

# Povezanost učestalosti polimorfizama gena FasL i FOXO3 s razinama citokina TNF $\alpha$ i IL-10 u reumatoidnom artritisu

---

**Artuković, Marinko**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2016**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:119084>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-04-02**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

Marinko Artuković

**POVEZANOST UČESTALOSTI  
POLIMORFIZAMA GENA *FasL* I *FOXO3*  
S RAZINAMA CITOKINA  $TNF\alpha$  I IL-10 U  
REUMATOIDNOM ARTRITISU**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2015



UNIVERSITY OF ZAGREB

FACULTY OF SCIENCE  
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Marinko Artuković

**ASSOCIATION OF *FasL* AND *FOXO3*  
GENES POLYMORPHISMS FREQUENCY  
WITH LEVELS OF TNF $\alpha$  AND IL-  
10 CYTOKINES IN RHEUMATOID  
ARTHRITIS**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2015

Ovaj je doktorski rad izrađen na Odjelu za kliničku imunologiju, pulmologiju i reumatologiju Kliničke bolnice Sveti Duh i Zavodu za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom prof.dr.sc. Asje Stipić Marković i doc.dr.sc. Tomislava Kelave, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

## Zahvala

Najprije zahvaljujem svojim mentorima prof.dr.sc. Asji Stipić Marković i doc.dr.sc. Tomislavu Kelavi na nesebičnoj i trajnoj podršci. Neizmjerne je bila i pomoć prof.dr.sc. Danke Grčević i dr. Alana Sućura sa Zavoda za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu koji su me pratili u svim fazama izrade rada. Zahvaljujem također svim djelatnicima Odjela za kliničku imunologiju, pulmologiju i reumatologiju Kliničke bolnice Sveti Duh za pomoć u prikupljanju materijala.

Zahvaljujem svima koji su sudjelovali u stvaranju moje domovine Hrvatske. Iskazujem poštovanje prema hrvatskim povijesnim tekovinama kao i uspjesima u Domovinskom ratu. Bez neovisne Hrvatske ne bi bilo niti hrvatske znanosti.

Hvala mojoj obitelji. Bogu hvala što su uz mene. I Bogu hvala, On rješava kad sami nemamo snage i znanja.

Marinko Artuković

Sveučilište u Zagrebu

Doktorski rad

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Povezanost učestalosti polimorfizama gena *FasL* i *FOXO3* s razinama citokina TNF $\alpha$  i IL-10  
u reumatoidnom artritisu

Marinko Artuković

Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, Zavod za fiziologiju i imunologiju, Šalata 3, Zagreb

Polimorfizmi jednog nukleotida (SNP, engl. *single nucleotide polymorphism*) gena *FOXO3* i *FasL* mogu biti povezani s razvojem i tijekom reumatoidnog artritisa (RA). SNP gena *FasL* povećava rizik oboljevanja od RA. Oba su gena uključena u apoptozu, pri čemu transkripcijski faktor FOXO3 supresijom Fas liganda sprječava apoptozu i podržava tijek kronične upale. Izolacijom DNA iz periferne krvi, određivanjem prisutnosti SNP-a u navedenim genima, određivanjem razine interleukina-10 (IL-10) i čimbenika tumorske nekroze  $\alpha$  (TNF $\alpha$ , prema engl. *tumor necrosis factor*) iz krvi imunoenzimskom metodom ELISA, te korelacijom prisustva SNP-ova s promjenama razine citokina analizirani su učestalost polimorfizama, ekspresija proupalnih (TNF $\alpha$ ) i protuupalnih (IL-10) citokina u bolesnika s reumatoidnim artritisom u odnosu na kontrolnu skupinu. Polimorfizmi gena *FOXO3* i *FasL* u ispitivanom uzorku hrvatske populacije nisu promijenjene učestalosti u RA, te nisu jasno povezani su s promjenom ekspresije citokina IL-10 i TNF $\alpha$ .

(86 stranica, 19 slika, 3 tablice, 271 literaturni navod, jezik izvornika hrvatski)

Ključne riječi: reumatoidni artritis (RA), polimorfizam pojedinačnog nukleotida (SNP), geni *FOXO3* i *FasL*, citokini TNF $\alpha$  i IL-10.

Mentori: Prof.dr.sc. Asja Stipić Marković

Doc.dr.sc. Tomislav Kelava

Ocjenjivači: Doc.dr.sc. Petra Korać

Izv.prof.dr.sc. Danka Grčević

Doc.dr.sc. Ana Galov

University of Zagreb

Doctoral thesis

Faculty of Science Biološki odsjek

Division of Biology

Association of *FasL* and *FOXO3* genes polymorphisms frequency with levels of TNF $\alpha$  and IL-10 cytokines in rheumatoid arthritis

Marinko Artuković

University of Zagreb, Medical School, Department of Physiology and Immunology, Šalata 3, Zagreb

*FOXO3* and *FasL* single nucleotide polymorphisms (SNP) could be related to the course of rheumatoid arthritis (RA) due to changed expression of certain cytokines. *FasL* gene SNP increases the susceptibility to RA. Both genes are involved in apoptosis, with FOXO3 transcription factor suppression of Fas ligand preventing apoptosis and sustaining chronic inflammation. We determined the frequency of SNPs, expression of proinflammatory (TNF $\alpha$ ) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines in RA patients by methods of DNA isolation from peripheral blood, genotyping, determination of TNF $\alpha$  and IL-10 (ELISA) and then correlated polymorphisms with expression of cytokines. Results: In our cohort *FOXO3* and *FasL* polymorphisms does not differ in frequency in RA, and are not related to expression changes of TNF $\alpha$  and IL-10 with consequences to the course of RA.

(86 pages, 19 figures, 3 tables, 271 references, original in Croatian)

Keywords: RA, SNP, *FOXO3* and *FasL* genes, cytokines TNF $\alpha$  and IL-10.

Supervisors: Asja Stipić Marković, Professor

Tomislav Kelava, Assoc. Professor

Reviewers: Petra Korać, Assoc. Professor

Danka Grčević, Professor

Ana Galov, Assoc. Professor

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. LITERATURA</b> .....	4
<b>2.1. Reumatoidni artritis</b> .....	4
2.1.1. Sinovijalna ovojnica i sinovijalna upala.....	6
2.1.2. Patogeneza reumatoidnog artritisa.....	6
2.1.3. Geni uključeni u razvoj i tijek reumatoidnog artritisa.....	7
2.1.4. Geni <i>FOXO3</i> i <i>FasL</i> mogu biti uključeni u razvoj i tijek reumatoidnog artritisa.....	10
<b>2.2. FOXO3</b> .....	11
2.2.1. FOXO3 utječe na imunoregulaciju i apoptozu u reumatoidnom artritisu.....	11
2.2.3. Polimorfizam jednog nukleotida SNP rs12212067 (T>G) gena <i>FOXO3</i> mijenja tijek autoimunih bolesti uključujući reumatoidni artritis.....	12
<b>2.3. Fas ligand (FasL) i njegov receptor (Fas)</b> .....	13
2.3.1. Fas-FasL interakcija pokreće apoptozu.....	14
2.3.2. Apoptoza utječe na razvoj autoimunih bolesti i reumatoidnog artritisa.....	14
2.3.3. Mutacije Fas-FasL sustava utječu na razvoj autoimunosti i reumatoidnog artritisa.....	16
<b>2.4. Citokini u reumatoidnom artritisu</b> .....	17
2.4.1. TGFβ-1.....	17
2.4.2. IL-10.....	19



2.4.3. IL-6.....	20
2.4.4. TNF $\alpha$ .....	23
2.4.4.1. TNF $\alpha$ djeluje kemoatrakcijski na T-limfocite u artritisu.....	24
2.4.4.2. Učinak TNF $\alpha$ na makrofage i FLS u artritisu .....	24
2.4.4.3. Učinak TNF $\alpha$ na resorpciju kosti.....	25
<b>3 . ISPITANICI I METODE</b> .....	<b>26</b>
<b>3.1. Ispitanici</b> .....	<b>26</b>
3.1.2. Klinički podaci.....	29
<b>3.2. Izolacija DNA</b> .....	<b>29</b>
<b>3.3. Izolacija plazme</b> .....	<b>30</b>
<b>3.4. Genotipizacija</b> .....	<b>30</b>
<b>3.5. ELISA</b> .....	<b>31</b>
<b>3.6. Statistička analiza</b> .....	<b>32</b>
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>34</b>
<b>4.1. Usporedba koncentracije TNF<math>\alpha</math> i IL-10 u serumima bolesnika oboljelih od RA i kontrolne skupine</b> .....	<b>34</b>
4.1.1. Povezanost serumske koncentracije TNF $\alpha$ s kliničkom aktivnošću bolesti i razinom upalnih biljega u skupini oboljelih.....	38
<b>4.2. Učestalost polimorfizma jednog nukleotida gena <i>FasL</i> (FasL-844 C&gt;T, rs763110) i povezanost s vjerojatnošću oboljevanja od RA</b> .....	<b>42</b>
4.2.1. Povezanost polimorfizma jednog nukleotida gena <i>FasL</i> (FasL-844 C>T, rs763110) s kliničkim tijekom reumatoidnog artritisa.....	44
<b>4.3. Učestalost polimorfizma jednog nukleotida gena za FOXO3 (FOXO3 T&gt;G, rs12212067) i povezanost s vjerojatnošću oboljevanja od RA</b> .....	<b>48</b>
4.4.1. Povezanost polimorfizma jednog nukleotida gena za FOXO3 (FOXO3 T>G, rs12212067) s kliničkim tijekom reumatoidnog artritisa.....	50

<b>5. RASPRAVA</b> .....	54
<b>5.1. Citokinski profil ispitanika</b> .....	54
5.1.1. Serumska razina TNF $\alpha$ povišena je u skupini oboljelih od reumatoidnoga artritisa u ispitivanom dijelu hrvatske populacije u odnosu na kontrolnu skupinu bolesnika.....	54
5.1.2. Serumska razina IL-10 povišena je u skupini oboljelih od reumatoidnoga artritisa u ispitivanom dijelu hrvatske populacije u odnosu na kontrolnu skupinu bolesnika.....	54
5.1.3. Serumska razina TNF $\alpha$ u pozitivnoj je korelaciji s razinama IL-10 u skupini oboljelih od reumatoidnoga artritisa u ispitivanom dijelu hrvatske populacije.....	55
<b>5.2. Učestalost polimorfizma jednog nukleotida gena <i>FasL</i> (FasL-844 T&gt;C, rs763110) i povezanost s vjerojatnošću oboljevanja od reumatoidnog artritisa</b> .....	56
5.2.1. Povezanost <i>FasL</i> genotipa (FasL-844 T>C) s razinom citokina i kliničkim nalazima u ispitivanom uzorku hrvatske populacije.....	57
<b>5.3. Učestalost polimorfizma jednog nukleotida gena <i>FOXO3</i> (FOXO3 T&gt;G, rs12212067) i povezanost s vjerojatnošću oboljevanja od reumatoidnog artritisa</b> .....	58
5.3.1. Povezanost polimorfizma jednog nukleotida rs12212067 (T>G) na <i>FOXO3</i> lokusu s razinom citokina i kliničkim nalazima u ispitivanom uzorku hrvatske populacije.....	59
<b>6. ZAKLJUČCI</b> .....	60
<b>7. POPIS LITERATURE</b> .....	61
<b>8. PRILOG A - POPIS KRATICA</b> .....	83
<b>9. ŽIVOTOPIS</b> .....	86

## 1.UVOD

Reumatoidni artritis (RA) je kronična sustavna autoimuna bolest nepoznate etiologije čija je glavna posljedica razaranje zglobne hrskavice i subhondralne kosti sinovijalnih zglobova, što dovodi do gubitka njihove strukture i funkcije. Osim zglobova, bolest zahvaća i druge organe i organske sustave, primjerice pluća, srce i oči (1). Najčešći oblik bolesti je simetrični periferni poliartritis malih zglobova šaka i stopala. Incidencija RA najveća je u dobi između 30 i 55 godina, a dva do tri puta češće se pojavljuje u žena (1). Prevalencija RA u odrasloj populaciji je 0.5% do 1%, što ga čini jednim od najznačajnijih svjetskih uzroka koštanomišićne invalidnosti (2), a time i ekonomskim opterećenjem zdravstvenog sustava i društva (3). Obiteljske studije RA upućuju na genetsku predispoziciju bolesti. Poznata je povezanost s HLA-DR1 i HLA-DR4 (4-6), kao i s genima izvan HLA sustava, od kojih je među najznačajnijima gen za CD40 (7, 8). Patogeneza RA ima tri stadija: nastanak i razvoj autoimunog odgovora, kronična upala i razaranje kosti (9). Smatra se da u genetski predisponiranih pojedinaca djelovanjem različitih okolišnih čimbenika (npr. pušenje, mikroorganizmi) dolazi do razvoja autoimunog odgovora u obliku stvaranja antitijela [(reumatoidni faktor (RF), antitijela usmjerena protiv cikličkih citruliniranih peptida (anti-CCP)], i to ponekad i godinama prije kliničkih znakova bolesti. Mehanizmi prijelaza u kliničku fazu bolesti još uvijek nisu jasno definirani, ali pretpostavlja se da bi okidači mogli biti mehanički stres, ozljeda ili infekcija (10). Također je nejasno razvija li se autoimuna reakcija na egzogene antigene ili na promijenjene autoantigene kao što su kolagen, imunoglobulini i bjelančevine toplinskog šoka (HSPs, prema engl. heat shock proteins) (10). Uz do sada dobro poznatu povezanost HLA lokusa, određeni predisponirajući geni i lokusi identificiraju se zadnjih godina genetskom epidemiologijom (11).

