrđene su i razlike u distribuciji alela ovih gena između ispitivanih populacija u Srbiji i njihove distribucije u drugim populacijama.

Dosadašnjim istraživanjima ustanovljeno je da polimorfizmi gena za CTLA-4 i CD86 povećavaju rizik od razvoja autoimunosti u nekim populacijama [70, 78, 127-129], kao i da produkcija citokina od značaja za pokretanje i održavanje autoimunskog odgovora u pemfigusu barem delom može da bude regulisana polimorfizmima gena koji ih kodiraju [13, 16, 62]. Molekuli CD86 [109], CTLA-4 [109], TNF [17] i IL-10 [16, 18] prema tome, potencijalno imaju značajnu ulogu u patogenezi pemfigusa. Pod pretpostavkom da polimorfizmi pojedinačnih nukleotida u genima navedenih molekula, i to rs1129055 u genu za CD86, rs733618 i rs5742909 u genu za CTLA-4, rs1800629 i rs361525 u genu za TNF i rs1800896 i rs1800871 u genu za IL-10 mogu da menjaju funkciju gena moguće je da menjaju i rizik od razvoja bolesti kao i da eventualno utiču na terapijski odgovor. Radi boljeg uvida u uticaje navedenih polimorfizama na nastanak pemfigusa, pacijenti su razdvojeni u dve grupe (PV i PF) na osnovu kliničke slike, nalaza DIF testa kao i

histopatološkog nalaza. Dobijene frekvencije ispitivanih alela i genotipova poređeni su između pacijenata i kontrola kao grupa pacijenata (PV i PF) sa kontrolama i međusobno.

Svi pacijenti uključeni u ovo istraživanje nalazili su se na bolničkom lečenju u Klinici za dermatovenerologiju Kliničkog centra Srbije tokom 2011 i 2013. godine. Od ukupno 61 pacijenta sa dijagnostikovanim pemfigusom, kod 48 pacijenta (78,7%) dijagnostikovan je pemfigus vulgaris dok je kod 13 pacijenata (21,3%) dijagnostikovan pemfigus foliaceus, koji je znatno ređi u Evropi [19].

Ova doktorska disertacija predstavlja prvo istraživanje kojim je određena frekvencija alela u genu za CD86 molekul na poziciji +1057 u zdravoj populaciji Srbije i kod pacijenata obolelih od pemfigus vulgarisa i pemfigus foliaceusa. Prvi put, u okviru istraživanja rađenih za ovu doktorsku disertaciju ustanovljeno je da osobe koje su nosioci barem jednog A alela na poziciji +1057 u *CD86* imaju veći rizik od oboljevanja od pemfigusa i pemfigus vulgarisa. Ustanovljeno je *CD86* rs1129055 A alel statistički značajno češći kod pacijenata sa pemfigusom ( $P=0,40$ ) i pacijenata sa PV ( $p=0,040$ ) u odnosu na zdrave kontrole. Ustanovljeno je takođe, na osnovu vrednosti odnosa šansi da su nosioci *CD86* rs1129055 A alela pod značajno većim rizikom da razviju pemfigus ( $OR=1.85$ ,  $95\% CI=1.07-3.17$ ) i pemfigus vulgaris ( $OR=2.14$ ,  $95\% CI=1.16-3.94$ ).

Udruženost ovog polimorfizama sa sklonošću ka razvoju autoimunskih buloznih bolesti veoma malo je ispitivana do sada. Udruženost *CD86* rs1129055 sa sklonošću ka razvoju pemfigus foliaceusa pokazana je u jednoj studiji [19]. Dalla-Costa R i saradnici ustanovili su značajno nižu frekvenciju *CD86* rs1129055 A alela među pacijentima sa endemskom formom PF (fogo selvagem) u poređenju sa kontrolama [76]. U našem istraživanju za ovu disertaciju unutar grupe pacijenata sa pemfigus foliaceusom takva razlika nije ustanovljena. Ovakvi rezultati ne treba da iznenade jer endemski PF ima određene specifičnosti u odnosu na PF u Evropi. Neke od značajnih razlika su i da se endemska forma PF pojavljuje samo u određenim delovima južne Amerike što može da ukazuje na genetske karakteristike populacije ali i da pacijenti oboleli od endemske forme pemfigusa obično razvijaju antitela na antigene koji se nalaze u pljuvački insekata koji ukršteno reaguju sa Dsg epitopima [24]. Prema tome, s obzirom na genetsku udaljenost i razlike faktora spoljašnje sredine, teško je direktno poređenje naše studije i studije sprovedene u Brazilu.

Do sada je ustanovljeno da je polimorfizam rs1129055 A alel gena za CD86 samostalno ili kao deo haplotipa sa drugim polimorfizmima povezan sa većim rizikom od razvoja infekcije [69], i karcinoma pankreasa [71] u nekim populacijama. Kada je ovaj polimorfizam analiziran kod pacijenata sa autoimunskim bolestima, *CD86* rs1129055 A alel nije statistički značajno češći kod pacijenata sa reumatoidnim artritisom [70] ili među bolesnicima sa hroničnom imunskom trombocitopenijom [68] u odnosu na zdravu, kontrolnu populaciju.

Gen za CD86 molekul nalazi se na 3q21. Nije jasno kakva je veza između rs1129055 polimorfizma i nastanka pemfigusa. CD86 je važan u aktivaciji naivnih T ćelija [109], a poznato je i potencijalno značajno da ligacija ovog molekula, makar pomoću monoklonskih antitela, može da omogući signale za sintezu IgG4 od strane humanih B ćelija [56]. Zanimljivo je IgG4 često prisutan u serumu pacijenata sa autoimunskim buloznim bolestima kao i da ima sposobnost da dovodi do nastanka intraepidermalnih bula nezavisno od aktivacije komplementa [57]. Dalje, ako se ima na umu da *CD86* +1057 G→A (rs1129055) tranzicija dovodi do A304T supstitucije i uvođenja još jednog mogućeg mesta fosforilacije unutar citoplazmatskog dela CD86, što potencijalno menja intracelularnu signalizaciju kroz ovaj molekul, moguće je spekulirati da A alel može da utiče na patogenezu pemfigusa. Međutim u dostupnoj literaturi nema direktnih dokaza koji potvrđuju ili odbacuju ovu hipotezu.

Poređenjem naših rezultata sa rezultatima malobrojnih studija u svetu koje su određivale rs1129055 polimorfizam u zdravoj populaciji ustanovljena je visoko statistički značajna razlika u frekvenciji G i A alela između zdrave populacije Srbije i populacija Kine [68, 70] i Irana [69] za koje postoje objavljeni podaci.

Gen za CTLA-4 molekul nalazi se na dugom kraku hromozoma 2 na poziciji 33 (2q33). CTLA-4 molekul eksprimiran je na aktivisanim CD4+ i CD8+ T ćelijama, posreduje u kasnoj fazi aktivacije T ćelija i samim tim učestvuje u održavanju periferne T-ćelijske tolerancije. Do sada je pokazano da su polimorfizmi u genima za CTLA-4 (rs733618, rs5742909), povezani sa većom sklonošću ka infekciji [69, 130-132], autoimunosti [78, 127, 129] i razvoju karcinoma [76, 133] u nekim populacijama, samostalno ili kao deo haplotipa sa drugim polimorfizmima.

U ovoj disertaciji analiziran je i polimorfizam rs733618 u genu za CTLA4. Dosadašnjim istraživanjima u svetu ustanovljeno je da CTLA4 C varijanta na poziciji -1722 (rs733618)

može da vezuje transkripcioni faktor NF-1, i da na taj način dovede do više ekspresije solubilne forme CTLA-4 [58]. Solubilni CTLA-4 vezuje se za CD80/CD86 molekule i može da inhibira proliferaciju T ćelija [58] i na taj način dovede do poremećaja funkcionisanja imunskog sistema. Tako na primer nosioci *CTLA4* (rs733618) G alela su bili manje skloni filarijazi [131] dok je A alel bio češći kod pacijenata sa urinarnom šistozomijazom nego kod kontrola [132]. C alel rs733618 je predstavljao faktor rizika za nastanak Grejvsove bolesti među pacijentima na Tajvanu.

U našem istraživanju nismo ustanovili povezanost rs733618 sa povećanim rizikom od razvoja pemfigus foliaceusa ili pemfigus vulgarisa. Udruženost CTLA4 rs733618 sa rizikom od razvoja pemfigus foliaceusa pokazana je u jednoj studiji [19], Dalla-Costa R i saradnici ustanovili su da su nosioci C alela za rs733618 C alel imali veću sklonost ka razvoju endemskog pemfigus foliaceusa kod brazilskih pacijenata afričkog porekla. Međutim u istoj studiji nije ustanovljena udruženost rs733618 alela i genotipove sa sklonosti ka oboljevanju kod brazilskih pacijenata evropskog porekla.

Wang XB i saradnici ustanovili su i češću frekvencu nosioca C alela među Švedskim pacijentima sa mijastenijom gravis u odnosu na zdrave kontrole [58]. U Španiji je sprovedena studija kojom je obuhvaćeno 417 pacijenata sa endogenim ne-anteriornim uveitisom i 1517 zdravih kontrola i nije ustanovljena udruženost rs733618 sa razvojem ne-anteriornog uveitisa [72]. Suprotno tome, rezultati meta analize koju su sproveli Liu J i sar, kojom je obuhvaćeno 1016 obolelih od sistemskog eritemskog lupusa i 1078 kontrola ustanovljeno je da je C alel rs733618 povezan sa smanjenim rizikom od razvoja sistemskog eritemskog lupusa kod pacijenata iz Azije [128].

Kada smo uporedili frekvencije rs733618 u genu za CTLA-4 molekul dobijene na zdravoj populaciji Srbije, sa rezultatima dobijenim u drugim populacijama ustanovljena je visoko statistički značajna razlika u frekvenciji C i T alela između zdrave populacije Srbije i populacija Španije [72] i Kine [134, 135], dok nije ustanovljena statistički značajna razlika u frekvenciji C i T alela između zdrave populacije Srbije i zdrave populacije Nemačke [75].

Podaci iz literature ukazuju na funkcionalni značaj pojedinih bolesti. Tako npr. *CTLA4* (rs5742909) T alel je povećavao sklonost ka brucelozi kod Iranaca [69] a C alel povećavao sklonost ka perzistenciji HBV infekcije među pacijentima kineskog porekla na Tajvanu [130] i sklonost ka reumatoidnom artritisu među pacijentima u zapadnom



Meksiku [129]. C alel kao deo kombinovanog *CTLA4-CD28* haplotipa *CTLA4* 49A>G[A]/319C>T[C]/CT60[A]/Jo31[T]/CD2817+3T>C[T]/CD281042G>A[G] je povećavao incidenciju primarne nekroze u tumorima svetlih ćelija bubrega [76] dok je prisustvo T alela bilo češće u tumorima pluća koji nisu poreklom od malih ćelija u kohorti pacijenata u Poljskoj [133].

Rezultati našeg istraživanja ukazuju da su nosioci rs5742909 T alela, koji omogućava veću ekspresiju CTLA-4, ređi, odnosno manje zastupljeni među pacijentima sa pemfigus vulgarisom u odnosu na zdravu, kontrolnu populaciju (OR=0.47, 95% CI=0.19-1.18), međutim ustanovljena razlika nije statistički značajna. Pored toga, među pacijentima sa pemfigus foliaceusom rs5742909 nosioci T alela su značajno češći nego kod pacijenata sa pemfigus vulgarisom. Ove rezultate treba prihvatiti sa rezervom s obzirom na mali broj pacijenata sa pemfigus foliaceusom u našem istraživanju.