Genetska epidemiologija istražuje povezanost genetskih varijanti unutar populacije s određenim fenotipom. Tehnologijom određivanja profila genske ekspresije iz širokih baza pokušavaju se definirati geni vezani za određenu bolest ili sklonost oboljevanju. Takva istraživanja povezanosti dijela genoma na velikim populacijskim uzorcima nazivaju se cjelogenomska istraživanja povezanosti (GWAS, prema engl. *genome wide association studies*). GWAS najčešće istražuju povezanost polimorfizama jednog nukleotida (SNP, engl. *single-nucleotide polymorphism*) s obilježjima određene bolesti. Ukoliko se uspoređuje DNA dvaju sličnih populacijskih uzoraka pri čemu jednu skupinu čine bolesnici, a druga je kontrolna skupina, radi se o takozvanom fenotipskom pristupu, pri čemu su ispitivani sudionici obilježeni najprije njihovim kliničkim manifestacijama. Svakom se ispitivanom pojedincu uzima uzorak DNA, iz čega se očitavaju milijuni genetskih varijanti uz pomoć testova za određivanje pojedinačnih polimorfizama. Ukoliko je jedan tip ili varijanta

(jedan alel) češći u oboljelih, kaže se da je povezan (engl. *associated*) s bolesti. Smatra se da povezani polimorfizam tada obilježava regiju ljudskog genoma koja utječe na rizik oboljevanja. GWAS prema tome identificiraju polimorfizme jednog nukleotida i druge DNA varijante povezane s bolesti, ali ne mogu detektirati uzroke bolesti (12,13).

Pokazano je kako promijenjena ekspresija gena zbog promjene jednog nukleotida može povećati ili smanjiti sklonost oboljevanju od neke bolesti, odnosno pojačati ili ublažiti aktivnost bolesti, uslijed, primjerice, posljedično promijenjene ekspresije proupalnih i/ili protuupalnih citokina (14). Novija istraživanja povezuju SNP gena za Fas ligand (*FasL*) uključenih u proces ekstrinzičke apoptoze s mogućnošću povećanog rizika oboljevanja od reumatoidnog artritisa te s pojačanom upalnom aktivnošću odnosno težim formama bolesti (15). Daljnja istraživanja povezala su polimorfizam jednog nukleotida gena *Forkhead box O3* (*FOXO3*) koji kodira transkripcijski faktor FOXO3 s modulacijom upalnih citokina u monocitima, prije svega sa supresijom proupalnih TNF $\alpha$  (prema engl. *tumor necrosis factor alpha*) i IL-6 (interleukin-6) te pojačanom produkcijom protuupalnih citokina odnosno IL-10 (interleukin-10) (14). Također se pokazalo da transkripcijski faktor FOXO3 sprječava apoptozu neutrofila putem supresije Fas liganda i na taj način podržava kroničnu upalu u inflamatornom artritisu (16).

Polimorfizam promotorske regije gena *FasL* označen kao FasL-844 T>C (rs763110) zajedno s polimorfizmom introna 2 gena *FasL* označenim kao FasLIVS2nt-124 A>G (rs5030772) prema dosadašnjim istraživanjima ima izrazit učinak na regulaciju i ekspresiju Fas liganda. Također je pokazano da je -844 C alel povezan s većom bazalnom ekspresijom u odnosu na -844 T alel te da ekspresija Fas liganda stimulira apoptotsku aktivnost Fas/FasL puta (15). S obzirom na to, za pretpostaviti je kako bi polimorfizmi gena *FasL* mogli biti povezani s povećanim rizikom od reumatoidnog artritisa uslijed neučinkovite apoptoze.

FOXO3 je transkripcijski faktor, član "O" podgrupe porodice *forkhead box* transkripcijskih faktora koja uključuje još FOXO1 i FOXO4. FOXO proteini su visoko eksprimirani u velikom broju stanica, a reguliraju transkripciju raznih gena, poglavito onih uključenih u kontrolu staničnog ciklusa, staničnog metabolizma i regulaciju razvoja T limfocita apoptozom. Iako članovi FOXO obitelji pokazuju redundanciju u svojim ulogama, za FOXO3 je pokazano da ima specifičnu ulogu potiskivanja proizvodnje upalnih citokina. Povećana količina FOXO3 započinje put ovisan o TGF $\beta$ -1 (prema engl. *transforming growth factor beta-1*) koji regulira proizvodnju citokina (14). Susljedna istraživanja ekspresije FOXO3 su pokazala značajno veću ekspresiju FOXO3 glasničke RNA u plazmi pacijenata koji boluju od RA (17). Daljnjim istraživanjem utvrđeno je da je povećana ekspresija FOXO3 povezana s polimorfizmom njegovog promotora označenog kao SNP rs12212067 (T>G) te da nositelji

*minor* alela (G) imaju veću ekspresiju gena u monocitima periferne krvi u upalnim stanjima. Povećani izražaj FOXO3 povezan je sa smanjenim izražajem proupalnog TNF $\alpha$ , a većim izražajem protuupalnog IL-10 (18).

Cilj rada je utvrditi učestalost polimorfizama gena *FOXO3* SNP rs12212067 i gena *FasL* SNP rs763110, izražaj citokina TNF $\alpha$  i IL-10 te razinu autoantitijela RF, anti-CCP u bolesnika koji boluju od reumatoidnog artritisa u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika, te korelirati prisutnosti polimorfizama s promjenama koncentracije citokina TNF $\alpha$  i IL-10 u serumu.

U istraživanje je uključeno ukupno 198 ispitanika, i to 93 oboljelih od reumatoidnog artritisa te 105 ispitanika kontrolne skupine kojima je isključeno upalno zbivanje. Uzorci periferne krvi uzimali su se bolesnicima koji se liječe od upalne reumatske bolesti na Odjelu za kliničku imunologiju i reumatologiju Kliničke bolnice Sveti Duh Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Kontrolna skupina ispitanika bili su bolesnici zaprimljeni u bolnicu bez povijesti zglobnih bolesti kojima je kliničkom obradom isključeno upalno stanje.

Nakon prikupljanja uzoraka razina TNF $\alpha$  i IL-10 u serumima određena je metodom ELISA (prema engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*). Iz krvi je izolirana DNA te je kvantitativnim lančanom reakcijom polimerazama u stvarnom vremenu (q-RT PCR, prema engl. *polymerase chain reaction*) određena prisutnost navedenih polimorfizama.

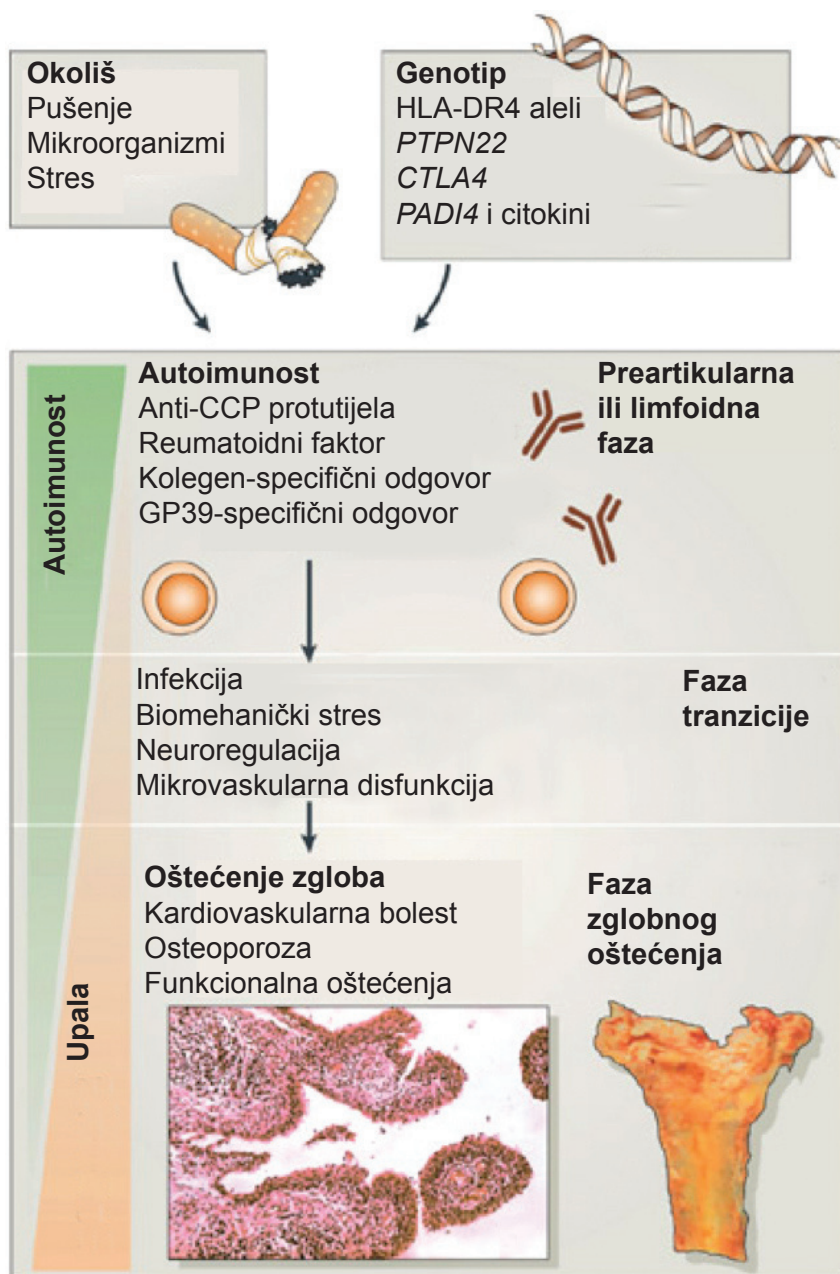
Tijekom statističke obrade najprije se je testirala raspodjela pojedinih varijabli (učestalost polimorfizama, koncentracije citokina, razina autoantitijela), a zatim su se na temelju toga uporabile odgovarajuće mjere deskriptivne statistike te prikladni statistički testovi (parametrijski ili neparametrijski). Statistički su se testirale razlike pojedinih skupina u odnosu na učestalost genskih polimorfizama, razinu odabranih citokina te razinu autoantitijela, kao i analiza odgovarajućim testom njihovih međusobnih korelacija. Za razinu statističke značajnosti (vrijednost  $\alpha$ ) uzela se 0,05. Za statističku analizu koristio se računalni program MedCalc (Mariakerke, Belgija).

Polazna hipoteza istraživanja bila je da su polimorfizmi promotora *FOXO3* i *FasL* značajno promijenjene učestalosti u bolesnika koji boluju od reumatoidnog artritisa u odnosu na zdravu populaciju, pri čemu bi protektivni *FOXO3* SNP rs12212067 bio smanjene učestalosti te povezan s nižom razinom TNF $\alpha$  i višom razinom IL-10, dok bi *FasL* SNP rs763110 bio povećane učestalosti te povezan s višom razinom TNF $\alpha$  i nižom razinom IL-10.

## 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Reumatoidni artritis

Reumatoidni artritis je kronična sustavna upalna bolest koja uglavnom zahvaća sinovijalnu ovojnicu, hrskavicu i periartikularnu kost. Najčešća klinička manifestacija je simetrični poliartritis malih zglobova šake, ali nisu rijetke ekstraartikularne manifestacije od kojih je najozbiljnija intersticijska bolest pluća (19). Kod oboljelih je prisutna i akcelerirana ateroskleroza neovisna o tradicionalnim čimbenicima rizika te povišen rizik velikih kardiovaskularnih događaja (20). Prevalencija u odrasloj populaciji iznosi oko 1%, a obzirom da je povezana s značajnim funkcionalnim oštećenjima i povišenim mortalitetom (2) predstavlja i značajno socioekonomsko opterećenje (3). Incidencija RA najveća je u dobi između 30 i 55 godina, a dva do tri puta češće se pojavljuje u žena (1). Etiopatogenetski su važna tri obilježja bolesti- razvoj autoimunosti, kronična upala i razaranje zgloba (21). Za nastanak autoimunosti obilježene prisustvom antitijela specifičnih za IgG (reumatoidni faktor-RF) ili za cikličke citrulinirane peptide (anticiklička citrulinirana antitijela, anti-CCP) važna je interakcija genske predispozicije i okolišnih čimbenika kao što je pušenje (22). Faza razvoja autoimunosti, koja se još naziva i preartikularna ili limfoidna faza godinama prethodi prvim kliničkim manifestacijama. Biomehanički stres, mikrovaskularna disfunkcija i infekcija smatraju se obilježjem tranzicijske faze koja korelira s prvim artralgijskim i razvojem sinovijalne upale. Konačno, perzistiranje upale vodi oštećenjima zglobova i pojavi ostalih komorbiditeta kao što su kardiovaskularne bolesti i osteoporoza (9). Tri faze razvoja bolesti prikazane su na slici 1.



**Slika 1.** Patogenetski okvir razvoja reumatoidnog artritisa. Adaptirano prema McInnes IB, Schett G (9).

Nakon kliničkog nastupa bolesti, normalno hipocelularna sinovijalna ovojnica postaje hiperplastična uz razvoj područja guste infiltracije upalnim stanicama, primjerice T-limfocitima koji produkcijom proupalnih citokina podržavaju upalni proces (23).