Udruženost polimorfizma rs5742909, koji je ispitivan i u ovoj disertaciji, sa sklonošću ka razvoju autoimunskih buloznih bolesti veoma malo je ispitivana do sada. U dve studije je ispitivana povezanost CTLA4 rs5742909 sa podložnošću endemskom pemfigus foliaceusom [19, 136]. Pavoni DP i sar. na uzorku od 118 pacijenata nisu pokazali udruženost alela ili genotipova ovog polimorfizma sa sklonošću ka endemskom PF [136], dok su Dalla Costa R i sar. pokazali da je T alel ovog polimorfizma udružen sa sklonošću ka endemskom pemfigusu na većoj grupi od 269 pacijenata [19]. Očigledno je međutim da je uticaj ovog alela relativno skroman je statističke značajnosti nije bilo kada su pacijenti podeljeni na one koji su evropskog porekla (149) i afričkog porekla (108) [19].

U studiji urađenoj na Han populaciji u Kini, ispitivan je uticaj CTLA4 rs5742909 -318 C/T na rizik od razvoja autoimunskih bolesti štitaste žlezde (Grejvsova bolest i Hašimoto tiroiditis). Studijom je obuhvaćeno 289 odraslih pacijenata obolelih od Grejsove bolesti, 265 pedijatrijskih pacijenata obolelih od Grejsove bolesti, 229 pedijatrijskih pacijenata obolelih od Hašimoto tiroiditisa i 1058 zdravih kontrola. Nije ustanovljena povezanost nijednog alela ili haplotipa rs5742909 sa povećanim rizikom od razvoja autoimunskih bolesti štitaste žlezde u Han populaciji [137]. Međutim, rezultati meta analize kojom je obuhvaćeno 7 studija sprovedenih u Kini, kojim je ukupno obuhvaćeno 999 obolelih od Grejsove bolesti i 702 zdrave kontrole ukazuju da su nosioci T alela -318C/T pod manjim rizikom da obole od Grejsove bolesti u odnosu na CC homozigote [138].

Rezultati druge mete analize koju su sprovedeli Liu i saradnici ukazuju da nijedan alel ili haplotip rs5742909 nije udružen sa povećanim rizikom od razvoja sistemskog eritemskog lupusa. Studijom je obuhvaćeno 1163 obolelih od sistemskog eritemskog lupusa i 1520 zdravih kontrola [128]. Takođe, u Španiji nije ustanovljena udruženost rs5742909 sa razvojem ne-anteriornog uveitisa [72].

Dalje, studijom koja je sprovedena u Indiji na 100 pacijentkinja sa cervikalnim karcinomom i 101 zdravoj kontroli ustanovljeno je da nijedan alel ili haplotip rs5742909 nije udružen sa povećanim rizikom od razvoja cervikalnog karcinoma [139]. Ovaj rezultat potvrđuje i rezultat naknadno sprovedene meta analize kojom su obuhvaćene četiri studije koje su analizirale rs5742909 i rizik od razvoja karcinoma uterusa i koji ukazuje da varijante rs5742909 nisu udružene sa povećanim rizikom od razvoja karcinoma uterusa [140].

CTLA-4 kao inhibitor aktivacije T ćelija može da ima ulogu u patogenezi autoimunskih buloznih bolesti. Ustanovljeno je da je kod rs5742909 nosioca T alela ekspresija CTLA-4 veća na CD8<sup>+</sup>, ali ne i na CD4<sup>+</sup> T ćelijama [141]. Dakle aleli rs5742909 mogu da utiču na kooperaciju CD4<sup>+</sup> T i B ćelija koja je neophodna za formiranje anti-dezmogleinskih autoantitela. Iako je uloga antiDsg antitela najbolje opisana u patogenezi pemfigusa među produktima imunskog odgovora, novija istraživanja ukazuju na potencijalni značaj CD8<sup>+</sup> limfocita u patogenezi pemfigusa. Tako npr. studija Giurdanella F i sar. ukazuje na značaj CD8<sup>+</sup> posredovanog odgovora koji dovodi do ćelijski posredovanog oštećenja keratinocita, najverovatnije preko Fas-FasL interakcije [142]. Shodno tome T alel je bio ređi kod pacijenata sa pemfigusom i to naročito sa PV nego kod zdravih ali razlika nije dostigla nivo statističke značajnosti. Ukoliko se frekvencija T alela rs5742909 poredi među pacijentima sa težom kliničkom formom bolesti (PV) sa onima koji imaju lakšu formu (PF), statistički je znatno više T alela kod pacijenata sa PF što dalje potvrđuje protektivan ali skroman efekat ovog alela u patogenezi pemfigusa.

Poređenjem rezultata frekvencije alela *CTLA4* rs5742909 -318 C/T dobijenih u našem istraživanju i u istraživanjima u drugim zdravim populacijama ustanovljena je visoko statistički značajna razlika u frekvenciji C i T alela između zdrave populacije Srbije i populacije Kine [70], statistički značajna razlika u frekvenciji C i T alela između zdrave populacije Srbije i populacija Kine [77] i SAD [79], dok nije ustanovljena statistički značajna razlika između populacija Srbije, Irana [69], Poljske [76], Španije [72] i Estonije

[78]. Kada su u pitanju različiti nivoi statističke značajnosti između frekvencije C i T alela u našoj zdravoj populaciji i rezultati dve studije sprovedene u Kini, moguće je da se radi o posledici razlike u metodološkom pristupu, a takođe moguće je i da su dobijeni rezultati posledica razlike u veličini ispitivanog uzorka. Liu i saradnici sprovedli su ispitivanje na 303 [70], dok su Deng i saradnici sprovedli istraživanje na 150 zdravih ispitanika [77]. Od značaja bi moglo da bude i to što su Liu i saradnici istraživanje sprovedli u jugoistočnoj Kini, pretežno nastanjenoj Han populacijom, dok su Deng i saradnici istraživanje sprovedli u zapadnom regionu Sečuana.

Gen za TNF lociran je u HLA regionu na hromozomu 6p21.3 [143]. Na značaj TNF u patogenezi pemfigusa ukazuju rezultati različitih istraživanja. Pokazano je da interakcija između antigen specifičnih T i B-ćelija dovodi do formiranja anti-dezmoglein 1 i anti-dezmoglein 3 antitela [144]. Produkcija TNF može da bude regulisana na transkripcionom, posttranskripcionom i translacionom nivou. Promene u promotorskom regionu gena za TNF mogu da utiču na sekreciju TNF. Zamena guanina adeninom na poziciji -308 (rs1800629) dovodi do povećane ekspresije TNF [16]. Polimorfizam -238G/A (rs361525) u promotoru gena za TNF takođe može da utiče na produkciju TNF, naročito u miljeu bogatom antiinflamatornim citokinima, pri čemu je i u ovom slučaju A alel odgovoran za višu produkciju [83]. Rezultati nekoliko istraživanja ukazuju da je značajno viša koncentracija TNF u serumu kod pacijenata sa pemfigus vulgarisom u odnosu na zdrave kontrole [145-147]. D'Auria i saradnici pokazali su značajnu korelaciju između serumskog nivoa TNF i aktivnosti bolesti kod pacijenata sa pemfigus vulgarisom [148]. Posle ovih istraživanja ustanovljeno je i da je koncentracija TNF blago povišena kod pacijenata sa PV u remisiji u odnosu na zdrave kontrole [149], međutim nije ustanovljena statistička značajnost u navedenom istraživanju između pacijenata i kontrolne grupe. Dalje, Alecu sa saradnicima ustanovio je povišen nivo TNF u sadržaju bula, a Lopez-Robles sa saradnicima povišen nivo TNF u biopstatima leziona kože obolelih od pemfigus vulgarisa [146, 147]. Rezultati *in vivo* studija ukazuju da IgG antitela odgovorna za nastanak PV indukuju nastanak TNF iRNK u koži [17]. U istraživanju koje su sprovedli Ameglio F i sar. ustanovljena je korelacija između koncentracije TNF i titra autoantitela specifičnih antigene intercelularnih spojeva [150]. Pored toga ustanovljena je statistički značajna korelaciju između serumskog nivoa TNF i aktivnosti bolesti kod pacijenata sa pemfigus vulgarisom [148]. TNF može da dovede do povećanog stvaranja C3 komponente komplementa od strane keratinocita kao i da utiče na

aktivaciju plazminogena što doprinosi procesu akantolize [151-154]. Ovakav nalaz ukazuje na mogući uticaj TNF u održavanju patofizioloških mehanizama od značaja za pemfigus i objašnjava uspeh terapije anti-TNF antitelima kod refraktornih formi oboljenja [63]. Dakle funkcionalni polimorfizam rs361525 u genu za TNF može da doprinese u održavanju patofizioloških mehanizama od značaja za pemfigus ali rezultati našeg istraživanja ne mogu potvrditi ovu hipotezu.

U okviru našeg istraživanja ispitivali smo rs1800629 i rs361525 u genu za TNF kod pacijenata obolelih od pemfigus vulgarisa i pemfigus foliaceusa kao i kod zdravih, kontrolnih osoba. Rezultati našeg istraživanja ukazuju da nije ustanovljena statistički značajna razlika u frekvenciji i distribuciji alela i genotipova rs1800629 polimorfizma gena za TNF između zdravih kontrola i ukupnih pacijenata sa pemfigusom kao ni između zdravih kontrola poređenih sa obolelima od pemfigus vulgarisa i/ili pemfigus foliaceusa.

Studije koje su ispitivale uticaj rs1800629 i rizik od razvoja pemfigusa su retke. Torzecka i saradnici [17] dokazali su statistički značajnu razliku u frekvenciji G i A alela između pacijenata sa pemfigus foliaceusom i zdravih kontrola, pri čemu je A alel koji se povezuje sa povećanom produkcijom TNF zastupljeniji kod pacijenata. Moguće je da je ovakav nalaz pokazatelj etničke specifičnosti poljske populacije sa pacijenata sa PF, razlike u metodologiji (mogućnost parcijalne digestije amplifikovanih produkata nije diskutovana u radu) i grešaka u interpretaciji dobijenih rezultata.

Rezultati nedavno objavljene meta analize [155] ukazuju da polimorfizam u genu za TNF (-308G/A) nije udružen sa sklonošću za razvoj pemfigusa. Međutim, u zaključku ove meta analize navodi se da je neophodno da se sprovede još istraživanja pre nego što se donese konačan zaključak o uticaju rs1800629 na sklonost ka razvoju pemfigusa. U studiji koja se sprovedena u Egiptu na 70 pacijenata i 203 zdravih kontrola, nije ustanovljena značajna razlika u frekvenciji alela između egipatskih pacijenata sa pemfigusom i zdravih kontrola u ispitivanom G/A polimorfizmu *rs1800629* na poziciji -308 [156]. Takođe nije ustanovljena statistički značajna razlika *rs1800629* između pacijenata sa pemfigus vulgarisom i pemfigus foliaceusom. U studiji u Argentini rađenoj na 20 pacijenata i 24 zdrave kontrole analiziran je polimorfizam na poziciji -308 u genu za TNF, i nije ustanovljena značajna razlika između pacijenata sa pemfigusom i zdravih kontrola [18]. Javor i saradnici nisu uspeali da dokažu statistički značajnu razliku u frekvenciji G i A alela između pacijenata sa pemfigus vulgarisom i zdravih kontrola [16].