### 2.1.1. Sinovijalna ovojnica i sinovijalna upala

Sinovijalna ovojnica oblaže unutrašnjost zglobne šupljine i proizvodi sinovijalnu tekućinu koja hrani zglobnu hrskavicu te djeluje kao lubrikant između zglobnih ploha (24, 2). Sastoji se od površinskog i dubinskog sloja pri čemu je površinski građen od nekoliko slojeva stanica bez bazalne membrane, dok dubinski čine rahlo vezivo s fibroblastima, makrofazima, krvnim i limfnim žilama te živcima (25). Upalni sinovitis temeljno je obilježje reumatoidnog artritisa, pri čemu najraniju fazu upale karakteriziraju mikrovaskularna oštećenja uz proliferaciju površinskog sloja stanica. Stvaraju se perivaskularni infiltrati limfocita, plazma stanica i aktiviranih makrofaga (26). Uz infiltraciju upalnim stanicama važno je obilježje RA transformacija i promijenjena funkcija sinovijalnih fibroblasta koji stvaranjem upalnih medijatora i citokina aktivno sudjeluju u razvoju bolesti (27). Sinovijalni fibroblasti aktivirani upalom, nazvani sinoviociti nalik na fibroblaste (FLS, prema engl. *fibroblast-like synoviocytes*) razlikuju se od normalnih te ekspiriraju mnoge osobine transformiranih staničnih linija kao što su pojačana ekspresija adhezijskih molekula, otpornost na apoptozu, proliferacija, izražaj onkogeni i stvaranje citokina (27).

Upotrebom mikroskopije atomske snage (AFM, prema engl. *atomic force microscopy*) definirane su morfološke i kvantitativne rezlike FLS i normalnih sinovijalnih fibroblasta kao učinkovit dijagnostički alat za ranu detekciju RA (28). Odgovornost za nastanak ovakvog staničnog fenotipa pridaje se citokinima i čimbenicima rasta, od kojih su najistaknutiji čimbenik rasta fibroblasta (FGF, prema engl. *fibroblast growth factor*), čimbenik nekroze tumora (TNF, prema engl. *tumor necrosis factor*), IL-1, IL-17, IL-18 te lokalna hipoksija upalno promijenjenog zgloba koja potiče produkciju proupalnih i proangiogenetskih čimbenika (29). Nedavno je pokazano da čimbenik induciran hipoksijom  $2\alpha$  (HIF- $2\alpha$ , prema engl. *hypoxia-inducible factor*) regulira ekspresiju pojedinih citokina u FLS te na taj način uzrokuje progresiju upale i oštećenja tkiva u RA i osteoartritisu (30). Napredovanjem upale unutar sinovije nastaju strukture nalik na germinativne centre sekundarnih limfoidnih organa unutar kojih se proizvode poliklonalni imunoglobulini, reumatoidni faktor i anticitrulinska antitijela, što dovodi do lokalne formacije imunokompleksa (31). Smatra se da niz imunološki posredovanih reakcija unutar sinovije počinje aktivacijom CD4<sup>+</sup> T-limfocita koji su dominantno zastupljeni mononukleari i nalaze se u bliskom kontaktu s HLA DR<sup>+</sup> makrofazima i dendritičkim stanicama (32).

### 2.1.2. Patogeneza reumatoidnog artritisa

Ključni patogenetski događaji u reumatoidnom artritisu odvijaju se u sinovijalnoj ovojnici a uključuju poremećaj prezentacije vlastitih antigena putem antigen prezentirajućih stanica



(APC, prema engl. *antigenpresenting cells*) što vodi aktivaciji i proliferaciji sinovijalnih oligoklonalnih, antigen specifičnih, autoreaktivnih CD4 T-limfocita (33). Ovisno o ekspresiji HLA gena autoreaktivni CD4 T- limfociti produciraju proupalne citokine čime pridonose kroničnoj upali i indukciji autoimunosti (34). Autoimunost se prezentira stvaranjem antitijela specifičnih za IgG poznatih kao reumatoidni faktor (RF) ili za ciklički citrulinirani peptid (CCP) koja su često prisutna već u predkliničkoj fazi bolesti (2). Većina pacijenata s RA ima antitijela na citruliniranu  $\alpha$ -enolazu (anticiklička citrulinirana peptidna antitijela, anti-CCP) što je u pozitivnoj korelaciji s pušenjem i HLA-DRB1\*04 genotipom (35). Pušenje je primjer okolišnog stresora koji utjecajem na granična tkiva dovodi do citrulinacije mukoznih proteina čime nastaju autoantigeni. Osim pušenja, do promjena citrulinacije mukoznih proteina može dovesti periodontalna bolest uzrokovana bakterijom *Porphyromonas gingivalis* uslijed promjena ekspresije peptidil arginin deaminaze tip IV (PADI4) (36). Ostali pokretači autoimunosti u zglobnoj čahuri mogu biti različiti mikroorganizmi (virusi i bakterije) i njihovi produkti. Mikroorganizmi induciraju specifični T-limfocitni odgovor uz križnu reaktivnost s ljudskim antigenima što se naziva molekularna mimikrija. Poznata je i produkcija autoantitijela na Fc komponentu vlastitih imunoglobulina tijekom infekcije u kojoj se stvaraju imuni kompleksi (37, 21), te novi mehanizam razvoja autoantitijela u seropozitivnom RA posredovan gastrointestinalnim mikrobiomom (38). U razvoju autoimunosti uz čimbenike okoliša jednako je važna njihova interakcija s predisponirajućim genima (39).

### 2.1.3. Geni uključeni u razvoj i tijek reumatoidnog artritisa

Doprinos genetskih čimbenika razvoju reumatoidnog artritisa istraživao se kroz povijest obiteljskim studijama, koje su pokazale povećanu predispoziciju za bolest kod rodbinski povezanih jedinki (40). Relativni rizik razvoja RA kod prvih rođaka procijenjen je na dvostruke ili više vrijednosti u odnosu na opću populaciju (41-43). Različita prevalencija bolesti između jednojajčanih i dvojajčanih blizanaca sugerirala je da se genetski doprinos, odnosno nasljednost približava 65%, iako je ovo utemeljeno na relativno malom uzorku ispitanika od 23 jednojajčana i 10 dvojajčanih blizanačkih parova (44). Veća učestalost RA u žena nego u muškaraca objašnjavala se je mogućom ulogom spolnih hormona (45-46) dok je uloga spolno vezanih kromosoma u reumatoidnom artritisu istraživana u studijama koje su pokazale povezanost lokusa IRAK1 (prema engl. *interleukin-1 receptor-associated kinase 1*) na X kromosomu koji kodira istoimenu kinazu s razvojem bolesti (47-48). Općepoznata je povezanost određenih genotipova gena tkivne podudarnosti s određenim bolestima pri čemu pripadnost nekom genotipu predstavlja predispoziciju za bolest. Najpoznatija je povezanost HLA-DR alela gena tkivne podudarnosti s reumatoidnim artritisom za koju se smatra da

doprinosi trećini genetskog rizika za razvoj RA (49-51). HLA-DR4, koji pripada skupini MHC II (MHC, prema engl. *major histocompatibility complex*) sustava, učestaliji je među oboljelima od RA nego u kontrolama, dok se HLA-DR1 također povezuje s rizikom razvoja bolesti ali u manjoj mjeri nego DR4 (52). Sekvencioniranjem gena HLA-DRB1 koji kodira polimorfni O lanac proteina DR utvrđena je različitost rizika pojedinih HLA alela za različite etničke grupe. Za europsku populaciju najučestaliji aleli rizika jesu HLA-DRB1\*04:01, \*04:04, i \*01:01, dok su za azijsku populaciju najčešći aleli rizika HLA-DRB1\*04:01, \*04:04, i \*01:01 (53). Općenito je prihvaćeno da zajednički aminokiselinski slijed QKRAA prisutan na veznim mjestima peptida na pozicijama 70-74 lanca O molekule DR, nazvan zajedničkim epitopom (SE, prema engl. *shared epitope*) jest povezan s predispozicijom za RA (54). Značajna povezanost alela HLA-DRB1 SE potvrđena je u mnogim etničkim populacijama, nakon čega se je pokazala i povezanost aminokiselinskih slijedova na HLA-DRB1 11 i 13 s RA neovisno o alelima SE (55). Unazad petnaestak godina sve je veći broj studija koje analiziraju genom velikih populacijskih uzoraka te povezuju pojedine lokuse sa rizikom oboljevanja, što je dovelo do identifikacije pojedinih genetskih varijanti izvan sustava MHC povezanih s reumatoidnim artritisom (56-59). 2003. godine Suzuki i suradnici (60) identificirali su SNP u trećem intronu PADI4 (peptidil arginin deaminaza tip IV) gena koji pridonosi riziku razvoja RA u populaciji Japanaca. Godinu dana kasnije Begovich i suradnici (61) je pronašli su pojedinačni polimorfizam u genu za PTPN22 (proteinska tirozin fosfataza nerekceptorskog tipa 22) kao varijantu rizika bijele populacije Sjedinjenih Američkih Država. Ovaj je polimorfizam do danas ostao najjače povezan s razvojem reumatoidnog artritisa uz omjer rizika 1.8 za anti-CCP pozitivne bolesnike. Povezanost nekoliko dodatnih lokusa predloženih za ulogu u razvoju bolesti (primjerice CTLA-4 (62), TRAF 1 (63), FCRL3 (64)), nije se potvrdila na uzorku >4000 ispitanika iz sjevernoameričkog i švedskog registra (62). 2007. godine objavljene su tri GWAS studije o reumatoidnom artritisu (65-67), što je doprinijelo daljnjoj identifikaciji gena rizika za bolest. Kasnije metaanalize podataka iz GWAS studija doprinijele su još boljoj identifikaciji lokusa rizika za europsku i japansku populaciju. Stahl i suradnici (68) analizirali su podatke za europsku populaciju, ukupno 12307 bolesnika s pozitivnim anticitrulinskim antitijelima i 28975 kontrola, dok su Okada i suradnici (69) analizirali podatke za japansku populaciju unutar skupine od 6351 bolesnika i 38575 kontrola. Ovim analizama je potvrđeno sedam poznatih lokusa predisponiranosti za bolest, te otkriveno devet novih. Kasnije provedena komparativna analiza 46 lokusa rizika između europske i japanske populacije potvrdila je značajnu povezanost sa sklonošću oboljevanju za 22 lokusa unutar ispitivane skupine Japanaca, 36 lokusa unutar ispitivane skupine Europljana, te 14 zajedničkih lokusa rizika (69). Uz povezivanje genotipa s predispozicijom za bolest u središtu je istraživačkog interesa i povezivanje genotipa s tijekom bolesti odnosno fenotipskim obilježjima. Jedno od najznačajnijih otkrića iz ovog područja objavljeno 2010. godine odnosi se na polimorfizam gena *CD40* rs 4810485, lociran na njegovu drugom intronu. Ovaj gen kodira protein CD40 koji ima značajnu ulogu u imunoregulaciji (70). CD40 je eksprimiran na

širokom spektru stanica imunološkog sustava, uključujući B limfocite, monocite i dendritičke stanice, dok je njegov ligand, CD154, eksprimiran na aktiviranim CD4+ limfocitima. Vezanje CD154 na CD40 omogućava kritičnu stimulaciju za proliferaciju B limfocita, proizvodnju imunoglobulina, prekapčanje izotipova i regulaciju drugih kostimulatornih molekula. CD40–CD154 interakcija ima važnu ulogu u razvoju RA, obzirom da je ekspresija CD154 na CD4+ limfocitima u RA promotor povećane aktivacije CD4+ limfocita što je povezano s aktivnom bolesti (71). Navedeni polimorfizam *CD40* gena ne povezuje se samo s predispozicijom za bolest već i sa seropozitivnošću (anti-CCP i RF-pozitivnim bolesnicima) kao fenotipskim obilježjem RA što se tumači njegovom imunoregulatornom ulogom vezanom za B limfocite i stvaranje autoantitijela.(8). Drugi primjeri povezanosti genskih lokusa važnih za razvoj bolesti bilo s fenotipom bilo s pretpostavljenim molekularnim mehanizmom, primjerice promjenama transkripcijske aktivnosti ili posttranslacijskim modifikacijama, jesu sljedeći:

***PADI4*** Riječ je o genu eksprimiranom u makrofagima, monocitima i neutrofilima važnom za sintezu enzima koji sudjeluje u posttranslacijskoj modifikaciji ostataka arginina u ostatke citrulina (72-73). Takvi ostatci citrulina, peptidilcitrulini, predstavljaju ciljne antigene anticitrulinskih antitijela što razjašnjava njihovu važnost u RA. *PADI4* je povezan s predispozicijom za bolest u japanskoj populaciji (60) te u azijskoj populaciji (74). Izostanak predispozicije unutar europske populacije tumači se manjom učestalošću pušenja kao okolišnog čimbenika. Naime, na temelju nalaza citruliniranih peptida u bronhoalveolarnom lavatu uz povišenu ekspresiju *PADI* enzima u pušača ali ne i nepušača postavljena je povezanost između promjena *PADI4* i pušenja (75).

***PTPN22*** Najpoznatiji polimorfizam u RA, SNP rs2476601, je polimorfizam ovog gena koji kodira proteinsku tirozin fosfatazu nerekceptorskog tipa 22 (67). Povezuje se s predispozicijom za više od 20 autoimunih bolesti u europskoj populaciji (76). Gen kodira limfoidnu tirozin fosfatazu (*LYP*, prema engl. *lymphoid tyrosine phosphatase*) koja defosforilacijom limfocitnih proteina može regulirati signalizaciju T-limfocitnih receptora, broj, aktivaciju i timusnu selekciju T-limfocita (77).