Imajući na umu da je prisustvo A alela povezano sa većom produkcijom TNF dok je prisustvo G alela povezano sa nižom produkcijom TNF kao da njihovi nalazi nisu u skladu sa podatkom da je kod pacijenata sa pemfigus vulgarisom povišen serumski nivo TNF [18], kao i nivo TNF u kožnim lezijama [18]. Javor i saradnici zaključuju da je na osnovu njihovih rezultata -308 A alel u značajnoj neravnoteži sa HLA-DRB1\*0301 alelom kao i da iz toga proizilazi da sam TNF odnosno visoka produkcija TNF, koja bi mogla da se dovede u vezu sa prisustvom A alela na poziciji -308 nije u direktnoj vezi sa nastankom pemfigus vulgarisa. Pretpostavljaju da je čest nalaz G alela kod obolelih od pemfigusa pokazatelj neravnoteže sa HLA-DRB1\*0301 alelom koji je u slovačkoj populaciji ređe zastupljen kod obolelih od pemfigusa u odnosu na zdravu, kontrolnu populaciju [16].

Do sada su u većem broju istraživanja ispitane frekvencije G i A alela na poziciji -308 u okviru gena za TNF u populacijama zdravih osoba većeg broja geografski udaljenih država. Jedan od ciljeva ovog istraživanje bio je da se uporede dobijene frekvencije G i A alela *rs1800629* i *rs361525* polimorfizma gena za TNF u populaciji zdravih osoba iz Srbije sa frekvencijama ovih alela u zdravim populacijama u drugim državama za koje postoje podaci u literaturi i da se utvrdi da li postoje statistički značajne razlike između populacije zdravih osoba iz Srbije i drugih, etnički različitih populacija sa udaljenih geografskih područja. Nije ustanovljena statistički značajna razlika između populacije Srbije i populacija Nemačke [83], Poljske [84], Hrvatske [85], Slovačke [16], Španije [88], Brazila [90] i Austrije [91]. Visoko statistički značajna razlika u frekvenciji G i A alela *rs1800629* ustanovljena je između zdrave populacije Srbije i zdravih populacija Japana [82] i Egipta [156]. Međutim, poređenjem rezultata prikazanih u ovoj disertaciji sa dve studije sprovedene u Indiji [87, 89] dobijaju se različiti rezultati. Kada se naši rezultati uporede sa rezultatima koji su u Indiji sprovedeni na 208 zdravih osoba [87] dobija se visoko statistički značajna razlika u frekvenciji G i A alela. Međutim kada se rezultati ove disertacije uporede sa rezultatima koji su u drugoj studiji u Indiji sprovedeni kod 39 zdravih osoba, ne dobija se statistički značajna razlika u frekvenciji G i A alela. Ova razlika u dobijenim rezultatima mogla bi da se objasni različitim populacionim grupama koje su obrađivane u studiji u jugoistočnoj Indiji [89] i studiji sprovedenoj na severu Indije [87]. Dakle, etnička specifičnost, poput razlika u SNP mogla bi da bude razlog za razliku u rezultatima dve indijske studije, Pored toga, neophodno je uzeti u obzir i veličinu obrađivanog uzorka, kao i činjenicu da relevantnost imunogenetskih

istraživanja često određuje ili limitira veličina ispitivanog uzorka. Istraživanja sprovedena na većem broju ispitanika adekvatnije reflektuju etničke specifičnosti ispitivane populacije. Kada su naši rezultati poređeni sa rezultatima dve studije urađene u Poljskoj [17, 84] dobijeni su slični rezultati. U obe studije iz Poljske obrađivana je populacija iz centralnog dela. Visoko statistički značajna razlika u frekvenciji G i A alela rs1800629 između populacije Srbije i populacija Japana i Egipta mogle bi da ukazuju na etničke specifičnosti ispitivanog biomarkera u datim populacijama.

Rezultati tipizacije rs361525 u genu za TNF kod pacijenata obolelih od pemfigus vulgarisa i pemfigus foliaceusa kao i kod zdravih, kontrolnih osoba ukazuju da ne postoji statistički značajna razlika u distribuciji alela i genotipova za rs361525 između pacijenata obolelih od pemfigusa i zdravih kontrola kao ni između podgrupa obolelih od pemfigus vulgarisa i pemfigus foliaceusa i zdravih kontrola.

U manjem broju studija ispitivana je povezanost polimorfizma -238G/A kod pacijenata sa pemfigusom. Javor i saradnici [16] ustanovili su da kod pacijenata sa pemfigus vulgarisom postoji statistički značajno povećana frekvencija -308 G/ 238/G haplotipa u odnosu na zdravu, kontrolnu populaciju. Studijom je obuhvaćeno 34 pacijenta sa dijagnostikovanim pemfigus vulgarisom i 140 zdravih, kontrolnih osoba. Istraživanjem je bio obuhvaćen i sam rs361525 međutim nije ustanovljena povezanost ovog polimorfizma i povećanog rizika za razvoj pemfigus vulgarisa. U studiji rađenoj u Poljskoj [17] ispitivan je i polimorfizam rs361525 na poziciji -238 G/A kod 53 pacijenata sa pemfigusom i 87 kontrola. Nije ustanovljena značajna razlika u distribuciji -238 G/A alela kod obolelih od pemfigus vulgarisa ili pemfigus foliaceusa i zdravih kontrola. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima našeg istraživanja u kojem nije ustanovljena povezanost polimorfizma rs361525 i povećanog rizika za razvoj pemfigus vulgarisa i pemfigus foliaceusa.

Sličan fenomen se može uočiti i u drugim zapaljenjskim bolestima ljudi. Rezultati istraživanja sprovedenog u Nemačkoj [157] dobijeni analizom 142 pacijenta sa ulceroznim kolitisom ukazuju da TNF- $\alpha$  A alel rs361525 predstavlja značajan faktor rizika za pojavu promena u usnoj duplji kod pacijenata sa ulceroznim kolitisom, dok rezultati studije sprovedene u Španiji na 84 pacijenta sa ulceroznim kolitisom i 135 kontrola ukazuju da rs361525 nije povezan sa rizikom od razvoja inflamatorne bolesti creva [158].

Kada je u pitanju ispitivani polimorfizam u 5' promotorskom regionu gena za TNF, *rs361525* (-238G/A) frekvencija G i A alela *rs361525* u kontrolnoj, zdravoj, populaciji Srbije, koja je obrađena u ovoj disertaciji nije se značajno statistički razlikovala u odnosu na frekvencije G i A alela u zdravim populacijama Tajlanda [92], Brazila [93], Irana [94], Poljske [84], Kine [95], Maroka [96], Nemačke [97], [91] i Hrvatske [85]. Ispitivanja su sprovedena na različitom broju zdravih osoba u studijama. Ovi rezultati mogli bi da ukazuju na to da za TNF -238G/A ne postoje razlike u populacijama sa različitim i udaljenih geografskih područja.

Gen za interleukin-10 nalazi se na 1q32.1. IL-10 je imunomodulatorni citokin koji može da ima korisnu ali i štetnu ulogu u inflamaciji, infekciji i autoimunosti [159].

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitivani su polimorfizmi u promotoru gena za IL-10, i to -1082 G/A (*rs1800896*), i na poziciji i -819 C/T (*rs1800871*) kod pacijenata obolelih od pemfigus vulgarisa i pemfigus foliaceusa kao i kod zdravih kontrolnih osoba.

Rezultati ove disertacije ukazuju ne postoji statistički značajna razlika u distribuciji alela i genotipova *rs1800896* polimorfizma između pacijenata obolelih od pemfigusa i zdravih kontrola kao ni između podgrupa obolelih od pemfigus vulgarisa i pemfigus foliaceusa i zdravih kontrola.

Pregledom literature utvrđeno je da postoje tri publikacije u kojima su objavljeni rezultati genotipizacije ovog polimorfizma kod pacijenata obolelih od pemfigusa. Pereira NF i sar. ispitivali su udruženost -1082 (A/G) (*rs1800896*) u genu za IL-10 kod 168 pacijenata sa endemskom formom pemfigus foliaceusa i 189 zdravih kontrolnih osoba koje su naknadno podeljene u podgrupe belaca i pacijenata mulatskog porekla. AA genotip *rs1800896* je bio češći kod obolelih mulata nego kod zdravih ali se nakon korekcije statistička značajnost izgubila [160]. Kod pacijenata evropskog porekla takve razlike nisu ustanovljene u odnosu na zdrave osobe evropskog porekla koje su činile kontrolnu grupu [160]. Slično tome, Eberhard Y i sar. nisu pokazali značajne razlike u distribuciji alela i genotipova *rs1800896* između pacijenata evropskog porekla u Argentini [18] na skromnom uzorku od 20 pacijenata i 24 kontrole. Javor J i sar. su pokazali da je G alel udružen sa višom produkcijom IL-10 ovog polimorfizma ređi kod pacijenata sa pemfigusom nego kod kontrola ali razlika nije bila statistički značajna [16]. Ipak A alel *rs1800896* kao deo haplotipa ACC (zajedno sa polimorfizmima *rs1800871* i

rs1800872) odgovoran za nižu produkciju IL-10 je bio značajno češći među pacijentima nego među kontrolama [16].

Polimorfizam rs1800896 (-1082 A > G) može da remeti transkripciju i sekreciju IL-10. Protektivni efekti IL-10 podrazumevaju inhibiciju produkcije proinflamatornih citokina kao što su IL-1, TNF, IL-12 od strane T-ćelija i antigen prezentujućih ćelija [161-163], inhibiciju produkcije hemokina, nishodnu regulaciju ekspresije MHC molekula II klase i kostimulatornih molekula kao što je npr. CD86. Na taj način IL-10 inhibira prezentaciju antigena, slabi CD4<sup>+</sup> T ćelijski odgovor i indukuje razvoj tolerancije [164-167]. Međutim, pokazano je da IL-10, makar *in vitro* indukuje posebno nastanak IgG4 antitela [168] koja imaju patogenu ulogu u pemfigusu. Pored toga IL-10 može da podstiče preživljavanje B ćelija i održavanje njihove sposobnosti da produkuju antitela kao i da sprečava apoptozu [169-171]. Pošto je ustanovljeno je da je produkcija citokina barem delom regulisana polimorfizmima unutar gena koji kodiraju citokine [13, 16, 62], jasno je da IL-10 može da utiče na patogenezu pemfigusa na sistemskom i lokalnom nivou. Na sistemskom nivou može da spreči nastanak auto reaktivnog odgovora ali i da obezbedi trajanje već uspostavljene produkcije autoantitela, dok na lokalnom nivou može da deluje supresivno na procese inflamacije i akantolize, odnosno da sprečava dalje oštećenje kože [63].

U skladu sa postavljenim ciljevima disertacije ustanovili smo frekvencije G i A alela za rs1800896 (-1082 G/A) u našoj zdravoj, kontrolnoj populaciji i uporedili naše rezultate sa rezultatima dobijenim u drugim regionima. Na osnovu poređenja dobijenih frekvencija A i G alela u zdravoj populaciji Srbije i drugih publikovanih podataka iz različitih delova sveta ustanovljena je visoko statistički značajna razlika u frekvenciji G i A alela između zdrave populacije Srbije i populacija Kine [99], Meksika [100], Indije [104] i Tunisa [103], nije ustanovljena statistički značajna razlika u frekvenciji G i A alela između zdrave populacije Srbije i populacija, Slovačke [16], Grčke [105], Italije [102], Turske [101] i Argentine [18].