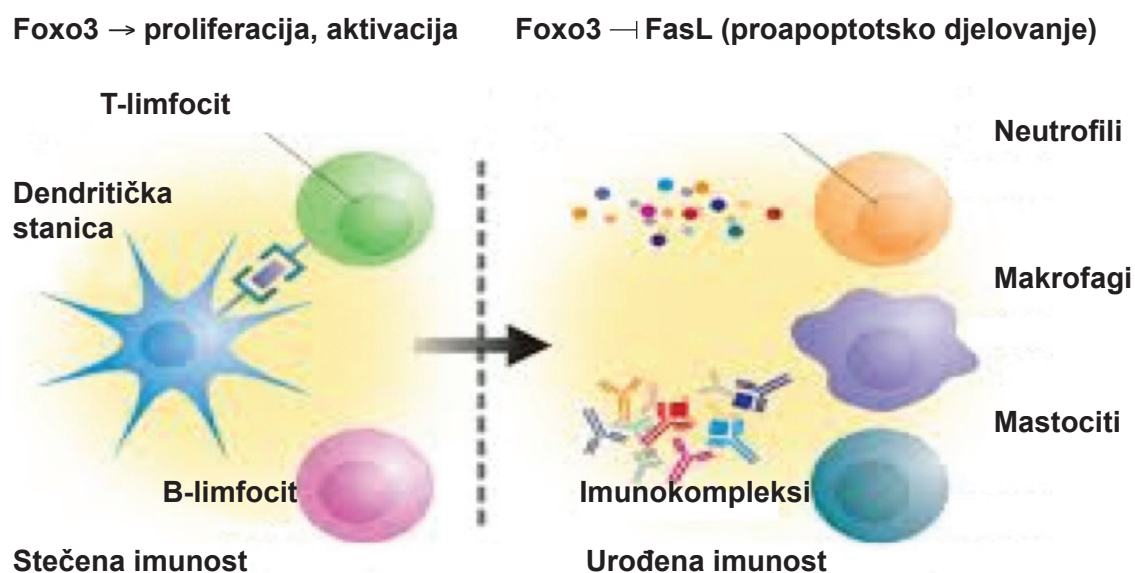
***CCR6*** Ovaj gen (engl. *chemokine C-C motif receptor 6*) kodira kemokinski receptor koji je transmembranski protein važan u diferencijaciji B-limfocita, a povezan je s predispozicijom za RA u azijskoj i europskoj populaciji (78). Dinukleotidni polimorfizam ovog gena rs3093024 pojačava njegovu transkripcijsku aktivnost i povezan je s povišenim razinama IL-17A u serumu oboljelih (79).

***CTLA4*** Ovaj gen kodira proteinski receptor koji sudjeluje u imunoregulaciji kao kostimulatorna molekula, a naziva se *CTLA4* (prema engl. *cytotoxic T-lymphocyte-associated*

*protein 4*) (80). Poznata je povezanost polimorfizma ovog gena CT60, rs231775 s razvojem autoimunih bolesti kao što su Gravesova bolest ili dijabetes tipa 1 (81). Polimorfizmi ovog gena povezuju se i s razvojem reumatoidnog artritisa (82).

#### 2.1.4. *FOXO3* i *FasL* geni mogu biti uključeni u razvoj i tijek reumatoidnog artritisa

Na temelju poznavanja dvaju specifičnih mehanizama razvoja karakteristične sinovijalne hiperplazije-poremećaja proliferacije sinoviocita te poremećaja imunoregulacije (83), koji su povezani s neravnotežom između stanične proliferacije i stanične smrti (84), istraživala se je uloga gena uključenih u apoptozu u mehanizmima razvoja autoimunih bolesti. Pokazana je jasna povezanost apoptoze posredovane Fas-FasL sustavom s patofiziologijom RA (85) pri čemu su promjene ekspresije ili funkcije Fas-FasL puta pridonosile održavanju proliferacije sinovijalnih stanica, upale i razaranja tkiva (86-87). Do sada je identificirano nekoliko polimorfizama jednog nukleotida gena *Fas* i *FasL* (88-89) koji se dovode u vezu s promjenama imunoregulacije i indukcijom autoimunosti te limfoproliferacije. Jedan od tih polimorfizama, *FasL*-844 T>C u nekim se je studijama pokazao povezan s predispozicijom za reumatoidni artritis (15). Tijekom proučavanja mehanizama apoptoze na staničnim kulturama sinovijalnog tkiva oboljelih od reumatoidnog artritisa nadalje se je pokazalo da transkripcijski faktor FOXO3, kodiran genom *FOXO3* može inhibirati transkripciju Fas liganda vežući se za promotorsku regiju njegova gena, što dovodi do duljeg preživljenja sinovijalnih upalnih stanica (90). Na taj je način predložen novi molekularni mehanizam perzistencije upalnih stanica prevencijom apoptoze neutrofila, reguliran interakcijom FOXO3 i FasL (slika 2).



**Slika 2.** FOXO3 inhibira transkripciju FasL vežući se na *FasL* promotorsku regiju što vodi produljenom preživljenju upalnih stanica u kroničnoj upalnoj leziji. Adaptirano prema Liew FY, McInnes IB (90).

Uz posrednu regulaciju apoptoze djelovanjem na FasL, FOXO3 i promjene ekspresije njegova gena *FOXO3* vezane za polimorfizam jednog nukleotida (rs12212067, T>G) mogu utjecati na blaži tijek autoimunih bolesti, uključujući i reumatoidni artritis (91). Spoznaju da ovaj polimorfizam jednog nukleotida gena *FOXO3* može promijeniti ishod reumatoidnog artritisa i Chronove bolesti neki autori ubrajaju među najvažnija otkrića u biologiji autoimunih bolesti zadnjih godina (92).

## 2.2. FOXO3

FOXO3 proteini kodirani genom *FOXO3* pripadaju podklasi "O" skupine transkripcijskih čimbenika FOX (prema engl. *forkhead box*) čija je uloga regulacija ekspresije gena važnih za stanični rast, proliferaciju, diferencijaciju i dugovječnost (93). Važna je njihova transkripcijska aktivnost jer mogu vezati kondenzirani kromatin tijekom stanične diferencijacije (94). Definirani su postojanjem motiva sačinjenog od slijeda 80-100 aminokiselina koji se veže za DNA, a naziva se *forkhead box* (prema engl. *fork-* rašlje) ili krilata zavojnica (prema engl. *winged helix*) zbog leptirastog izgleda zavojnica proteinske strukture (95). Uz FOXO3, u ljudi se nalaze još tri člana ove skupine proteina: FOXO1, FOXO4 i FOXO6. Svi oni dijele svojstva da nakon fosforilacije proteinima (primjerice protein kinazom B) mogu biti inhibirani i translocirani iz jezgre, što može dovesti do stanične transformacije i tumorogeneze (96), dok se u odsustvu okolišnih signala njihova transkripcija odvija isključivo u jezgri. Također sudjeluju u translaciji raznih okolišnih čimbenika kao što su inzulin, čimbenici rasta, nutrijenti i oksidativni stres u specifične programe genskog izražaja. Navedeni okolišni čimbenici kontroliraju aktivnost FOXO prethodno navedenim mehanizmom njihove unutarstanične lokalizacije, ali i utjecajem na razinu proteina, osobine vezanja za DNA i transkripcijsku aktivnost. Na temelju ovog modela po kojem unutarstanični i vanstanični stimulusi dovode do kombinacija FOXO posttranslacijskih modifikacija koje se „zapisuju“ u selektivne enzime predložen je naziv tzv. FOXO koda. Ovaj kod mogao bi biti „pročitao“ specifičnim veznim partnerima FOXO proteina, što bi moduliralo njihovu sposobnost za regulaciju genskih programa, odnosno specificiralo odgovarajući stanični odgovor, uključujući i mehanizam apoptoze (97).

### 2.2.1. FOXO3 utječe na imunoregulaciju i apoptozu u reumatoidnom artritisu

Pokazala se mogućnost da transkripcijski čimbenik FOXO3 utječe na regulaciju apoptoze u RA, na način da se njegovim vezanjem na promotorsku regiju Fas liganda inhibira



transkripcija FasL-a što omogućava dulje preživljenje neutrofila u kroničnoj upalnoj leziji te time promovira upalu (16). Na animalnom modelu pokazalo se da su neutrofilni FOXO3-deficijentni miševi podložni apoptozi FasL posredovanim putem, pri čemu razine TNF $\alpha$  i IL-1 induciraju apoptozu i izražaj FasL-a. U miševa koji nisu FOXO-deficijentni nije primijećen ovaj proces, što je podržavalo preživljenje neutrofila u upalno promijenjenom zglobu (90). Također se je pokazala povećana ekspresija FOXO3 u serumu oboljelih od RA, poglavito u polimorfonuklearima (PMN) što sugerira ulogu ovog gena u patogenezi bolesti putem utjecaja na dulje preživljenje serumskih PMN važnih za tijek upalnog procesa. Pojačana ekspresija FOXO3 zamijećena je i unutar upalnih infiltrata subintime reumatoidne sinovijalne ovojnice, u komparaciji sa sinovijom oboljelih od osteoartritisa, što je bilo povezano s proliferacijom i preživljenjem sinovijalnih T-limfocita (17). Povećana ekspresija FOXO3 glasničke RNA zabilježena je u krvi oboljelih od RA u skupini 47 bolesnika i 46 kontrola s razinom 1.6 puta većom nego u zdravih kontrola (17). Istraživanja na animalnim modelima pokazala su da FOXO3 deficijencija vodi do spontane limfoproliferacije, pojačane produkcije citokina, te inhibicijom aktivnosti NF-kB dovodi do poremećaja T-limfocitne tolerancije što rezultira pojačanom aktivacijom pomagačkih T-limfocita (99). Obzirom na saznanja da FOXO3 sudjeluje u kontroli nekoliko gena uključenih u regulaciju staničnog ciklusa i apoptozu uključujući i *FasL* (98), da je uključen u mehanizme razvoja autoimunih bolesti (99) te da je njegova ekspresija povišena kod oboljelih od reumatoidnog artritisa, istraživanja povezanosti njegova gena *FOXO3* na velikim populacijskim uzorcima s razvojem i tijekom bolesti bila su zadnjih godina predmetom interesa znanstvene zajednice.

### **2.2.3. Polimorfizam jednog nukleotida SNP rs12212067 (T>G) na genu *FOXO3* mijenja tijek autoimunih bolesti uključujući reumatoidni artritis**

Razvoj bolesti važan je dio njezine patofiziologije, ali je jednako važan i njezin tijek. Mnoge bolesti imaju varijabilan tijek, a upravo o njemu ovisi ishod odnosno prognoza za oboljelog. Prognoza često utječe na bolesnikovo psihofizičko stanje više nego sama dijagnoza, te je slabo poznavanje odrednica tijeka bolesti ograničavajući čimbenik u liječenju i za bolesnika i za medicinski tim. Povezivanje podataka dobivenih genetskim tehnologijama s predispozicijom za bolest često ne dovodi do poboljšanja ishoda liječenja. Primjerice, iako je identificirano više od 140 lokusa predispozicije za Chronovu bolest (100), pokazalo se da je samo jedan od njih korelirao s kliničkim ishodom (101), što je postavilo pitanje razine doprinosa rezultata genetskih studija kliničkoj medicini i rezultiralo provođenjem studija koje uspoređuju genske profile bolesnika s određenim fenotipom bolesti. Tako je uspoređivanjem bolesnika s agresivnom odnosno indolentnom formom Chronove bolesti pronađen nekodirajući polimorfizam jednog nukleotida gena *FOXO3* koji utječe na prognozu bolesti, ali ne i na predispoziciju za bolest (100). SNP rs12212067 je ovisno o prisustvu *minor* G alela regulirao

transkripciju gena *FOXO3* te utjecao na njegovu raniju reakumulaciju unutar jezgre, što je rezultiralo pokretanjem puta ovisnog o TGF $\beta$  (transformirajući čimbenik rasta  $\beta$ , prema engl. *transforming growth factor  $\beta$* ) koji u monocitima smanjuje stvaranje proupalnog citokina TNF $\alpha$  uz istodoban porast stvaranja protuupalnog IL-10 (14). Ovakav citokinski profil rezultirao je blažim formama bolesti. Takva genetska varijacija koja modulira produkciju proupalnih citokina u monocitima mogla bi biti važna i u drugim bolestima čiji patofiziološki mehanizmi uključuju navedene citokine, primjerice reumatoidnom artritisu (102). Stoga su Lee i suradnici genotipizirali rs12212067 na ukupno 1453 oboljela od reumatoidnog artritisa sakupljena prospektivno u dvije studijske grupe (103-104) pri čemu je radiološki nalaz oštećenja zglobova šake i stopala, određen bodovanjem po Larsenu (105) bio pokazatelj kliničkog ishoda odnosno težine bolesti. Iako ovaj polimorfizam u prethodnim istraživanjima nije bio povezan s predispozicijom za RA (67), pokazala se jasna povezanost *minor* G alela s blažim tijekom bolesti obilježenim manjim zglobnim oštećenjima tijekom vremena. Autori su zaključili da je ovakav nalaz konzistentan s od ranije poznatim funkcionalnim učincima polimorfizma, te da je ishod RA pod utjecajem o FOXO3 ovisne kontrole upalnog odgovora.

### **2.3. Fas ligand (FasL) i njegov receptor (Fas)**

Fas ligand (ili CD95L) je transmembranski protein koji pripada obitelji čimbenika tumorske nekroze, a eksprimiran je na citotoksičnim T-limfocitima (106). Vežanjem za receptor inducira apoptozu, što mu je najvažnija fiziološka uloga. Interakcija FasL s receptorom važna je u imunoregulaciji i biologiji tumora. Signaliziranje se odvija putem trimerizacije s receptorom koja dovodi do obuhvaćanja membrane ciljane stanice, apoptoze i stanične smrti. FasL postoji u dva oblika- membranskom (mFasL) i sloubilnom (sFasL) (107). Solubilni FasL nastaje cijepanjem stanične membrane obuhvaćene FasL-receptor kompleksom putem enzima matriks metaloproteinaze MMP-7.