Naše istraživanje obuhvatilo je i polimorfizam na poziciji i -819 C/T (rs 1800871) u promotoru gena za IL-10 kod pacijenata obolelih od PV i PF kao i kod zdravih kontrolnih osoba. Statističkom analizom rezultata prikazanih u ovoj disertaciji pokazano je da ne postoji statistički značajna razlika u distribuciji C i T alela za rs1800871 kao ni CC, CT i TT genotipova između pacijenata obolelih od pemfigusa i zdravih kontrola kao



ni između podgrupa obolelih od pemfigus vulgarisa i pemfigus foliaceusa i zdravih kontrola.

Udruženost polimorfizma -819 T/C rs1800871 sa rizikom od razvoja oboljenja iz grupe pemfigusa ispitivana je u malom broju studija. Javor i saradnici u studiji sprovedenoj na 34 pacijenta obolela od pemfigus vulgarisa i 140 kontrola ustanovili da aleli i genotipovi polimorfizma -819 C/T nisu udruženi sa povećanim rizikom od razvoja pemfigusa ali je C alel kao deo pomenutog ACC haplotipa *IL10* češći kod pacijenata nego kod zdravih kontrola [16]. Suprotno tome, Eberhard Y i sar. ustanovili su da je C alel rs1800871 značajno udružen sa razvojem pemfigusa, posebno pemfigus vulgarisa [18]. Pored toga ustanovljena je veća frekvencija haplotipa 1082/819 A/T, koji je povezan sa nižom produkcijom IL-10, kod pacijenata sa pemfigusom i u podgrupi pacijenata sa pemfigus vulgarisom u odnosu na zdravu, kontrolnu populaciju. Nije ustanovljena statistički značajna razlika kada je podgrupa obolelih od pemfigus foliaceusa poređena sa zdravom populacijom, međutim treba uzeti u obzir da su u ispitivanje bila uključena samo tri pacijenta obolela od pemfigus foliaceusa [102]. Naši rezultati u skladu su sa rezultatima koji su dobili Javor J i sar. [16], i razlikuju se od rezultata koje su dobili autori studije rađene u Argentini. Ova činjenica je očekivana s obzirom na manju etničku distancu između populacija Srbije i Slovačke kao i većeg broja pacijenata i kontrola koje su bile uključene u slovačku studiju.

U okviru našeg istraživanja poredili smo i nalaz - 819 C > T rs1800871 polimorfizma kod naših pacijenata obolelih od pemfigusa i zdravih, kontrolnih osoba. Poređenjem naših rezultata sa rezultatima drugih istraživanja, rađenih na različitim geografskim područjima u svetu ustanovljena je visoko statistički značajna razlika u frekvenciji C i T alela između zdrave populacije Srbije i populacija Kine [99], Tajvana [172], Meksika [106], Indije [10], Tunisa [103], i marginalno od populacije Danske [107] dok nije ustanovljena statistički značajna razlika u frekvenciji C i T alela između zdrave populacije Srbije i zdrave populacije Slovačke [16], Grčke [105] i Argentine [18].

## **6. Zaključci**

Udruženost između pojedinih varijanti gena koji kodiraju molekule bitne za nastanak, održavanje autoimunskog odgovora, inflamacije i sklonosti ka nastanku pemfigusa pokazana je u brojnim studijama, u populacijama različitog etničkog porekla. U ovoj disertaciji je po prvi put ustanovljena udruženost polimorfizma rs1129055 u genu za molekul CD86 sa povećanim rizikom od razvoja pemfigusa. Pored toga, po prvi put smo sprovedli ispitivanje ovog tipa kog pacijenata obolelih od PV i PF i na osnovu dobijenih rezultata doneli smo sledeće zaključke:

1. Frekvencija A alela u okviru rs1129055 polimorfizma gena za CD86 je značajno viša među obolelima od pemfigusa i to pemfigus vulgarisa nego među zdravim osobama. Saglasno tome, GG genotip je protektivan.
2. Nosioca T alela rs5742909 polimorfizma u genu za CTLA4 je značajno više u grupi pacijenata sa pemfigus foliaceusom u odnosu na grupu sa pemfigus vulgarisom.
3. Učestalosti alela i genotipova rs733618 u genu za CTLA4, rs1800629 i rs361525 u genu za TNF, i rs1800896 i rs1800871 u genu za IL10 se ne razlikuju između pacijenata obolelih od pemfigusa i zdravih osoba, kao ni između pacijenata sa različitim formama pemfigusa.
4. Jasno su prikazana poređenja frekvencija alela ispitivanih gena između populacija zdravih osoba iz Srbije i populacija zdravih osoba iz drugih zemalja.

## **7. Literatura**

1. Tsuruta D, Ishii N, Hashimoto T, 2012. **Diagnosis and treatment of pemphigus.** *Immunotherapy* 4, 735-745. [[PubMed](#)]
2. King DF, Holubar K, 1983. **History of pemphigus.** *Clin Dermatol* 1, 6-12. [[PubMed](#)]
3. Michailidou EZ, Belazi MA, Markopoulos AK, Tsatsos MI, Mourellou ON, Antoniadis DZ, 2007. **Epidemiologic survey of pemphigus vulgaris with oral manifestations in northern Greece: retrospective study of 129 patients.** *Int J Dermatol* 46, 356-361. [[PubMed](#)]
4. Meyer N, Misery L, 2010. **Geoepidemiologic considerations of auto-immune pemphigus.** *Autoimmun Rev* 9, A379-382. [[PubMed](#)]
5. Bernard P, Vaillant L, Labeille B, Bedane C, Arbeille B, Denoeux JP, Lorette G, Bonnetblanc JM, Prost C, 1995. **Incidence and distribution of subepidermal autoimmune bullous skin diseases in three French regions. Bullous Diseases French Study Group.** *Arch Dermatol* 131, 48-52. [[PubMed](#)]
6. Warren SJ, Lin MS, Giudice GJ, Hoffmann RG, Hans-Filho G, Aoki V, Rivitti EA, Santos V, Diaz LA, 2000. **The prevalence of antibodies against desmoglein 1 in endemic pemphigus foliaceus in Brazil. Cooperative Group on Fogo Selvagem Research.** *N Engl J Med* 343, 23-30. [[PubMed](#)]
7. Lever WF, 1979. **Pemphigus and pemphigoid. A review of the advances made since 1964.** *J Am Acad Dermatol* 1, 2-31. [[PubMed](#)]
8. Oranje AP, van Joost T, 1989. **Pemphigoid in children.** *Pediatr Dermatol* 6, 267-274. [[PubMed](#)]
9. Golusin Z, Poljacki M, Jovanovic M, Ethuran V, Stojanovic S, Rajic N, 2005. **Some epidemiological features of pemphigus chronicus in South Vojvodina: a 12-year retrospective study.** *Int J Dermatol* 44, 792-793. [[PubMed](#)]
10. Sathyan S, Koshy LV, Srinivas L, Easwer HV, Premkumar S, Nair S, Bhattacharya RN, Alapatt JP, Banerjee M, 2015. **Pathogenesis of intracranial aneurysm is mediated by proinflammatory cytokine TNFA and IFNG and through stochastic regulation of IL10 and TGFB1 by comorbid factors.** *J Neuroinflammation* 12, 135. [[PubMed](#)]
11. Mosaad YM, Fathy H, Fawzy Z, El-Saied MA, 2012. **Tumor necrosis factor-alpha -308 G>A and interleukin-6 -174 G>C promoter polymorphisms and pemphigus.** *Hum Immunol* 73, 560-565. [[PubMed](#)]
12. Podojil JR, Miller SD, 2009. **Molecular mechanisms of T-cell receptor and costimulatory molecule ligation/blockade in autoimmune disease therapy.** *Immunol Rev* 229, 337-355. [[PubMed](#)]
13. Wing K, Yamaguchi T, Sakaguchi S, 2011. **Cell-autonomous and -non-autonomous roles of CTLA-4 in immune regulation.** *Trends Immunol* 32, 428-433. [[PubMed](#)]
14. Satyam A, Khandpur S, Sharma VK, Sharma A, 2009. **Involvement of T(H)1/T(H)2 cytokines in the pathogenesis of autoimmune skin disease-Pemphigus vulgaris.** *Immunol Invest* 38, 498-509. [[PubMed](#)]
15. Ragab N, Abdallah M, El-Gohary E, Elewa R, 2011. **Stress and serum TNF-alpha levels may predict disease outcome in patients with pemphigus: a preliminary study.** *Cutis* 87, 189-194. [[PubMed](#)]
16. Javor J, Chmurova N, Parnicka Z, Ferencik S, Grosse-Wilde H, Buc M, Svecova D, 2010. **TNF-alpha and IL-10 gene polymorphisms show a weak association with pemphigus vulgaris in the Slovak population.** *J Eur Acad Dermatol Venereol* 24, 65-68. [[PubMed](#)]

17. Torzecka JD, Narbutt J, Sysa-Jedrzejowska A, Borowiec M, Ptasinska A, Woszczek G, Kowalski ML, 2003. **Tumour necrosis factor-alpha polymorphism as one of the complex inherited factors in pemphigus.** *Mediators Inflamm* 12, 303-307. [[PubMed](#)]
18. Eberhard Y, Burgos E, Gagliardi J, Vullo CM, Borosky A, Pesoa S, Serra HM, 2005. **Cytokine polymorphisms in patients with pemphigus.** *Arch Dermatol Res* 296, 309-313. [[PubMed](#)]
19. Dalla-Costa R, Pincerati MR, Beltrame MH, Malheiros D, Petzl-Erler ML, 2010. **Polymorphisms in the 2q33 and 3q21 chromosome regions including T-cell coreceptor and ligand genes may influence susceptibility to pemphigus foliaceus.** *Hum Immunol* 71, 809-817. [[PubMed](#)]
20. Sarig O, Bercovici S, Zoller L, Goldberg I, Indelman M, Nahum S, Israeli S, Sagiv N, Martinez de Morentin H, Katz O *et al*, 2012. **Population-specific association between a polymorphic variant in ST18, encoding a pro-apoptotic molecule, and pemphigus vulgaris.** *J Invest Dermatol* 132, 1798-1805. [[PubMed](#)]
21. Engineer L, Norton LA, Ahmed AR, 2000. **Nail involvement in pemphigus vulgaris.** *J Am Acad Dermatol* 43, 529-535. [[PubMed](#)]
22. Ahmed AR, Sami N, 2002. **Uncommon manifestations of pemphigus vulgaris.** *J Eur Acad Dermatol Venereol* 16, 313-315. [[PubMed](#)]
23. Ruocco V, Ruocco E, Lo Schiavo A, Brunetti G, Guerrera LP, Wolf R, 2013. **Pemphigus: etiology, pathogenesis, and inducing or triggering factors: facts and controversies.** *Clin Dermatol* 31, 374-381. [[PubMed](#)]
24. Qian Y, Jeong JS, Ye J, Dang B, Abdeladhim M, Aoki V, Hans-Filho G, Rivitti EA, Valenzuela JG, Diaz LA, 2016. **Overlapping IgG4 Responses to Self- and Environmental Antigens in Endemic Pemphigus Foliaceus.** *J Immunol* 196, 2041-2050. [[PubMed](#)]
25. Brenner S, Bialy-Golan A, Ruocco V, 1998. **Drug-induced pemphigus.** *Clin Dermatol* 16, 393-397. [[PubMed](#)]
26. Hertzberg MS, Schifter M, Sullivan J, Stapleton K, 2000. **Paraneoplastic pemphigus in two patients with B-cell non-Hodgkin's lymphoma: significant responses to cyclophosphamide and prednisolone.** *Am J Hematol* 63, 105-106. [[PubMed](#)]
27. Medenica L, Skiljevic D, 2009. **[Diagnostic significance of immunofluorescent tests in dermatology].** *Med Pregl* 62, 539-546. [[PubMed](#)]
28. Tanasilovic S, Medenica L, Popadic S, 2014. **Direct immunofluorescence of the outer root sheath in anagen and telogen hair in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus.** *Australas J Dermatol* 55, e74-76. [[PubMed](#)]
29. 1975. **Utilization of immunofluorescence in the diagnosis of bullous diseases, lupus erythematosus and certain other dermatoses.** *Int J Dermatol* 14, 83-100. [[PubMed](#)]
30. Roggenbuck D, Hiemann R, Bogdanos D, Reinhold D, Conrad K, 2013. **Standardization of automated interpretation of immunofluorescence tests.** *Clin Chim Acta* 421, 168-169. [[PubMed](#)]
31. Jablonska S, Chorzelski TP, Beutner EH, Michel B, Cormane R, Holubar K, Bean SF, Blaczzyk M, Ploem J, Saikia NA, 1976. **[Use of immunopathological studies in dermatology. Immunofluorescence in the diagnosis of bullous diseases, lupus erythematosus and some other diseases].** *Przegl Dermatol* 63, 267-286. [[PubMed](#)]
32. Eming R, Sticherling M, Hofmann SC, Hunzelmann N, Kern JS, Kramer H, Pfeiffer C, Schuster V, Zillikens D, Goebeler M *et al*, 2015. **S2k guidelines for the treatment of pemphigus vulgaris/foliaceus and bullous pemphigoid.** *J Dtsch Dermatol Ges* 13, 833-844. [[PubMed](#)]