Fas je receptorski protein koji se sastoji od vanstanične, transmembranske i citoplazmatske domene a kodiran je genom *TNFRSF6* lociranom na dugom kraku desetog kromosoma (108). Poznat je i kao antigen apoptoze 1 (APO-1 prema engl. *apoptosis antigen 1*), CD95 (prema engl. *cluster of differentiation 95*) ili TNFRSF6 (prema engl. *tumor necrosis factor receptor superfamily member 6*). U stanicama Fas je površinski receptor smrti te vežanjem za svoj ligand može dovesti do pokretanja programirane stanične smrti, apoptoze (109).

### 2.3.1. Fas-FasL interakcija pokreće apoptozu

Apoptoza ili programirana stanična smrt definira se kao mehanizam kojim stanica aktivno uz utrošak energije i sintezu određenih proteina pokreće vlastitu smrt kao sastavni dio fizioloških procesa ili odgovor na patološka stanja (110). Kaskadna aktivacija proenzimske skupine cisteinskih proteaza (kaspaza) u citoplazmi stanica koje cijepanjem specifičnih supstrata dovode do morfoloških i biokemijskih promjena glavno je obilježje apoptotskog procesa (111). Do danas je poznato četrnaest članova obitelji kaspaza koje se označavaju rednim brojevima 1-14. Opisana su dva puta aktivacije apoptoze: vanjski ili ekstrinzički, te unutarnji ili intrinzični. U vanjskom putu apoptozu često pokreće vezanje površinskih receptora smrti kao što je Fas sa svojim ligandima. Vanjski put može pokrenuti i TNF $\alpha$  vezanjem na površinske proteinske stanične receptore nazvane TNFR1 (prema engl. *tumor necrosis factor receptor 1*) što stimulira makrofage na pojačano otpuštanje TNF $\alpha$  i aktivira apoptozu (112).

Unutarnji put, koji se ponekad naziva mitohondrijski, pokreće obitelj regulacijskih proteina Bcl 2 (prema engl. *B-cell lymphoma 2*) uzrokovanjem propusnosti vanjske mitohondrijske membrane (109). Vanjski mehanizam pokretanja apoptoze počinje interakcijom Fas-FasL koja rezultira trimerizacijom receptora. Posljedica trimerizacije jest grozdolika intracelularno nakupljanje citoplazmatskih dijelova Fas nazvanih domene smrti (DD, prema engl. *death domain*) u čemu sudjeluje i skupina proteina poznatih kao DISC (prema engl. *death inducing signalling complex*). Pri tome su važne dvije domene proteina FADD (prema engl. *Fas associated death domain protein*): DD domena koja se veže na DD domenu Fas receptora te DED domena (prema engl. *death effector domain*) koja prosljeđuje transdukcijski signal vezanjem za prokaspazu 8 (113), što dovodi do njezina cijepanja i prijelaza u aktivnu formu koja pokreće kaskadnu reakciju kaspaza i razgradnju stanice (114-115).

### 2.3.2. Apoptoza utječe na razvoj autoimunih bolesti i reumatoidnog artritisa

Mnoga dosadašnja istraživanja pokazala su povezanost poremećaja apoptoze s različitim bolestima, uključujući i razvoj autoimunosti (116). Tako je disregulacija apoptoze vezana za patogenezu tumora, degenerativnih bolesti, AIDS-a (prema engl. *Acquired Immunodeficiency Syndrome*) te ishemičnih vaskularnih oštećenja. Dokazi o ulozi promjena programirane stanične smrti u razvoju autoimunih bolesti (117-118) potkrijepljeni su saznanjima o važnosti apoptotskih procesa za imunsku toleranciju studijom o defektima gena Fas-FasL sustava provedenom na animalnom modelu sistemskog lupusa (SLE, prema engl. *systemic lupus erythematosus*) (119). Mutacije gena *Fas* na mišjem modelu rezultirale su poremećajem ekspresije Fas-a, poremećajem apoptoze autoreaktivnih limfocita T, te razvojem autoimunosti (120). Smatra se da disregulacija apoptoze pridonosi razvoju sistemske autoimunosti poremećajem eliminacije autoreaktivnih T



i B limfocita (118). Nadalje, pojačana apoptoza limfocita uz oskudnije fagocitima posredovano raščišćavanje apoptotskih stanica može doprinijeti pojačanoj aktivaciji B-limfocita te posljedično pojačanoj ekspresiji autoprotutijela (121). Uopćeno, Fas-FasL sustav fiziološki održava imunu toleranciju induciranjem apoptoze s posljedičnom eliminacijom aktiviranih T i B limfocita i makrofaga (122), a njegovi poremećaji mogu rezultirati razvojem autoimunosti.

Uz poremećaj imunog odgovora, za reumatoidni artritis karakteristična je masivna sinovijalna hiperplazija koja tijekom bolesti poprima obilježja agresivnog pseudotumorskog tkiva koje invadira i razara zglobnu šupljinu. Uzokovana je masivnim priljevom i retencijom upalnih stanica te stanovitom proliferacijom lokalnih sinovijalnih stanica poput FLS.

Poznata su dva specifična patogenetska mehanizma porasta broja FLS u RA – pojačana proliferacija i otpornost na apoptozu (123). Rezultati ranijih istraživanja ističu ulogu FasL-om posredovane apoptoze u redukciji hiperplazije sinovijalnih stanica tijekom rane faze bolesti, uz mogućnost da aktivacija Fas-FasL sustava postane korisna kao terapijski pristup (124). Pojačana sinovijalna ekspresija Fas i FasL unatoč odsustvu apoptoze u sinovijalnim stanicama potvrdila je poremećaj Fas-FasL sustava u reumatoidnom artritisu (125), a smatra se da reaktivacija ovog sustava liječi RA (126). Razlozi pojavnosti stanične smrti aktivacijom Fas-FasL sustava *in vitro* u reumatoidnim FLS, uz sniženu razinu apoptoze reumatoidne sinovije *in vivo* koja vodi progresivnoj hiperplaziji FLS tijekom godina se tumačila raznim antiapoptotskim procesima, većinom vezanim za promjenu ekspresije molekula koje sudjeluju u apoptozi (127-129). Aktivacija Fas-FasL sustava, predložena kao mogućnost liječenja artritisa, proučavala se je na brojnim animalnim modelima. Pokazalo se da primjena anti-Fas antitijela inducira apoptozu te učinkovito poboljšava artritis induciran kolagenom (CIA, prema engl. *collagen-induced arthritis*) u miševa (130). Nadalje, transfer gena *FasL* putem adenovirusnog vektora ili dendritičkih stanica dovodi do remisije CIA indukcijom apoptoze T-limfocita, makrofaga i FLS (131-132). Daljnja potvrda učinaka Fas-a u reumatoidnom artritisu bila je indukcija apoptoze u FLS oboljelih anti-Fas antitijelima, pri čemu su korištena antitijela koja imitiraju membransku formu Fas liganda. Činjenica da solubilni Fas može vezanjem za FasL inhibirati Fas-FasL posredovane mehanizme u FLS, dok mFas pokazuje proapoptotsku aktivnost daje moguće objašnjenje za diskrepancu u razini apoptoze *in vitro* i *in vivo*. (126, 133). Tako je i nalaz povišenih koncentracija sFasL u sinovijalnoj tekućini oboljelih od RA, poglavito kod težih formi bolesti, ukazao da je sFasL čimbenik pogoršanja RA (124). Recentno istraživanje potvrdilo je izostanak proapoptotske aktivnosti sFasL te indukciju apoptoze FLS posredovanu mFasL-om, uz prve dokaze da solubilna forma Fas liganda stimulira proliferaciju FLS u artritisu (134). Navedeni rezultati istraživanja dovode do razvoja koncepta po kojem bi blokada sFasL mogla biti terapija izbora za liječenje RA. Objašnjenje visokih razina protuapoptotskog sFasL u serumu i sinovijalnoj tekućini oboljelih daju najnoviji rezultati pojačane ekspresija sFas i sFasL u FLS oboljelih nakon stimulacije čimbenikom tumorske nekroze  $\alpha$ , ključnim proinflamatornim citokinom u patogenezi RA (135).

### 2.3.3. Mutacije Fas-FasL sustava utječu na razvoj autoimunosti i reumatoidnog artritisa

Istraživanja na mišjim modelima ukazala su da mutacije Fas-FasL sustava mogu biti pokretači autoimunosti, što se povezuje s ulogom ovog sustava u održavanju imune tolerancije kroz indukciju apoptoze autoreaktivnih stanica (136). Ekspresija Fas-a i FasL-a promijenjena je na T i B-limfocitima oboljelih od SLE (137), što je dovelo do proučavanja polimorfizama promotorske regije pojedinih gena koji bi mogli mijenjati bazalnu ekspresiju *Fas* i *FasL*. Najprije, Wu i suradnici 1996. godine pronalaze mutaciju gena *FasL* povezanu s defektima apoptoze i predispozicijom za sistemski lupus (138). Iste godine Huang sa suradnicima opisuje polimorfizme promotorske regije gena *Fas* označene kao Fas-670 A>G i Fas-1377 G>A (139). Dvije godine kasnije utvrđena je više frekvencija GG genotipa Fas 679 A>G u australskih bolesnika s lupusom, fotosenzitivnošću i oralnim ulceracijama (140). Uslijedile su studije o povezanosti ovog polimorfizma s razvojem protutijela na ribonukleoproteine (anti-RNP, prema eng. *anti-ribonucleoproteine*) (141), zatim s razvojem lupusa što je primijećeno kod veće učestalosti A alela (141). Od polimorfizama gena *FasL* najzanimljiviji je FasL-844 T>C lociran na veznom mjestu za transkripcijski faktor koji pojačava vezanje proteina (CAAT/ *enhancer-binding protein b*), pri čemu je kod pojedinaca s C alelom u komparaciji s T alelom zamijećen značajno viši bazalni izražaj FasL-a (117). Za FasL-844 T>C primijećena je statistički značajno veća učestalost C alela kod iranskih bolesnika sa SLE (142), što odgovara prethodno definiranoj povezanosti CC genotipa i lupusa u populaciji Afroamerikanaca (89). Rezultati povezanosti polimorfizama jednog nukleotida s razvojem i tijekom SLE naveli su istraživače da sličnu povezanost analiziraju u reumatoidnom artritisu. Recentna studija iranskih autora pokazala je nešto veću učestalost TT i CT genotipa polimorfizma FasL-844 u skupini oboljelih, ali bez statističke značajnosti (143). Kobak sa suradnicima 2012. godine zaključuje da polimorfizmi Fas-670 A>G i FasL-843 C>T ne predstavljaju genetski rizik niti za predispoziciju, niti za težinu RA na uzorku 101 bolesnika turske populacije (144). Suprotno izvještava skupina autora vođena Seyfi Yildirom koja je analizirala dva polimorfizma gena *Fas* (Fas-670A>G, Fas-1377 G>A) uz dva polimorfizma gena *FasL* (FasL-844 T>C, FasL IVS2nt-124 A>G) na skupini 100 oboljelih od RA i 101 kontrole turske populacije. Nađena je statistički značajna korelacija TT i CT genotipa te T alela polimorfizma FasL-844 s predispozicijom za RA. Korelacija genotipa GG polimorfizma Fas-670 s tijekom bolesti utemeljena je na potrebi intenzivnijeg farmakološkog pristupa za postizanje remisije u GG skupini (15). Dosadašnji rezultati nameću potrebu replikacije ovakvih studija unutar različitih etničkih populacija, te proučavanje povezanosti i drugih polimorfizama vezanih za proces apoptoze na većim uzorcima s ciljem boljeg uvida u terapijske potencijale intervencije u sustav Fas-FasL .

## 2.4. Citokini u reumatoidnom artritisu

Citokini su poznati modulatori imunoloških zbivanja uključenih u patogenezu reumatoidnog artritisa. Vezanjem na specifične receptore mogu regulirati aktivaciju, proliferaciju i diferencijaciju stanica, posredovati ili regulirati imunološke reakcije, inhibirati rast stanica, djelovati citotoksično, inducirati ili inhibirati proizvodnju drugih citokina. Po funkciji su podijeljeni na proupalne i protuupalne pri čemu neravnoteža između jednih i drugih ima ulogu u indukciji autoimunosti, kroničnoj upali i konačno oštećenju zgloba (9). Makrofazi i fibroblasti sinovijalne ovojnice u RA proizvode široki spektar proupalnih citokina, uključujući IL-1, IL-6, IL-15, IL-18, TNF $\alpha$  (145), dok su imunosupresivni citokini poput TGF- $\beta$ , IL-1R, IL-10 eksprimirani u razinama nedovoljnim da zaustave sinovitis (146). Na temelju rezultata animalnih studija RA se smatra Th-1 posredovanom bolešću kroz populaciju T-limfocita koji produciraju proupalne citokine i kemokine poput IFN $\gamma$  (interferon gamma), LT $\beta$  (lymphotoxin- $\beta$ ), IL-6 i TNF (147). U novije vrijeme, također na rezultatima animalnih modela, izvršna uloga pripisuje se subpopulaciji Th-17 limfocita kroz produkciju IL-17 (148), pri čemu je njihova proliferacija i aktivacija posredovana putem IL-6, IL-23 te transformirajućeg čimbenika rasta- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (149). Također je poznato da se tijekom bolesti mijenja citokinski milje unutar zgloba. Tako se je, primjerice, pokazalo da sinovijalna tekućine oboljelih u vrlo ranoj fazi bolesti sadržava visoke razine IL-4 i IL-13 dok su kod razvijene bolesti razine ovih citokina trajno niske (150). Citokini utječu i na premećaj funkcije regulacijskih T-limfocita (151) pri čemu su za održavanje njihove funkcije ključni IL-10 i TGF- $\beta$ , dok se čimbeniku tumorske nekroze  $\alpha$  pridaje negativna uloga što je posredno dokazano činjenicom da se primjenom anti-TNF terapije inducira subpopulacija regulacijskih T-limfocita koja putem IL-10 i TGF- $\beta$  suprimira efektorske stanice i upalu (152). Unutar kompleksne citokinske mreže koja se mijenja zajedno s fazama bolesti, od proinflammatoryh citokina ističu se TNF $\alpha$  i IL-6, na čijoj se blokadi temelji suvremeno kliničko liječenje (153), te TGF $\beta$ -1 i IL-10 iz skupine antiinflammatoryh citokina.