33. Ahmed AR, Nguyen T, Kaveri S, Spigelman ZS, 2016. **First line treatment of pemphigus vulgaris with a novel protocol in patients with contraindications to systemic corticosteroids and immunosuppressive agents: Preliminary retrospective study with a seven year follow-up.** *Int Immunopharmacol* 34, 25-31. [[PubMed](#)]
34. Nast A, Rosumeck S, Erdmann R, Dressler C, Werner RN, 2016. **[Current guidelines in dermatology : A selection of clinically relevant recommendations].** *Hautarzt* 67, 391-396. [[PubMed](#)]
35. Yan L, Wang JM, Zeng K, 2012. **Association between HLA-DRB1 polymorphisms and pemphigus vulgaris: a meta-analysis.** *Br J Dermatol* 167, 768-777. [[PubMed](#)]
36. Augusto DG, Lobo-Alves SC, Melo MF, Pereira NF, Petzl-Erler ML, 2012. **Activating KIR and HLA Bw4 ligands are associated to decreased susceptibility to pemphigus foliaceus, an autoimmune blistering skin disease.** *PLoS One* 7, e39991. [[PubMed](#)]
37. Mashiah J, Brenner S, 2005. **Medical pearl: First step in managing pemphigus--addressing the etiology.** *J Am Acad Dermatol* 53, 706-707. [[PubMed](#)]
38. Ahmed AR, Wagner R, Khatri K, Notani G, Awdeh Z, Alper CA, Yunis EJ, 1991. **Major histocompatibility complex haplotypes and class II genes in non-Jewish patients with pemphigus vulgaris.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 5056-5060. [[PubMed](#)]
39. Niizeki H, Inoko H, Mizuki N, Inamoto N, Watababe K, Hashimoto T, Nishikawa T, 1994. **HLA-DQA1, -DQB1 and -DRB1 genotyping in Japanese pemphigus vulgaris patients by the PCR-RFLP method.** *Tissue Antigens* 44, 248-251. [[PubMed](#)]
40. Miyagawa S, Higashimine I, Iida T, Yamashina Y, Fukumoto T, Shirai T, 1997. **HLA-DRB1\*04 and DRB1\*14 alleles are associated with susceptibility to pemphigus among Japanese.** *J Invest Dermatol* 109, 615-618. [[PubMed](#)]
41. Veldman C, Stauber A, Wassmuth R, Uter W, Schuler G, Hertl M, 2003. **Dichotomy of autoreactive Th1 and Th2 cell responses to desmoglein 3 in patients with pemphigus vulgaris (PV) and healthy carriers of PV-associated HLA class II alleles.** *J Immunol* 170, 635-642. [[PubMed](#)]
42. Moraes ME, Fernandez-Vina M, Lazaro A, Diaz LA, Filho GH, Friedman H, Rivitti E, Aoki V, Stastny P, Moraes JR, 1997. **An epitope in the third hypervariable region of the DRB1 gene is involved in the susceptibility to endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) in three different Brazilian populations.** *Tissue Antigens* 49, 35-40. [[PubMed](#)]
43. Lin MS, Fu CL, Aoki V, Hans-Filho G, Rivitti EA, Moraes JR, Moraes ME, Lazaro AM, Giudice GJ, Stastny P *et al*, 2000. **Desmoglein-1-specific T lymphocytes from patients with endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem).** *J Clin Invest* 105, 207-213. [[PubMed](#)]
44. Zivanovic D, Bojic S, Medenica L, Andric Z, Popadic D, 2016. **Human leukocyte antigen class II (DRB1 and DQB1) alleles and haplotypes frequencies in patients with pemphigus vulgaris among the Serbian population.** *HLA* 87, 367-374. [[PubMed](#)]
45. Reid-Lombardo KM, Petersen GM, 2010. **Understanding genetic epidemiologic association studies Part 1: fundamentals.** *Surgery* 147, 469-474. [[PubMed](#)]
46. Li WH, Sadler LA, 1991. **Low nucleotide diversity in man.** *Genetics* 129, 513-523. [[PubMed](#)]
47. Guttmacher AE, McGuire AL, Ponder B, Stefansson K, 2010. **Personalized genomic information: preparing for the future of genetic medicine.** *Nat Rev Genet* 11, 161-165. [[PubMed](#)]
48. Chakravarti A, 2001. **To a future of genetic medicine.** *Nature* 409, 822-823. [[PubMed](#)]

49. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, Sherry S, Mullikin JC, Mortimore BJ, Willey DL *et al*, 2001. **A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms.** *Nature* 409, 928-933. [[PubMed](#)]
50. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA *et al*, 2001. **The sequence of the human genome.** *Science* 291, 1304-1351. [[PubMed](#)]
51. Collins FS, Guyer MS, Charkravarti A, 1997. **Variations on a theme: cataloging human DNA sequence variation.** *Science* 278, 1580-1581. [[PubMed](#)]
52. Risch N, 2001. **The genetic epidemiology of cancer: interpreting family and twin studies and their implications for molecular genetic approaches.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10, 733-741. [[PubMed](#)]
53. Stoneking M, 2001. **Single nucleotide polymorphisms. From the evolutionary past.** *Nature* 409, 821-822. [[PubMed](#)]
54. Brookes AJ, 1999. **The essence of SNPs.** *Gene* 234, 177-186. [[PubMed](#)]
55. Matsushita M, Tsuchiya N, Oka T, Yamane A, Tokunaga K, 2000. **New polymorphisms of human CD80 and CD86: lack of association with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus.** *Genes Immun* 1, 428-434. [[PubMed](#)]
56. Jeannin P, Delneste Y, Lecoanet-Henchoz S, Gauchat JF, Ellis J, Bonnefoy JY, 1997. **CD86 (B7-2) on human B cells. A functional role in proliferation and selective differentiation into IgE- and IgG4-producing cells.** *J Biol Chem* 272, 15613-15619. [[PubMed](#)]
57. Aalberse RC, Stapel SO, Schuurman J, Rispens T, 2009. **Immunoglobulin G4: an odd antibody.** *Clin Exp Allergy* 39, 469-477. [[PubMed](#)]
58. Wang XB, Pirskanen R, Giscombe R, Lefvert AK, 2008. **Two SNPs in the promoter region of the CTLA-4 gene affect binding of transcription factors and are associated with human myasthenia gravis.** *J Intern Med* 263, 61-69. [[PubMed](#)]
59. Schwarz MA, Hamilton LD, Tardelli L, Narula SK, Sullivan LM, 1994. **Stimulation of cytolytic activity by interleukin-10.** *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 16, 95-104. [[PubMed](#)]
60. 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](#)]
61. Wilson AG, de Vries N, Pociot F, di Giovine FS, van der Putte LB, Duff GW, 1993. **An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor alpha promoter region is strongly associated with HLA A1, B8, and DR3 alleles.** *J Exp Med* 177, 557-560. [[PubMed](#)]
62. Sigal LH, 2012. **Basic science for the clinician 55: CTLA-4.** *J Clin Rheumatol* 18, 155-158. [[PubMed](#)]
63. Giordano CN, Sinha AA, 2012. **Cytokine networks in Pemphigus vulgaris: An integrated viewpoint.** *Autoimmunity* 45, 427-439. [[PubMed](#)]
64. Eskdale J, Kube D, Tesch H, Gallagher G, 1997. **Mapping of the human IL10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence.** *Immunogenetics* 46, 120-128. [[PubMed](#)]
65. Kilpinen S, Huhtala H, Hurme M, 2002. **The combination of the interleukin-1alpha (IL-1alpha-889) genotype and the interleukin-10 (IL-10 ATA) haplotype is associated with increased interleukin-10 (IL-10) plasma levels in healthy individuals.** *Eur Cytokine Netw* 13, 66-71. [[PubMed](#)]