### 2.4.1. TGF $\beta$ -1

U reumatoidnoj sinoviji eksprimirana su 4 čimbenika rasta: TGF- $\beta$ , PDGF, FGF i IGF (154). TGF $\beta$  je citokin, homodimerni protein s plejotropnim učincima u hematopoezi, angiogenezi, staničnoj proliferaciji, diferencijaciji, migraciji i apoptozi (155). Kod sisavaca postoje 3 izoforme (TGF $\beta$ -1, TGF $\beta$ -2, TGF $\beta$ -3) pri čemu je za imunološki sustav najvažniji TGF $\beta$ -1 koji produciraju limfoidne stanice (156). Studije na mišjim modelima pokazale su da mutacije TGF $\beta$ -1 gena dovode do smrtonosnih upalnih bolesti uz multiorgansku nekrozu (156), te da funkcionalno odsustvo TGF $\beta$ -1 uzrokuje akumulaciju upalnih stanica i proupalnih citokina

(TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ ) u limfoidnim organima, pojačanu produkciju antigena MHC klase I i II te deficit proliferacije hematopoetskih i endotelnih stanica (157).

Nekoliko je studija na animalnim modelima ukazalo na zaštitnu ulogu ovog citokina u razvoju reumatoidnog artritisa. Tako je intraperitonealna primjena TGF $\beta$ -1 u mišjem modelu kolagenom induciranog artritisa dovela do smanjene incidencije te blaže kliničke slike kod razvijene bolesti (158). Primjena TGF $\beta$ -1 u ranoj fazi bolesti suprimirala je razvoj artritisa (159), dok su tijekom remisije CIA sinovijalne razine TGF $\beta$ -1 i TGF $\beta$ -2 bile povišene (160). Suprotno, neke su studije na animalnim modelima ukazale na mogućnost da ponavljano injiciranje TGF $\beta$ -1 inducira zglobnu upalu i sinovijalnu hiperplaziju (161). Također se je pokazalo da je prekomjerni izražaj TGF $\beta$  na mišjim T-limfocitima povezan s diferencijacijom regulacijskih T-limfocita te štiti miševe deficijentne za IL-2 od razvoja sistemske upale i autoimunosti (162).

U ljudi, sve stanične komponente reumatoidne sinovije mogu producirati TGF $\beta$ . In vitro studije na ljudskim stanicama pokazale su da njegova imunoregulacijska uloga može biti dvojaka- inhibicija ili aktivacija čimbenika upale, ovisno o miljeu u kojem se odvijaju signalni procesi. Protuupalni učinci TGF $\beta$ -1 očituju se inhibicijom proliferacije limfocita i produkcije štetnih superoksida na makrofagima (163). Od proupalnih učinaka najvažniji su pojačana sekrecija citokina TNF $\alpha$ , IL-1, kemoatrakcija neutrofila, aktivacija ekspresije kemokina i metaloproteinaza matriksa (164), te indukcija ekspresije VEGF ključnog za angiogenezu u RA (165). U proupalne učinke ubraja se i njegovo moguće protuapoptotsko djelovanje posredovano inhibicijom ekspresije Fas-a (166). TGF $\beta$ -1 također sudjeluje u diferencijaciji T-limfocita. Uobičajeno, regulacijski T-limfociti (Tregs) razvijaju se iz timusnih CD4+ T-limfocitnih prekursora uz prisustvo TGF $\beta$  i IL-2. Pokazalo se da deficit TGF $\beta$ -1 sprječava generiranje Tregs iz prekursora *in vivo* i *in vitro* (167). Važna imunoregulacijska uloga TGF $\beta$  potvrđena je u studiji na mišjem modelu koja je pokazala signalni put kojim TGF $\beta$  štiti Tregs od apoptoze. Naime, pojačana apoptoza Tregs deficijentnih za TGF $\beta$  receptore bila je povezana s visokom ekspresijom proapoptotskih, te niskom razinom antiapoptotskih proteina. Rezultati ukazuju na ključnu ulogu TGF $\beta$  u kontroli sudbine autoreaktivnih T-limfocita s implikacijama na mehanizme T-limfocitne imunotolerancije (168). Najnovija istraživanja uloge mikrovezikula (MV) deriviranih iz neutrofila potvrdila su zaštitnu ulogu ovog citokina u reumatoidnom artritisu. Mikrovezikule su novi fiziološki mehanizam unutarstanične komunikacije putem transfera staničnih lipida i proteinskih molekula u ciljne stanice. Sinovijalne MV u RA prekomjerno izražavaju protuupalni protein aneksin A1 (AnxA1, prema engl. *annexin A1*). In vitro i in vivo pokazalo se je da mikrovezikularni AnxA1 posebnim signalnim putem dovodi do porasta ekspresije TGF $\beta$ -1 u hondrocitima te na taj način smanjuje oštećenja hrskavice (169). Istraživanja na animalnim modelima pokazala su da modulacija aktivnosti TGF $\beta$  predstavlja potencijalni terapijski zahvat u reumatoidnom zglobu, obzirom da je dokazan poremećaj aktivacije TGF $\beta$  u subhondralnoj kosti koji dovodi do oštećenja hrskavice (170).

## 2.4.2. IL-10

Interleukin-10 naziva se još i ljudski čimbenik inhibicije sinteze citokina (CSIF, prema engl. *human cytokine synthesis inhibitory factor*). Spada u skupinu protuupalnih citokina, a kodiran je genom *IL-10* (171). Signalizira putem kompleksa receptorskih proteina koji se nazivaju IL-10 receptor 1 i IL-10 receptor 2 (172). Interakcija s receptorima 1 aktivira čimbenik transkripcije STAT3 (prema engl. *signal transducer and activator of transcription 3*) dok interakcija s receptorom 2 signalizira putem tirozin kinaze naziva janus kinaza 1 (JAK1, prema engl. *janus kinase 1*) čime se regulira ekspresija mnogih citokina i interferona (primjerice IL2, IL-7, IL-9, IL-15, IL-4, IL-13, IL-6, IL-11) (172). IL-10 luči cijeli niz stanica imunološkog sustava kao što su makrofagi, pomagački T-limfociti (Th, prema engl. *T helper*), dendritičke stanice, citotoksični T-limfociti, B-limfociti, monociti i mastociti. Neke studije pokazale su da se može proizvesti iz staničnih linija ljudskih karcinoma (173-174). Učinci IL-10 su brojni, a glavna im je značajka ograničavanje upalnog odgovora kako bi se zaštitio domaćin od pretjeranog razaranja vlastitog tkiva uslijed upale (175). Jedan od glavnih učinaka je sprječavanje makrofaga i monocita da prezentiraju antigen T-limfocitima putem inhibicijskog učinka na ekspresiju MHC klase II, kostimulatornih molekula poput CD80 i CD86, čime se smanjuje ekspresija IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 i TNF $\alpha$  (176). U B-limfocitima IL-10 sprječava apoptozu, povećava proliferaciju stanica te ima ulogu izmjenjivača (*switch*) klasa imunoglobulina (177). Osim inhibicijskih učinaka, IL-10 djeluje poticajno na proliferaciju i sazrijevanje određenih subpopulacija T-limfocita, kao i antigen specifičnih B-limfocita za koje se smatra okidačem proizvodnje autoprotutijela. Mnoga dosadašnja istraživanja ukazuju na važnu ulogu IL-10 u razvoju i tijeku autoimunih bolesti (178). Uloga IL-10 dobro je istražena u eksperimentalnom artritisu. Poznato je da je razvoj životinjskog modela artritisa uzrokovanog kolagenom povezan s porastom ekspresije IL-10 na sinovijalnim stanicama i hondrocitima (179). Bolest je značajno težeg tijeka u miševa kojima nedostaje IL-10 (180). Također je poznato da terapijski primijenjen egzogeni IL-10 može suprimirati kliničke manifestacije ranog i uznapredovalog CIA, reducirati histološke pokazatelje zglobne upale, izražaj sinovijalnog TNF $\alpha$  te destrukciju zglobne hrskavice i kosti (181-182). Smanjena sinteza IL-10 kao posljedica terapijske primjene IL-12 uzrokuje progresiju zglobne upale (183). Ovakvi rezultati animalnih studija postavili su temelj za pokušaje kliničke primjene IL-10 u liječenju RA u humanoj medicini. Stanični izvori IL-10 u reumatoidnoj sinoviji su makrofagi te u manjoj mjeri T-limfociti (184). Niz istraživanja ukazao je na regulaciju citokinske mreže u kojoj IL-10 suprimira sinovijalnu upalu. *Ex vivo* istraživanja na kulturama sinovijalnog tkiva dokazala su produkciju IL-10 jednako kao i proupalnih citokina poput TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8 (185). Najprije se je pokazalo da dodavanje egzogenog TNF $\alpha$  povećava sintezu IL-10 (184). Nadalje, primjena anti-IL-10 antitijela koja neutraliziraju endogeni IL-10 dovela je do porasta ekspresije TNF $\alpha$  (184). Također je dokazano djelovanje IL-10 na



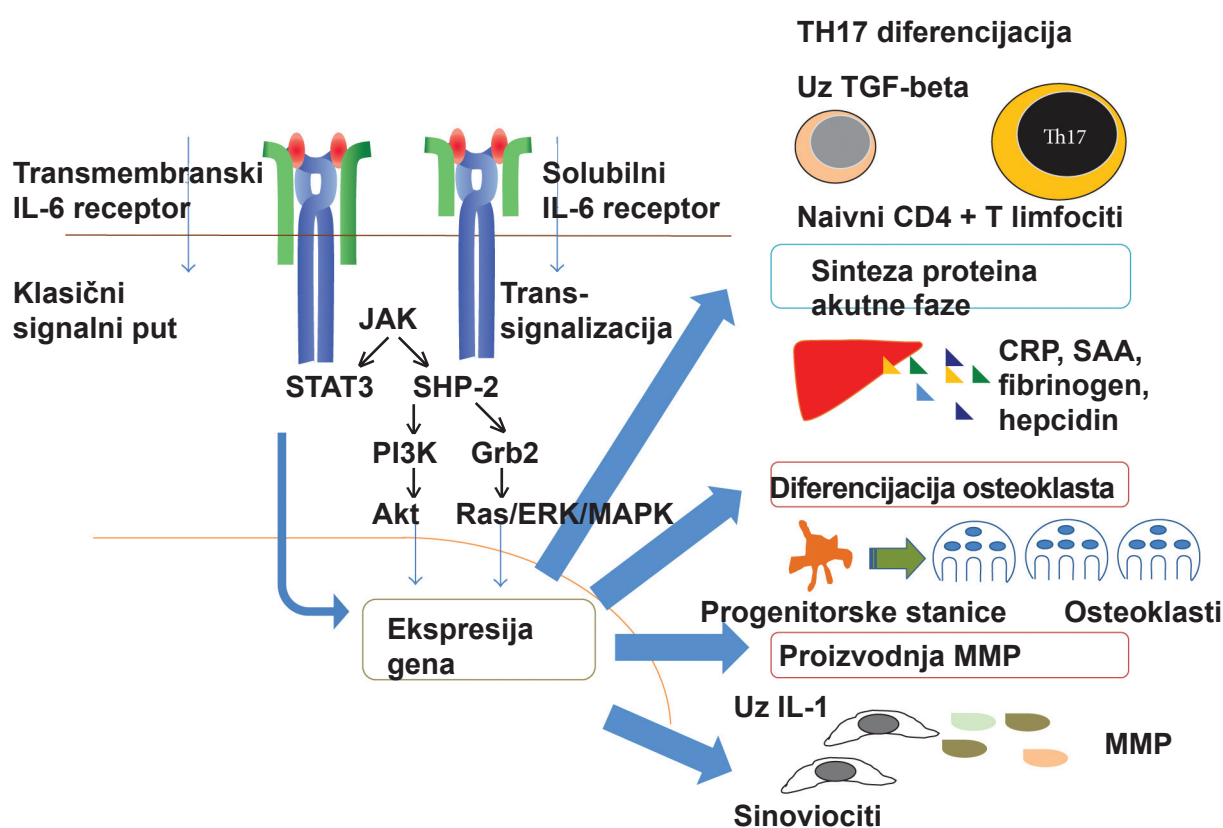
inhibiciju drugih proupalnih citokina, primjerice IL-8 (186). Stanične kulture T-limfocita izoliranih iz reumatoidnog zgloba većinom pokazuju pomoćnički fenotip Th-1 i imaju sposobnost ekspresije IL-10 (187). Nadalje, sinovijalni T-limfociti produciraju IL-10 i IFN $\gamma$  (188). Ovi su dokazi kompatibilni s mišljenjem da je RA Th-1 posredovan niz patogenetskih zbivanja. Poticanje produkcije protutijela kao imunostimulatorna uloga IL-10 u sinoviji dokazana je na kulturama sinoviocita u kojima ovaj citokin pojačava stvaranje IgM RF (189). Sinovijalna tekućina oboljelih sadrži detektabilnu razinu IL-10 mRNA i proteina (190-191) pri čemu su glavni izvor mononukleari. Dodatak IL-10 u sinovijalnu tekućinu suprimira proizvodnju proupalnih citokina u mononuklearima, uključujući TNF $\alpha$ . Pokazalo se da je srednja serumska razina IL-10 povišena u oboljelih od reumatoidnog artritisa u usporedbi s kontrolama (190) pri čemu nije u korelaciji s težinom bolesti, ali je u korelaciji s razinom RF-a. Druge su studije pokazale da je *in vivo* razina serumskog IL-10 viša u zdravih kontrola nego oboljelih od reumatoidnog artritisa, te da kod oboljelih postaje sve niža tijekom bolesti suprotno od kretanja proupalnih citokina (192). Skupina britanskih autora utvrdila je na temelju analize manje grupe ispitanika kako je sinovijalna, ali ne i serumska razina IL-10 povišena kod oboljelih u usporedbi s kontrolama, uz značajan pad sinovijalne koncentracije nakon anti-TNF terapije (193). Slične rezultate prezentira recentna studija koja je tijekom uspoređivanja dvaju laboratorijskih metoda određivanja citokina utvrdila povišenu razinu IL-10 u mononuklearima periferne krvi oboljelih od RA u usporedbi s kontrolama (194). Iako su se najprije na mišjem modelu artritisa terapija rekombinantnim IL-10, te u novije vrijeme genska terapija kojom se uz pomoću virusnih vektora mijenja ekspresija promotorske regije IL-10 gena, pokazale uspješne u regresiji upale u CIA (195), primjena rekombinantnog IL-10 u ljudskom RA dovela je tijekom kliničkih studija tek do marginalnih poboljšanja iako uz dobru ponošljivost i sigurnost (196). Kao zanimljivost važnu u perinatologiji mogu se prikazati još rezultati najnovije studije koja je pokazala da visoka razina IL-10 u trudnica oboljelih od RA jest povezana s višom porođajnom težinom, dok je visoka razina IL-6 povezana s nižom porođajnom težinom (197).

### 2.4.3. IL-6

Interleukin 6 je interleukin kodiran *IL-6* genom koji ima djelovanje proupalnog citokina i protuupalnog miokina (198). Prilikom prve identifikacije obilježen je kao čimbenik diferencijacije B-limfocita (BCDF, prema engl. *B cell differentiation factor*) odnosno čimbenik 2 stimulacije B-limfocita (BSF-2, prema engl. *B cell stimulatory factor 2*) što je topljivi čimbenik koji inducira diferencijaciju aktiviranih B-limfocita u limfocite koji produciraju antitijela (199-200). Ekspimiraju ga makrofagi i T-limfociti s ciljem stimulacije imunog odgovora primjerice tijekom infekcije ili traumatskog oštećenja tkiva. IL-6 je važan u obrani od infekcije, što potvrđuje i neadekvatan imunološki odgovor na streptokoknu

pneumoniju kod miševa deficijentnih za gen *IL-6* (201). Proizvode ga još stanice glatkih mišića u tunici mediji mnogih krvnih žila u kojima također djeluje proupalno i osteoblasti za stimulaciju formacije osteoklasta. IL-6 je važan medijator vrućice i akutnog upalnog odgovora. U hipotalamusu, nakon prolaska kroz krvno-moždanu barijeru, inicira sintezu prostaglandina E2 čime se mijenja tjelesna temperatura (202). U mišićima i masnom tkivu stimulira mobilizaciju energije koja također dovodi do porasta tjelesne temperature. Odgovoran je za stimulaciju sinteze proteina akutne faze upale i sazrijevanje neutrofila u koštanoj srži (203). Ekspimiraju ga adipociti te je povezan s povišenom razinom CRP-a kod pretilih (204). Makrofagi mogu lučiti IL-6 kao odgovor na specifične mikrobne molekule koje nazivamo molekularnim uzorcima vezanim za patogen (PAMP, prema engl. *pathogen-associated molecular patterns*). PAMP vezanjem na posebnu skupinu receptora PRR (prema engl. *pattern recognition receptors*) u koju spadaju primjerice i Toll-like receptori (TLR) pokreću unutarstaničnu signalnu kaskadu što rezultira ekspresijom proupalnih citokina. IL-6 počinje signalizaciju vezanjem za transmembranski receptor IL-6R. Kompleks interleukina i receptora potom se povezuje s transmembranskom proteinskom molekulom za transdukciju signala gp130 (prema engl. *glycoprotein 130*) što aktivira kaskadu signalnih događaja posredovanih intracelularnom nereceptorskom tirozin kinazom naziva janus kinaza (JAK). Aktivacija IL-6→IL6R→gp130→JAK poznata je kao klasični signalni put (205). Transmembranski IL-6R ekspimiran je na malom broju tipova stanica kao što su hepatociti i neki leukociti, dok je gp130 ekspimiran na različitim stanicama. Topljiv oblik IL-6R (sIL6R, prema engl. *soluble IL6R*) kojemu nedostaje citoplazmatska regija ima za IL-6 jednak afinitet kao i IL-6R; kompleks IL-6-sIL-6R također se može vezati za gp130 i pokrenuti signalnu kaskadu. Ova aktivacija IL-6→sIL-6R→gp130 naziva se transsignalizacijom. Smatra se da je upravo transsignalizacijski put zaslužan za proupalne aktivnosti IL-6, dok je klasičan signalizacijski put pokazao ulogu u regenerativnim i protuupalnim zbivanjima (206). JAK je nereceptorska tirozin kinaza čija fosforilacija inducira aktivaciju signalnog prijenosnika i transkripcijakog aktivatora 3 (STAT3, prema engl. *signal transducer and activator of transcription 3*) i hiperfosforilaciju mitogenom aktiviranih protein kinaza (MAPK) (207). Ovakva hiperfosforilacija aktivira MAPK najprije fosforilacijom tirozina 759 (Y759) unutar gp130 za što je potrebna fosforilacija određenih tirozina (Y767, Y814, Y904, Y915) koji se susreću unutar kratkog peptida iz gp130 označenog kao motiv YXXQ (pri čemu je Y oznaka za tirozin, X za bilo koju aminokiselinu, a Q za glutamin). STAT3 potom stimulira ekspresiju nekoliko gena uključenih u stanični rast i diferencijaciju (208). MAPK također aktivira nekoliko čimbenika transkripcije povezanih sa sintezom proteina akutne faze i staničnim rastom. JAK inducira fosforilaciju fosfoinozitol-3 kinaze (PI3K, prema engl. *phosphoinositol-3 kinase*) što rezultira aktivacijom trećeg signalnog puta interleukina 6 koji se naziva put protein-kinaze B (PKB ili Akt, prema engl. *protein kinase B*) (209). Aktivirana PKB/Akt potom fosforilira nekoliko ciljnih molekula što promovira preživljene i rast stanica (210).

Uloge IL-6 u imunoregulaciji su slijedeće: Produkcija antitijela (211), kontrola proliferacije i otpornosti T-limfocita na apoptozu porastom ekspresije IL-2 i aktivacijom STAT3, promocija diferencijacije Th2 pomoćničkih limfocita putem regulacije nuklearnog čimbenika aktiviranih T-limfocita (NFAT)c2 i c-maf (212). Nadalje, u prisustvu TGFβ IL-6 potiče diferencijaciju Th17 pomoćničkih limfocita STAT3 posredovanom ekspresijom receptora RORγt (prema engl. *retinoid orphan receptor*) te suprimira diferencijaciju regulacijskih T-limfocita (213-214). Nadalje, IL-6 indukcijom ekspresije IL-8, kemokina i adhezijskih molekula na lokalnoj, zglobnoj razini dovodi do destrukcije (215). Sinovijalne stanice produciraju IL-6, koji i sam inducira proliferaciju sinoviocita, te diferencijaciju osteoklasta preko RANKL receptora (prema engl. *receptor activator of NF-kappa B ligand*) što može dovesti do osteoporoze (216). Zajedno s IL-1, IL-6 potiče sintezu metaloproteinaza matriksa u sinoviocitima što ponovno vodi destrukciji zgloba. U sinovijalnim fibroblastima IL-6 inducira pojačanu produkciju VEGF što vodi angiogenezi te vaskularnoj permeabilnosti (217).



**Slika 3.** IL-6 aktivira signalni put vezanjem gp130 za transmembranski ili solubilni IL-6 receptor. IL-6 pokreće IL-6 signalni put vezanjem za transmembranski ili solubilni IL-6 receptor. Nastaje kompleks koji inducira homodimerizaciju gp130, što vodi aktivaciji signalnog sustava. Čimbenici transkripcije uključujući STAT3 aktiviraju ekspresiju različitih gena, što rezultira proliferacijom i diferencijacijom stanica. JAK: Janus kinaze; STAT3: engl. *signal transducer and activator of transcription 3*; SHP-2: SH2 domena koja sadrži tirozin (engl. *domain-containing tyrosine*), SAA: serumski amiloid A. Adaptirano prema Yoshida i Tanaka (218).



Patofiziološka uloga IL-6 dokazana je u nekoliko različitih animalnih modela artritisa. U CIA aktivirani T-limfociti pojačano produciraju Th1 i Th17 citokine, dok su u miševa deficijentnih za gen *IL-6* suprimirani i simptomi bolesti i Th17 citokini (219). Blokada IL-6 primjenom mišjeg anti-IL-6R protutijela suprimirala je proliferaciju T i B-limfocita (220). I u drugim animalnim modelima artritisa deficijencija gena *IL-6* ili blokada interleukina 6 ublažila je težinu artritisa (221-222). U ljudi s RA razine IL-6 povišene su kako u serumu tako i u sinovijalnoj tekućini (223), pri čemu koncentracije koreliraju s težinom bolesti. Postizanjem farmakološke remisije bolesti bilo konvencionalnim bilo anti-TNF lijekovima dovodi do redukcije razine IL-6 (224). Grupa autora pokazala je korelaciju serumske razine IL-6 s radiološkom progresijom bolesti (192). Nadalje, noviji rezultati pokazali su povišene razine IL-6 i u serumu i u mononuklearima periferne krvi oboljelih mjerene dvjema komparabilnim metodama (194). Da IL-6 ima ulogu u upali općenito, te da nije specifičan za bolest, predloženo je na temelju rezultata studije koja je pokazala povišene razine mnogih citokina kao što su IL-2, IL-4, IL-8, TNF $\alpha$  ali ne i IL-6 u sinovijalnoj tekućini oboljelih. Pri tome su bolesnici koji nisu dosegli remisiju TNF $\alpha$  inhibicijom bili oni čija je preterapijska razina IL-6 bila visoka (193). Isti je rad pokazao da primjena anti-TNF $\alpha$  lijekova u RA ne modulira citokinski profil oboljelih, osim razine IL-6 koja pada 12 tjedana nakon primjene ove terapije. Na temelju uloge IL-6 u RA razvijena je terapija ove bolesti primjenom monoklonskog protutijela na IL-6R koja je u kliničkoj uporabi od 2009 godine (225).

#### 2.4.4. TNF $\alpha$

Čimbenik tumorske nekroze, TNF $\alpha$  ili kahektin stanični je signalni protein uključen u sustavni upalni odgovor. Jedan je od ključnih citokina u upalnoj reakciji akutne faze. Ekspimiraju ga u najvećoj mjeri aktivirani makrofagi, ali i druge stanice kao što su CD4<sup>+</sup> limfociti, NK stanice, neurofilii, mastociti, eozinofili i neuroni (226). Najvažnija je uloga ovog citokina imunoregulacija. Može inducirati vrućicu, programiranu staničnu smrt, kaheksiju, upalu te inhibirati tumorigenezu i replikaciju virusa. Sudjeluje u upalnom odgovoru tijekom sepe aktivacijom makrofaga i regulacijom adhezijskih molekula (227). Signalizacija se odvija putem receptora TNFR1 koji je ekspimiran u većini stanica te vezuje obje- membransku i solubilnu formu TNF $\alpha$ ; TNFR2 je ekspimiran u stanicama imunološkog sustava i vezuje se za membransku formu TNF $\alpha$  (228). Vezanje TNF $\alpha$  sa TNFR dovodi do konformacijskih promjena uslijed kojih se iz unutarstaničnih DD (prema engl. *death domain*) oslobađa inhibicijski protein SODD, nakon čega se protein koji sudjeluje u transdukciji signala TRADD (prema engl. *Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein*) vezuje za DD stvarajući platformu za daljnje vezanje proteina. Nakon ovog slijeda moguća je inicijacija jednog od tri signalna puta (229-230).

1. Aktivacija NF- $\kappa$ B slijedom signalnih molekula dovodi do porasta transkripcije niza proteina uključenih u stanični ciklus i proliferaciju te upalni odgovor. Ovaj put ima antiapoptotsko djelovanje.

2. Aktivacija MAPK (prema engl. *mitogen-activated protein kinases*) što dovodi do aktivacije JNK (prema engl. *c-Jun N-terminal kinase*) koja se translocira u jezgru te aktivira čimbenike transkripcije koji reguliraju diferencijaciju i proliferaciju stanica. Ovaj put ima proapoptotsko djelovanje (231).

3. Signalizacija stanične smrti pri čemu TRADD vezuje FADD što dovodi do aktivacije kaspaze 8. Slijedi autoproteolitička aktivacija efektorskih kaspaza i stanična smrt odnosno apoptoza (232).

Razine TNF $\alpha$  povišene su u oboljelih od RA u serumu i sinovijalnoj tekućini (193). Važnu ulogu TNF $\alpha$  u RA potvrđuje i činjenica da je anti-TNF $\alpha$  terapija (infliksimab, etanercept, adalimumab, golimumab, certolizumab) trenutno najučinkovitije liječenje upale i koštanog oštećenja u reumatoidnom artritisu. Posljedica je to višestrukog djelovanja ovog citokina na različite stanice u reumatoidnom artritisu. Najviše se značaja pridaje njegovu djelovanju na T-limfocite, makrofage, FLS i resorpciju kosti (233).