66. Li J, Wu S, Wang MR, Wang TT, Zhu JM, 2013. **Association of the interleukin-10 -592A/C, -1082G/A and -819T/C gene polymorphisms with type 2 diabetes: a meta-analysis.** *Gene* 521, 211-216. [[PubMed](#)]
67. Rodriguez S, Gaunt TR, Day IN, 2009. **Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies.** *Am J Epidemiol* 169, 505-514. [[PubMed](#)]
68. Wu P, Wang Z, Lu S, Zhao X, 2014. **CD86 +1057G/A polymorphism and risk of chronic immune thrombocytopenia.** *Autoimmunity* 47, 482-485. [[PubMed](#)]
69. Eskandari-Nasab E, Moghadampour M, Najibi H, Hadadi-Fishani M, 2014. **Investigation of CTLA-4 and CD86 gene polymorphisms in Iranian patients with brucellosis infection.** *Microbiol Immunol* 58, 135-141. [[PubMed](#)]
70. Liu CP, Jiang JA, Wang T, Liu XM, Gao L, Zhu RR, Shen Y, Wu M, Xu T, Zhang XG, 2013. **CTLA-4 and CD86 genetic variants and haplotypes in patients with rheumatoid arthritis in southeastern China.** *Genet Mol Res* 12, 1373-1382. [[PubMed](#)]
71. Xiang H, Zhao W, Sun Y, Qian W, Xing J, Zhou Y, Yao J, Xu J, Wang Y, Yao H *et al*, 2012. **CD86 gene variants and susceptibility to pancreatic cancer.** *J Cancer Res Clin Oncol* 138, 2061-2067. [[PubMed](#)]
72. Leon Rodriguez DA, Serrano Lopera A, Cordero-Coma M, Marquez A, Fonollosa A, Ruiz-Arruza I, Callejas JL, Garcia Serrano JL, Diaz Valle D, Pato E *et al*, 2015. **Study of association of CTLA4 gene variants to non-anterior uveitis.** *Tissue Antigens* 86, 373-376. [[PubMed](#)]
73. Sun Q, Zhang Y, Cui H, Zhu S, Li X, Huang G, Tang H, Yan D, Wang D, Xu W, 2014. **Complete genome sequence analysis of two human enterovirus C99 strains isolated in Xinjiang Uighur Autonomous Region, China, in 2011.** *Arch Virol* 159, 359-364. [[PubMed](#)]
74. Tang W, Zhang S, Qiu H, Wang L, Sun B, Yin J, Gu H, 2014. **Genetic variations in MTHFR and esophageal squamous cell carcinoma susceptibility in Chinese Han population.** *Med Oncol* 31, 915. [[PubMed](#)]
75. Thude H, Wilkens A, Anders O, Barz D, 2002. **Analysis of the thrombomodulin gene in patients with venous thrombosis.** *Thromb Res* 107, 109-114. [[PubMed](#)]
76. Tupikowski K, Partyka A, Kolodziej A, Dembowski J, Debinski P, Halon A, Zdrojowy R, Frydecka I, Karabon L, 2015. **CTLA-4 and CD28 genes' polymorphisms and renal cell carcinoma susceptibility in the Polish population--a prospective study.** *Tissue Antigens* 86, 353-361. [[PubMed](#)]
77. Deng L, Zhou H, Yang J, Xiao J, Wang B, Wang L, Ou X, Feng Y, 2013. **CTLA-4 gene polymorphisms and susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease.** *Int J Clin Exp Pathol* 6, 2548-2553. [[PubMed](#)]
78. Douroudis K, Prans E, Uibo R, 2009. **CTLA-4 promoter polymorphisms are associated with latent autoimmune diabetes in adults.** *Hum Immunol* 70, 921-924. [[PubMed](#)]
79. Martin TM, Bye L, Modi N, Stanford MR, Vaughan R, Smith JR, Wade NK, Mackensen F, Suhler EB, Rosenbaum JT *et al*, 2009. **Genotype analysis of polymorphisms in autoimmune susceptibility genes, CTLA-4 and PTPN22, in an acute anterior uveitis cohort.** *Mol Vis* 15, 208-212. [[PubMed](#)]
80. 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](#)]

81. Drulovic J, Popadic D, Mesaros S, Dujmovic I, Cvetkovic I, Miljkovic D, Stojisavljevic N, Pravica V, Pekmezovic T, Bogdanovic G *et al*, 2003. **Decreased frequency of the tumor necrosis factor alpha -308 allele in Serbian patients with multiple sclerosis.** *Eur Neurol* 50, 25-29. [[PubMed](#)]
82. Hamamoto Y, Tateno H, Ishida T, Muto M, 2000. **Lack of association between promoter polymorphism of the tumor necrosis factor-alpha gene and psoriatic arthritis in Japanese patients.** *J Invest Dermatol* 115, 1162-1164. [[PubMed](#)]
83. Reich K, Mossner R, Konig IR, Westphal G, Ziegler A, Neumann C, 2002. **Promoter polymorphisms of the genes encoding tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta are associated with different subtypes of psoriasis characterized by early and late disease onset.** *J Invest Dermatol* 118, 155-163. [[PubMed](#)]
84. Baran W, Szepietowski JC, Mazur G, Baran E, 2006. **A - 308 promoter polymorphism of tumor necrosis factor alpha gene does not associate with the susceptibility to psoriasis vulgaris. No difference either between psoriasis type I and type II patients.** *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat* 15, 113-118. [[PubMed](#)]
85. Boraska V, Skrabic V, Culic VC, Becic K, Kapitanovic S, Zemunik T, 2008. **Association of TNF promoter polymorphisms with type 1 diabetes in the South Croatian population.** *Biol Res* 41, 157-163. [[PubMed](#)]
86. Settin A, Hassan H, El-Baz R, Hassan T, 2009. **Association of cytokine gene polymorphisms with psoriasis in cases from the Nile Delta of Egypt.** *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat* 18, 105-112. [[PubMed](#)]
87. Shukla RK, Kant S, Bhattacharya S, Mittal B, 2012. **Association of cytokine gene polymorphisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease.** *Oman Med J* 27, 285-290. [[PubMed](#)]
88. Corchado S, Marquez M, Montes de Oca M, Romero-Cores P, Fernandez-Gutierrez C, Giron-Gonzalez JA, 2013. **Influence of Genetic Polymorphisms of Tumor Necrosis Factor Alpha and Interleukin 10 Genes on the Risk of Liver Cirrhosis in HIV-HCV Coinfected Patients.** *PLoS One* 8, e66619. [[PubMed](#)]
89. Sandhya P, Danda S, Danda D, Lonarkar S, Luke SS, Sinha S, Joseph G, 2013. **Tumour necrosis factor (TNF)-alpha-308 gene polymorphism in Indian patients with Takayasu's arteritis - a pilot study.** *Indian J Med Res* 137, 749-752. [[PubMed](#)]
90. Tavares MC, de Lima Junior SF, Coelho AV, Marques TR, de Araujo DH, Heraclio Sde A, Amorim MM, de Souza PR, Crovella S, 2016. **Tumor necrosis factor (TNF) alpha and interleukin (IL) 18 genes polymorphisms are correlated with susceptibility to HPV infection in patients with and without cervical intraepithelial lesion.** *Ann Hum Biol* 43, 261-268. [[PubMed](#)]
91. Mossbock G, Renner W, El-Shabrawi Y, Faschinger C, Schmut O, Wedrich A, Zimmermann C, Weger M, 2009. **TNF-alpha -308 G>A and -238 G>A polymorphisms are not major risk factors in Caucasian patients with exfoliation glaucoma.** *Mol Vis* 15, 518-522. [[PubMed](#)]
92. Chinchai T, Homchan K, Sopipong W, Chansaenroj J, Swangvaree S, Junyangdikul P, Vongpunsawad S, Poovorawan Y, 2016. **Lack of Associations between TNF-alpha Polymorphisms and Cervical Cancer in Thai women.** *Asian Pac J Cancer Prev* 17, 953-956. [[PubMed](#)]
93. Franciscatto AC, Ludwig FS, Matte US, Mota S, Stefani MA, 2016. **Replication Study of Polymorphisms Associated With Brain Arteriovenous Malformation in a Population From South of Brazil.** *Cureus* 8, e508. [[PubMed](#)]

94. Heidari MM, Khatami M, Hadadzadeh M, Kazemi M, Mahamed S, Malekzadeh P, Mirjalili M, 2016. **Polymorphisms in NOS3, MTHFR, APOB and TNF-alpha Genes and Risk of Coronary Atherosclerotic Lesions in Iranian Patients.** *Res Cardiovasc Med* 5, e29134. [[PubMed](#)]
95. Xu F, Zhou G, Han S, Yuan W, Chen S, Fu Z, Li D, Zhang H, Li D, Pang D, 2014. **Association of TNF-alpha, TNFRSF1A and TNFRSF1B gene polymorphisms with the risk of sporadic breast cancer in northeast Chinese Han women.** *PLoS One* 9, e101138. [[PubMed](#)]
96. Radouane A, Oudghiri M, Chakib A, Bennani S, Touitou I, Barat-Houari M, 2012. **SNPs in the TNF-alpha gene promoter associated with Behcet's disease in Moroccan patients.** *Rheumatology (Oxford)* 51, 1595-1599. [[PubMed](#)]
97. Baune BT, Konrad C, Grotegerd D, Suslow T, Ohrmann P, Bauer J, Arolt V, Heindel W, Domschke K, Schoning S *et al*, 2012. **Tumor necrosis factor gene variation predicts hippocampus volume in healthy individuals.** *Biol Psychiatry* 72, 655-662. [[PubMed](#)]
98. Perovic D, Perovic V, Pravica V, Bonaci-Nikolic B, Mijanovic R, Bunjevacki V, 2016. **Evaluation of cytokine genetic polymorphisms in adult patients with common variable immunodeficiency: A single-center study.** *Immunol Lett* doi:10.1016/j.imlet.2016.05.005. [[Link](#)] [[PubMed](#)]
99. Bai H, Jing D, Guo A, Yin S, 2014. **Association between interleukin 10 gene polymorphisms and risk of type 2 diabetes mellitus in a Chinese population.** *J Int Med Res* 42, 702-710. [[PubMed](#)]
100. Garcia-Elorriaga G, Vera-Ramirez L, del Rey-Pineda G, Gonzalez-Bonilla C, 2013. **-592 and -1082 interleukin-10 polymorphisms in pulmonary tuberculosis with type 2 diabetes.** *Asian Pac J Trop Med* 6, 505-509. [[PubMed](#)]
101. Erdogan M, Cetinkalp S, Ozgen AG, Saygili F, Berdeli A, Yilmaz C, 2012. **Interleukin-10 (-1082G/A) gene polymorphism in patients with type 2 diabetes with and without nephropathy.** *Genet Test Mol Biomarkers* 16, 91-94. [[PubMed](#)]
102. Forte GI, Pilato G, Vaccarino L, Sanacore M, Candore G, Romano GC, Testa R, Franceschi C, Capri M, Marra M *et al*, 2010. **Risk profiles in type 2 diabetes (metabolic syndrome): integration of IL-10 polymorphisms and laboratory parameters to identify vascular damages related complications.** *Curr Pharm Des* 16, 898-903. [[PubMed](#)]
103. Mtiraoui N, Ezzidi I, Kacem M, Ben Hadj Mohamed M, Chaieb M, Haj Jilani AB, Mahjoub T, Almawi WY, 2009. **Predictive value of interleukin-10 promoter genotypes and haplotypes in determining the susceptibility to nephropathy in type 2 diabetes patients.** *Diabetes Metab Res Rev* 25, 57-63. [[PubMed](#)]
104. Kolla VK, Madhavi G, Pulla Reddy B, Srikanth Babu BM, Yashovanthi J, Valluri VL, Ramesh J, Akka J, 2009. **Association of tumor necrosis factor alpha, interferon gamma and interleukin 10 gene polymorphisms with peripheral neuropathy in South Indian patients with type 2 diabetes.** *Cytokine* 47, 173-177. [[PubMed](#)]
105. Tsiavou A, Hatzigelaki E, Chaidaroglou A, Manginas A, Koniavitou K, Degiannis D, Raptis SA, 2004. **TNF-alpha, TGF-beta1, IL-10, IL-6, gene polymorphisms in latent autoimmune diabetes of adults (LADA) and type 2 diabetes mellitus.** *J Clin Immunol* 24, 591-599. [[PubMed](#)]
106. Vargas-Alarcon G, Ramirez-Bello J, Juarez-Cedillo T, Ramirez-Fuentes S, Carrillo-Sanchez S, Fragoso JM, 2012. **Distribution of the IL-1RN, IL-6, IL-10, INF-gamma, and TNF-alpha Gene Polymorphisms in the Mexican Population.** *Genet Test Mol Biomarkers* 16, 1246-1253. [[PubMed](#)]

107. Andersen V, Ernst A, Christensen J, Ostergaard M, Jacobsen BA, Tjonneland A, Krarup HB, Vogel U, 2010. **The polymorphism rs3024505 proximal to IL-10 is associated with risk of ulcerative colitis and Crohns disease in a Danish case-control study.** *BMC Med Genet* 11, 82. [[PubMed](#)]
108. Amber KT, Staropoli P, Shiman MI, Elgart GW, Hertl M, 2013. **Autoreactive T cells in the immune pathogenesis of pemphigus vulgaris.** *Exp Dermatol* 22, 699-704. [[PubMed](#)]
109. Nurieva RI, Liu X, Dong C, 2009. **Yin-Yang of costimulation: crucial controls of immune tolerance and function.** *Immunol Rev* 229, 88-100. [[PubMed](#)]
110. Feinstein A, Yorav S, Movshovitz M, Schewach-Millet M, 1991. **Pemphigus in families.** *Int J Dermatol* 30, 347-351. [[PubMed](#)]
111. Koc CK, Sallakci N, Akman-Karakas A, Alpsoy E, Yegin O, 2013. **Human leukocyte antigens class I and class II in patients with pemphigus in southern Turkey.** *Int J Dermatol* 52, 53-58. [[PubMed](#)]
112. Lee CW, Yang HY, Kim SC, Jung JH, Hwang JJ, 1998. **HLA class II allele associations in Korean patients with pemphigus.** *Dermatology* 197, 349-352. [[PubMed](#)]
113. Shams S, Amirzargar AA, Yousefi M, Rezaei N, Solgi G, Khosravi F, Ansaripour B, Moradi B, Nikbin B, 2009. **HLA class II (DRB, DQA1 and DQB1) allele and haplotype frequencies in the patients with pemphigus vulgaris.** *J Clin Immunol* 29, 175-179. [[PubMed](#)]
114. Tong JC, Tan TW, Sinha AA, Ranganathan S, 2006. **Prediction of desmoglein-3 peptides reveals multiple shared T-cell epitopes in HLA DR4- and DR6-associated pemphigus vulgaris.** *BMC Bioinformatics* 7 Suppl 5, S7. [[PubMed](#)]
115. Birol A, Anadolu RY, Tutkak H, Gurgey E, 2002. **HLA-class 1 and class 2 antigens in Turkish patients with pemphigus.** *Int J Dermatol* 41, 79-83. [[PubMed](#)]
116. Mortazavi H, Amirzargar AA, Esmaili N, Toofan H, Ehsani AH, Hosseini SH, Rezaei N, 2013. **Association of human leukocyte antigen class I antigens in Iranian patients with pemphigus vulgaris.** *J Dermatol* 40, 244-248. [[PubMed](#)]
117. Hertl M, Amagai M, Sundaram H, Stanley J, Ishii K, Katz SI, 1998. **Recognition of desmoglein 3 by autoreactive T cells in pemphigus vulgaris patients and normals.** *J Invest Dermatol* 110, 62-66. [[PubMed](#)]
118. Scharf SJ, Friedmann A, Brautbar C, Szafer F, Steinman L, Horn G, Gyllensten U, Erlich HA, 1988. **HLA class II allelic variation and susceptibility to pemphigus vulgaris.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 3504-3508. [[PubMed](#)]
119. Sinha AA, Brautbar C, Szafer F, Friedmann A, Tzfon E, Todd JA, Steinman L, McDevitt HO, 1988. **A newly characterized HLA DQ beta allele associated with pemphigus vulgaris.** *Science* 239, 1026-1029. [[PubMed](#)]
120. Todd JA, Acha-Orbea H, Bell JI, Chao N, Fronck Z, Jacob CO, McDermott M, Sinha AA, Timmerman L, Steinman L *et al*, 1988. **A molecular basis for MHC class II-associated autoimmunity.** *Science* 240, 1003-1009. [[PubMed](#)]
121. Brick C, Belgnaoui FZ, Atouf O, Aoussar A, Bennani N, Senouci K, Hassam B, Essakalli M, 2007. **Pemphigus and HLA in Morocco.** *Transfus Clin Biol* 14, 402-406. [[PubMed](#)]
122. Capon F, Bharkhada J, Cochrane NE, Mortimer NJ, Setterfield JF, Reynaert S, Black MM, Vaughan RW, Trembath RC, Harman KE, 2006. **Evidence of an association between desmoglein 3 haplotypes and pemphigus vulgaris.** *Br J Dermatol* 154, 67-71. [[PubMed](#)]
123. Gazit E, Slomov Y, Goldberg I, Brenner S, Loewenthal R, 2004. **HLA-G is associated with pemphigus vulgaris in Jewish patients.** *Hum Immunol* 65, 39-46. [[PubMed](#)]

124. Slomov E, Loewenthal R, Korostishevsky M, Goldberg I, Brenner S, Gazit E, 2005. **Pemphigus vulgaris is associated with the transporter associated with antigen processing (TAP) system.** *Hum Immunol* 66, 1213-1222. [[PubMed](#)]
125. Tron F, Gilbert D, Mouquet H, Joly P, Drouot L, Makni S, Masmoudi H, Charron D, Zitouni M, Loiseau P *et al*, 2005. **Genetic factors in pemphigus.** *J Autoimmun* 24, 319-328. [[PubMed](#)]
126. Tunca M, Musabak U, Sagkan RI, Koc E, Akar A, 2010. **Association of human leukocyte antigen class II alleles with pemphigus vulgaris in a Turkish population.** *J Dermatol* 37, 246-250. [[PubMed](#)]
127. Chen PL, Fann CS, Chang CC, Wu IL, Chiu WY, Lin CY, Yang WS, Chang TC, 2008. **Family-based association study of cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 with susceptibility to Graves' disease in Han population of Taiwan.** *Genes Immun* 9, 87-92. [[PubMed](#)]
128. Liu J, Zhang H, 2013. **-1722T/C polymorphism (rs733618) of CTLA-4 significantly associated with systemic lupus erythematosus (SLE): a comprehensive meta-analysis.** *Hum Immunol* 74, 341-347. [[PubMed](#)]
129. Torres-Carrillo N, Ontiveros-Mercado H, Torres-Carrillo NM, Parra-Rojas I, Rangel-Villalobos H, Ramirez-Duenas MG, Gutierrez-Urena SR, Valle Y, Munoz-Valle JF, 2013. **The -319C/+49G/CT60G haplotype of CTLA-4 gene confers susceptibility to rheumatoid arthritis in Mexican population.** *Cell Biochem Biophys* 67, 1217-1228. [[PubMed](#)]
130. Chen M, Chang Y, Tang F, Xie QH, Li J, Yang H, He XX, Lin JS, 2014. **Influence of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 polymorphisms on the outcomes of hepatitis B virus infection.** *Mol Med Rep* 9, 645-652. [[PubMed](#)]
131. Idris ZM, Miswan N, Muhi J, Mohd TA, Kun JF, Noordin R, 2011. **Association of CTLA4 gene polymorphisms with lymphatic filariasis in an East Malaysian population.** *Hum Immunol* 72, 607-612. [[PubMed](#)]
132. Idris ZM, Yazdanbakhsh M, Adegnika AA, Lell B, Issifou S, Noordin R, 2012. **A pilot study on cytotoxic T lymphocyte-4 gene polymorphisms in urinary schistosomiasis.** *Genet Test Mol Biomarkers* 16, 488-492. [[PubMed](#)]
133. Antczak A, Pastuszak-Lewandoska D, Gorski P, Domanska D, Migdalska-Sek M, Czarnecka K, Nawrot E, Kordiak J, Brzezianska E, 2013. **Ctla-4 expression and polymorphisms in lung tissue of patients with diagnosed non-small-cell lung cancer.** *Biomed Res Int* 2013, 576486. [[PubMed](#)]
134. Sun L, Meng Y, Xie Y, Zhang H, Zhang Z, Wang X, Jiang B, Li W, Li Y, Yang Z, 2014. **CTLA4 variants and haplotype contribute genetic susceptibility to myasthenia gravis in northern Chinese population.** *PLoS One* 9, e101986. [[PubMed](#)]
135. Tang W, Qiu H, Jiang H, Sun B, Wang L, Yin J, Gu H, 2014. **Lack of association between cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) -1722T/C (rs733618) polymorphism and cancer risk: from a case-control study to a meta-analysis.** *PLoS One* 9, e94039. [[PubMed](#)]
136. Pavoni DP, Cerqueira LB, Roxo VM, Petzl-Erler ML, 2006. **Polymorphism of the promoter region and exon 1 of the CTLA4 gene in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem).** *Braz J Med Biol Res* 39, 1227-1232. [[PubMed](#)]
137. Ting WH, Chien MN, Lo FS, Wang CH, Huang CY, Lin CL, Lin WS, Chang TY, Yang HW, Chen WF *et al*, 2016. **Association of Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4 (CTLA4) Gene Polymorphisms with Autoimmune Thyroid Disease in Children and Adults: Case-Control Study.** *PLoS One* 11, e0154394. [[PubMed](#)]



138. Du L, Yang J, Huang J, Ma Y, Wang H, Xiong T, Xiang Z, Zhang Y, Huang J, 2013. **The associations between the polymorphisms in the CTLA-4 gene and the risk of Graves' disease in the Chinese population.** *BMC Med Genet* 14, 46. [[PubMed](#)]
139. Gokhale P, Kerkar S, Tongaonkar H, Salvi V, Mania-Pramanik J, 2013. **CTLA-4 gene polymorphism at position +49 A>G in exon 1: a risk factor for cervical cancer in Indian women.** *Cancer Genet* 206, 154-161. [[PubMed](#)]
140. Xu HB, Yang H, Liu T, Chen H, 2014. **Association of CTLA4 gene polymorphism (rs5742909) with cervical cancer: a meta-analysis.** *Tumour Biol* 35, 1605-1608. [[PubMed](#)]
141. de Almeida ER, Petzl-Erler ML, 2013. **Expression of genes involved in susceptibility to multifactorial autoimmune diseases: estimating genotype effects.** *Int J Immunogenet* 40, 178-185. [[PubMed](#)]
142. Giurdanella F, Fania L, Gnarra M, Toto P, Di Rollo D, Sauder DN, Feliciani C, 2013. **A possible role for CD8+ T lymphocytes in the cell-mediated pathogenesis of pemphigus vulgaris.** *Mediators Inflamm* 2013, 764290. [[PubMed](#)]
143. Kane D, FitzGerald O, 2004. **Tumor necrosis factor-alpha in psoriasis and psoriatic arthritis: a clinical, genetic, and histopathologic perspective.** *Curr Rheumatol Rep* 6, 292-298. [[PubMed](#)]
144. Yokoyama T, Amagai M, 2010. **Immune dysregulation of pemphigus in humans and mice.** *J Dermatol* 37, 205-213. [[PubMed](#)]
145. Keskin DB, Stern JN, Fridkis-Hareli M, Razzaque Ahmed A, 2008. **Cytokine profiles in pemphigus vulgaris patients treated with intravenous immunoglobulins as compared to conventional immunosuppressive therapy.** *Cytokine* 41, 315-321. [[PubMed](#)]
146. Alecu M, Alecu S, Coman G, Galatescu E, Ursaciuc C, 1999. **ICAM-1, ELAM-1, TNF-alpha and IL-6 in serum and blister liquid of pemphigus vulgaris patients.** *Roum Arch Microbiol Immunol* 58, 121-130. [[PubMed](#)]
147. Lopez-Robles E, Avalos-Diaz E, Vega-Memije E, Hojyo-Tomoka T, Villalobos R, Fraire S, Domiguez-Soto L, Herrera-Esparza R, 2001. **TNFalpha and IL-6 are mediators in the blistering process of pemphigus.** *Int J Dermatol* 40, 185-188. [[PubMed](#)]
148. D'Auria L, Bonifati C, Mussi A, D'Agosto G, De Simone C, Giacalone B, Ferraro C, Ameglio F, 1997. **Cytokines in the sera of patients with pemphigus vulgaris: interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha levels are significantly increased as compared to healthy subjects and correlate with disease activity.** *Eur Cytokine Netw* 8, 383-387. [[PubMed](#)]
149. Narbutt J, Lukamowicz J, Bogaczewicz J, Sysa-Jedrzejowska A, Torzecka JD, Lesiak A, 2008. **Serum concentration of interleukin-6 is increased both in active and remission stages of pemphigus vulgaris.** *Mediators Inflamm* 2008, 875394. [[PubMed](#)]
150. Ameglio F, D'Auria L, Cordiali-Fei P, Trento E, D'Agosto G, Mastroianni A, Giannetti A, Giacalone B, 1999. **Anti-intercellular substance antibody log titres are correlated with serum concentrations of interleukin-6, interleukin-15 and tumor necrosis factor-alpha in patients with Pemphigus vulgaris relationships with peripheral blood neutrophil counts, disease severity and duration and patients' age.** *J Biol Regul Homeost Agents* 13, 220-224. [[PubMed](#)]
151. Feliciani C, Toto P, Wang B, Sauder DN, Amerio P, Tulli A, 2003. **Urokinase plasminogen activator mRNA is induced by IL-1alpha and TNF-alpha in in vitro acantholysis.** *Exp Dermatol* 12, 466-471. [[PubMed](#)]

152. Niedbala MJ, Stein M, 1991. **Tumor necrosis factor induction of urokinase-type plasminogen activator in human endothelial cells.** *Biomed Biochim Acta* 50, 427-436. [[PubMed](#)]
153. Terui T, Ishii K, Ozawa M, Tabata N, Kato T, Tagami H, 1997. **C3 production of cultured human epidermal keratinocytes is enhanced by IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  through different pathways.** *J Invest Dermatol* 108, 62-67. [[PubMed](#)]
154. van Hinsbergh VW, van den Berg EA, Fiers W, Dooijewaard G, 1990. **Tumor necrosis factor induces the production of urokinase-type plasminogen activator by human endothelial cells.** *Blood* 75, 1991-1998. [[PubMed](#)]
155. Dar SA, Akhter N, Haque S, Singh T, Mandal RK, Ramachandran VG, Bhattacharya SN, Banerjee BD, Das S, 2016. **Tumor necrosis factor (TNF)-alpha -308G/A (rs1800629) polymorphism distribution in North India and its association with pemphigus: Case-control study and meta-analysis.** *Autoimmunity* 49, 179-187. [[PubMed](#)]
156. Mosaad YM, Soliman OE, Tawhid ZE, Sherif DM, 2010. **Interferon-gamma +874 T/A and interleukin-10 -1082 A/G single nucleotide polymorphism in Egyptian children with tuberculosis.** *Scand J Immunol* 72, 358-364. [[PubMed](#)]
157. Schulz S, Reichert S, Streetz K, Trautwein C, Reichert Y, Glaser C, Schaller HG, Stein JM, 2014. **Tumor necrosis factor-alpha and oral inflammation in patients with Crohn disease.** *J Periodontol* 85, 1424-1431. [[PubMed](#)]
158. Lopez-Hernandez R, Valdes M, Campillo JA, Martinez-Garcia P, Salama H, Bolarin JM, Martinez H, Moya-Quiles MR, Minguela A, Sanchez-Torres A *et al*, 2015. **Pro- and anti-inflammatory cytokine gene single-nucleotide polymorphisms in inflammatory bowel disease.** *Int J Immunogenet* 42, 38-45. [[PubMed](#)]
159. Cho MJ, Ellebrecht CT, Payne AS, 2015. **The dual nature of interleukin-10 in pemphigus vulgaris.** *Cytokine* 73, 335-341. [[PubMed](#)]
160. Pereira NF, Hansen JA, Lin MT, Roxo VM, Braun K, Petzl-Erler ML, 2004. **Cytokine gene polymorphisms in endemic pemphigus foliaceus: a possible role for IL6 variants.** *Cytokine* 28, 233-241. [[PubMed](#)]
161. Brooks DG, Walsh KB, Elsaesser H, Oldstone MB, 2010. **IL-10 directly suppresses CD4 but not CD8 T cell effector and memory responses following acute viral infection.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 3018-3023. [[PubMed](#)]
162. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A, 1991. **IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages.** *J Immunol* 147, 3815-3822. [[PubMed](#)]
163. Murphy EE, Terres G, Macatonia SE, Hsieh CS, Mattson J, Lanier L, Wysocka M, Trinchieri G, Murphy K, O'Garra A, 1994. **B7 and interleukin 12 cooperate for proliferation and interferon gamma production by mouse T helper clones that are unresponsive to B7 costimulation.** *J Exp Med* 180, 223-231. [[PubMed](#)]
164. Taylor A, Akdis M, Joss A, Akkoc T, Wenig R, Colonna M, Daigle I, Flory E, Blaser K, Akdis CA, 2007. **IL-10 inhibits CD28 and ICOS costimulations of T cells via src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 1.** *J Allergy Clin Immunol* 120, 76-83. [[PubMed](#)]
165. Koppelman B, Neefjes JJ, de Vries JE, de Waal Malefyt R, 1997. **Interleukin-10 down-regulates MHC class II alphabeta peptide complexes at the plasma membrane of monocytes by affecting arrival and recycling.** *Immunity* 7, 861-871. [[PubMed](#)]
166. Buelens C, Willems F, Delvaux A, Pierard G, Delville JP, Velu T, Goldman M, 1995. **Interleukin-10 differentially regulates B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression on human peripheral blood dendritic cells.** *Eur J Immunol* 25, 2668-2672. [[PubMed](#)]

167. Mitra RS, Judge TA, Nestle FO, Turka LA, Nickoloff BJ, 1995. **Psoriatic skin-derived dendritic cell function is inhibited by exogenous IL-10. Differential modulation of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression.** *J Immunol* 154, 2668-2677. [[PubMed](#)]
168. Akdis CA, Blesken T, Akdis M, Wuthrich B, Blaser K, 1998. **Role of interleukin 10 in specific immunotherapy.** *J Clin Invest* 102, 98-106. [[PubMed](#)]
169. Rousset F, Garcia E, Defrance T, Peronne C, Vezzio N, Hsu DH, Kastelein R, Moore KW, Banchereau J, 1992. **Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 1890-1893. [[PubMed](#)]
170. Levy Y, Brouet JC, 1994. **Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of the bcl-2 protein.** *J Clin Invest* 93, 424-428. [[PubMed](#)]
171. Itoh K, Hirohata S, 1995. **The role of IL-10 in human B cell activation, proliferation, and differentiation.** *J Immunol* 154, 4341-4350. [[PubMed](#)]
172. Kung WJ, Lin CC, Liu SH, Chaung HC, 2010. **Association of interleukin-10 polymorphisms with cytokines in type 2 diabetic nephropathy.** *Diabetes Technol Ther* 12, 809-813. [[PubMed](#)]



## Spisak skraćenica:

- PV – pemfigus vulgaris
- PF – pemfigus foliaceus
- PVv – pemfigus vegetans
- PP – paraneoplastični pemfigus
- CTLA-4 – limfocitni citotoksični antigen 4
- Dsg-1 – desmoglein-1
- Dsg-3 – desmoglein-3
- APĆ – antigen prezentujuće ćelije
- TCR – T ćelijski receptor
- T<sub>H</sub>1,2 – T pomoćnička ćelija 1 i 2
- Treg – T regulatorna ćelija
- IL – interleukin
- Ig – imunoglobulin
- TNF – faktor nekroze tumora
- INF – interferon
- HLA – humani leukocitni antigend
- PCR – reakcija lančane polimerizacije
- SNP – (*engl.* Single Nucleotide Polymorphism), polimorfizmi pojedinačnih nukleotida
- HP – histopatološki
- DIF test – test direktne imunoflorescencije
- IIF test – test indirektne imunoflorescencije
- GWAS – (*engl.* genome-wide association study)  
– ispitivanje polimorfizama gena u celokupnom genomu
- DNK – dezoksiribonukleinska kiselina
- EDTA – etilendiamin tetrasirćetna kiselina
- OR – (*engl.* odds ratio) –odnos šansi
- A – adenin
- C – citozin
- G – guanin
- T – timin
- IVIG – intravenski imunoglobulini

## BIOGRAFIJA

Srđan Tanasilović je rođen u Beogradu 03. 10. 1973. godine, gde je upisao Medicinski fakultet školske 1992/93. godine, osnovne studije na Medicinskom fakultetu završio 1998. godine, sa prosečnom ocenom 9,40. Obavezni lekarski staž obavio na Medicinskom fakultetu u Beogradu školske 1998/99. godine. Poslediplomske-magistarske studije upisao školske 1998/99. iz oblasti dermatovenerologije, a magistarsku tezu pod naslovom "Etiološki faktori, kliničke manifestacije i sistemske komplikacije kutanih vaskulitisa" odbranio 10. septembra 2010. godine, mentor prof. dr Ljiljana Medenica. Specijalizaciju iz dermatovenerologije započeo školske 1999/2000. godine, a specijalistički ispit položio decembra 2003. godine sa odličnim uspehom.

Od avgusta 2000. godine zaposlen u stalnom radnom odnosu na Klinici za dermatovenerologiju Kliničkog centra Srbije. U zvanje kliničkog asistenta Medicinskog fakulteta na predmetu dermatovenerologija izabran novembra 2010. godine. Učestvovao na većem broju domaćih i stranih naučnih skupova, na kojima je prezentovao radove. Član je međunarodnog projekta u okviru COST akcije TD 1206. Autor je ili koautor 6 publikacija objavljenih u celini u časopisima indeksiranim u Science Citation Index bazama podataka (SCI i SCIE).

## Prilog 1.

# Izjava o autorstvu

Potpisan Srđan Tanasilović

### Izjavljujem

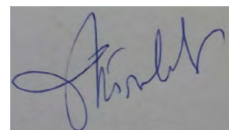
da je doktorska disertacija pod naslovom

**„ANALIZA POLIMORFIZAMA GENA ZA *CD86*, *CTLA-4*, *TNF* i *IL-10* KOD BOLESNIKA SA PEMFIGUSOM U SRBIJI“**

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

U Beogradu, 10. 6. 2016.

**Potpis doktoranta**



---

## Prilog 2.

# Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora **Srđan Tanasilović**

Naslov rada **„ANALIZA POLIMORFIZAMA GENA ZA CD86, CTLA-4, TNF i IL-10 KOD BOLESNIKA SA PEMFIGUSOM U SRBIJI“**

Mentor: **Prof. dr Ljiljana Medenica**

Komentor: **Prof. dr Dušan Popadić**

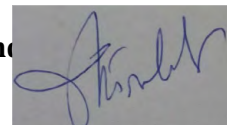
Potpisani Srđan Tanasilović

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao 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 doktoran



U Beogradu, 10. 6. 2016.

## Prilog 3.

# Izjava o korišćenju

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

**„ANALIZA POLIMORFIZAMA GENA ZA *CD86*, *CTLA-4*, *TNF* i *IL-10* KOD BOLESNIKA SA PEMFIGUSOM U SRBIJI“**

koja je moje autorsko delo.

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

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

1. Autorstvo

2. Autorstvo – nekomercijalno

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade

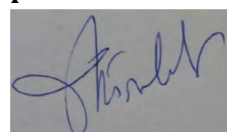
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima

5. Autorstvo – bez prerade

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

U Beogradu, 10. 6. 2016.

**Potpis doktoranda**



---