#### 2.4.4.1. TNF $\alpha$ djeluje kemoatrakcijski na T-limfocite u artritisu

Organizacija upalnih stanica koje infiltriraju sinoviju u mikrookolišu artritisa podsjeća na sekundarne limfoidne organe i uključuje prisustvo CD4<sup>+</sup> limfocita (234), pri čemu je za organizaciju prisustvo T-limfocita i njihovu interakciju s antigen prezentirajućim stanicama neophodno prisustvo kemokina (235). TNF $\alpha$  ima važnu ulogu u ovakvoj organizaciji (236) zbog svoje kemoatrakcijske uloge za različite tipove stanica uključujući T-limfocite (237). *In vitro* te *ex vivo* pokusima Rossol i suradnici dokazali su da je prisustvo TNF $\alpha$  neophodno za migraciju CD4<sup>+</sup> T-limfocita u upalno područje zgloba s artritisom (238) pri čemu je migracijski stimulus interakcija citokina sa svojim receptorom TNFR1 te je ovisan o koncentraciji TNF $\alpha$ .

#### 2.4.4.2. Učinak TNF $\alpha$ na makrofage i FLS u artritisu

Postupna sinovijalna upala u RA postaje kronična uz djelovanje mnogih upalnih medijatora među kojima je ključan TNF $\alpha$ . Za održavanje prolongirane sinovijalne upale ističe se uloga makrofaga i FLS (239). TNF $\alpha$  posreduje tranzitornu aktivaciju makrofaga, dok su FLS

odgovorni za prolongiranu sinovijalnu upalu (2). Smatra se da makrofagi nakon početne promocije upale potiču protektivne mehanizme regeneracije tkiva kako bi se uklonile lokalne i sustavne posljedice visokih razina upalnih medijatora (240). FLS, koje fiziološki nisu izložene stranim antigenima već čine mehaničku barijeru sinovije (241) nemaju mehanizme kontrole svoje aktivacije u RA što u konačnici dovodi do prolongirane sinovijalne upale. Mehanizme održavanja ovakve prolongirane upale objasnio je Lee sa suradnicima (242) u istraživanju koje je pokazalo da nakon što TNF $\alpha$  inducira aktivaciju FLS dolazi do nekontrolirane NF-kB signalizacije te posljedično hiperprodukcije citokina, kemokina, metaloproteinaza u duljem periodu i perzistentne sinovijalne upale. Drugim riječima, aktivacija FLS posredovana s TNF $\alpha$  doprinosi kroničnoj upali u RA. Ovo je istraživanje također pokazalo postojanje inhibicije upalnog odgovora posredovane signalnim molekulama (primjerice STAT-3) samo na makrofagima, ali ne i na FLS, te učinak TNF $\alpha$  na pojačanu produkciju proupalnog IL-6 u FLS pojačanjem ekspresije promotorske regije njegovog gena.

#### 2.4.4.3. Učinak TNF $\alpha$ na resorpciju kosti

Uloga ovog citokina u koštanoj pregradnji manifestira se diferencijacijom, sazrijevanjem i aktivacijom osteoklasta kroz pojačanje signalnih mehanizama transmembranskog proteina RANK-a (prema engl. *Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa$  B*) (243), a prisutan je i mehanizam TNF-ovisne sekrecije citokina M-CSF-a (prema engl. *macrophage colony-stimulating factor*) od strane stromalnih stanica koštane srži, što potiče osteoklastogenezu puno učinkovitije nego direktna stimulacija osteoklastnih prethodnika putem TNF $\alpha$  (244). Nadalje, ovaj proupalni citokin je snažan poticatelj izražaja Dkk1 (prema engl. *Dickkopf-related protein 1*), odnosno antagonista Wnt, čime pozitivno djeluje na osteoklastogenezu povećavajući omjer RANKL/OPG (245). U modelu ljudskog TNF transgeničnog miša, TNF $\alpha$  povećava broj CD11b-pozitivnih osteoklastnih prethodnika, učinak koji je neovisan od RANKL-a, ali je za njihovu diferencijaciju u zrele osteoklaste potrebna prisutnost RANKL-a (246). Važnost TNF- $\alpha$  u oštećenju kosti u artritisu je dokazana u nekoliko različitih mišjih modela artritisa : *In vivo*, ljudski TNF transgenični miševi razvijaju teški artritis s kroničnom sinovijalnom upalom, destrukcijom hrskavice i sistemskim i lokalnim gubitkom kosti (247). U artritisu potaknutom kolagenom primjena TNF-neutralizirajućih protutijela smanjuje aktivnost bolesti i oštećenje kosti (248). TNF $\alpha$  utječe i na osteoblaste inhibicijom njihove diferencijacije i sazrijevanja, uz zapaženo smanjenje izražaja AP i OC (249-250). *In vitro*, dodatak TNF- $\alpha$  u preosteoblastne stanične kulture rezultira supresijom ključnog transkripcijskog faktora osteoblasta, Runx2 (251), te također dovodi do apoptoze preosteoblastnih staničnih linija (252).

### 3. ISPITANICI I METODE

#### 3.1. Ispitanici

Istraživanje je uključivalo 93 bolesnika koji boluju od reumatoidnog artritisa te 105 ispitanika u kontrolnoj skupini kojima je kliničkom obradom isključeno upalno zbivanje, u dobi od 65 (52-72) (medijan s donjom i gornjom kvartilom), oba spola srazmjerno većoj učestalosti bolesti u žena, koji se liječe od RA i dolaze poglavito iz grada Zagreba i okolice. Osnovne demografske karakteristike ispitanika i klinička obilježja aktivnosti RA za skupinu oboljelih prikazani su u tablici 1. Nije bilo statistički značajne razlike između skupina u dobi i spolu. Medijan dobi skupine oboljelih bio je 62,5 godina (48-72 (donja - gornja kvartila)), a kontrolne skupine 66 god. (58-72) ( $p > 0.05$ . testom po Mann Whitneyu). Obzirom na veću pojavnost reumatoidnog artritisa u žena očekivano je zabilježen veći udio ženske populacije u skupini oboljelih. Stoga smo i u kontrolnu skupinu uključili razmjerno veći broj žena te se skupine nisu statistički značajno razlikovale po spolu ( $p > 0.05$ ,  $\chi^2$ -testom) (Tablica 1).

**Tablica 1.** Osnovna demografska i klinička obilježja ispitanika

Obilježje	Kontrolna skupina	Reumatoidni artritis
broj pacijenata	105	93
dob, godine <sup>a</sup>	62,5 (48-72)	66 (58-72)
spol		-
muški	20 (19%)	9 (9,7%)
ženski	85 (81%)	84 (90,3%)
DAS28 <sup>a</sup>	-	5,95 (4,87-6,69)
Anti-CCP <sup>a</sup>	-	50,65 (1,85-257)
RF <sup>a</sup>	-	76,35 (15-239)
CRP <sup>a</sup>	-	10 (4,6-24,3)
SE <sup>a</sup>	-	27 (20,5-39)

<sup>a</sup> podatci prikazuju medijan, donju i gornju kvartilu

RF – reumatoidni faktor

anti-CCP – anticitrulinska protutijela

CRP – C reaktivni protein,

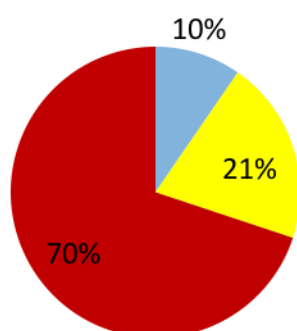
SE – sedimentacija eritrocita

Nitko od oboljelih nije bio liječen biološkim lijekovima (anti-TNF $\alpha$ ), već konvencionalnim lijekovima koji mijenjaju tijek bolesti (DMARD-disease modifying antirheumatic drugs) prema smjernicama EULAR-a (European League Against Rheumatism) i Hrvatskog reumatološkog društva (HRD).

U trenutku ulaska u studiju većina oboljelih pacijenata (69,9%) je bila u vrlo aktivnoj fazi bolesti (DAS28>5,1), dok ih je 20,5 % bilo u umjereno aktivnoj fazi bolesti (DAS28 veći od 3,2, a manji od 5,1), a 9,6% ih je imalo slabo aktivnu bolest (DAS28<3,2) (Slika 4.).

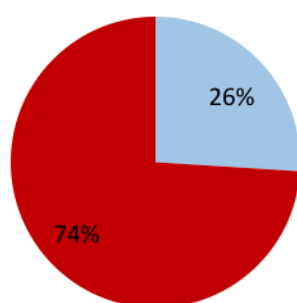
### aktivnost RA

■ slabo aktivna bolest ■ umjereno aktivna bolest ■ vrlo aktivna bolest



### seropozitivnost

■ seronegativni ■ seropozitivni

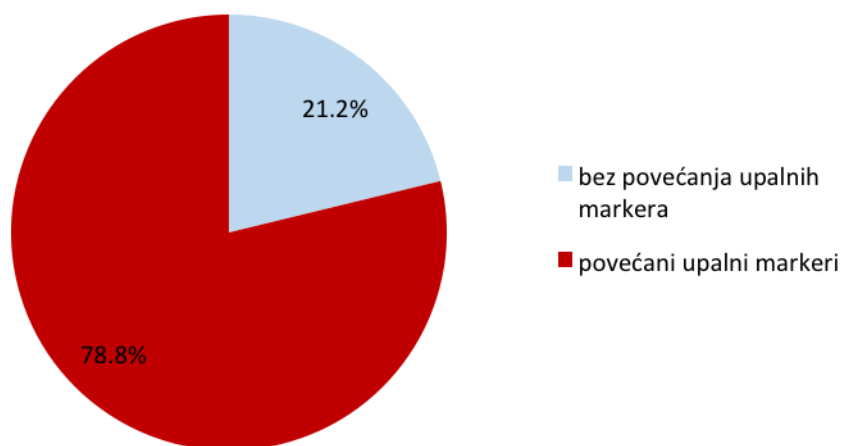


**Slika 4.** Udio bolesnika oboljelih od RA prema aktivnosti bolesti i seropozitivnosti.

**A)** Aktivnost bolesti je određena računanjem DAS28 skora. Bolesnici sa slabo aktivnom bolesti su oni kojima je DAS28 bio manji od 3,2, bolesnicima s umjereno aktivnom bolesti je DAS28 bio između 3,2 i 5,1, a bolesnicima s vrlo aktivnom bolešću veći od 5,2.

**B)** Seropozitivnim su se smatrali bolesnici kojima je izmjeren povećan titar reumatoidnog faktora (RF>15,9) ili anticitrulinskih protutijela.(accp>10).

Seropozitivnih pacijenata, to jest onih s povišenim titrom RF ili anticitrulinskih protutijela bilo je 74%, a seronegativnih 26% (Slika 4. B). Analiza upalnih biljega pokazala je kako je 78,8% pacijenata oboljelih od RA imalo povećanu koncentraciju CRP ili veću brzinu SE, dok ih 21,2 % nije imalo povećane upalne biljege (Slika 5.).



**Slika 5.** Udio bolesnika oboljelih od RA prema razini upalnih biljega SE i CRP.

Crvenom bojom je prikazan postotak bolesnika oboljelih od RA koji su imali povećane upalne biljege (SE>25 mm/h ili CRP >5 mg/L), a plavom postotak bolesnik oboljelih od RA bez povećanja upalnih biljega.

SE – sedimentacija eritrocita

CRP – C reaktivni protein

Uzorci periferne krvi uzimani su bolesnicima koji se liječe od reumatoidnog artritisa na Odjelu za kliničku imunologiju i reumatologiju, KB Sveti Duh Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Kontrolna skupina ispitanika bili su bolesnici zaprimljeni u bolnicu zbog provođenja postupka testiranja preosjetljivosti na lijekove, bez povijesti zglobnih bolesti kojima je obradom isključeno upalno stanje te kojima je tijekom testiranja isključena i preosjetljivost na lijekove. Uzorci krvi, volumena 4-6 ml, uzimani su svim ispitanicima dodatno tijekom standardne kliničke obrade. Uzorci periferne krvi uzeti su iz kubitalne vene u epruvete s EDTA antikoagulansom. Svi ispitanici su potpisali informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju, a istraživanje se je provodilo prema odobrenju Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i KB Sveti Duh Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Dijagnoza reumatoidnog artritisa postavljena je po kriterijima EULAR 2010 (253).

### 3.1.2. Klinički podatci

Za bolesnike koji boluju od reumatoidnog artritisa bilježeni su rezultati dobiveni laboratorijskom obradom – razina reumatoidnog faktora (u mjernoj jedinici IU/ml), određena pomoću imunonefelometrijske metode na instrumentu BN ProSpec (Siemens, Minhen, Njemačka), te razina antitijela na citrulinirane peptide (u mjernoj jedinici IU/mL), određena metodom kapsuliranog hidrofilnog polimernog prijenosnika imunoesejem fluorescentnog enzima (CAP-FEIA, prema engl. *capsulated hydrophilic carrier polymer fluorescent enzyme immunoassay*) na instrumentu EliA (Phadia, Uppsala, Švedska) te je aktivnost bolesti procjenjena prema vrijednosti DAS28 (prema engl. *Disease Activity Score of 28 Joints*) bodovne ljestvice.

Najšire upotrebljavan indikator aktivnosti RA je vrijednost DAS28 koji se također koristi i u praćenju odgovora na terapiju (254). Zglobovi uključeni u ovu bodovnu ljestvicu jesu (bilateralno): proksimalni interfalangealni zglobovi (deset zglobova), metakarpofalangealni zglobovi (deset), ručni zglobovi (dva), lakatni zglobovi (dva), ramena (dva) i koljena (dva). Prilikom reumatološkog pregleda u obzir se uzimaju i bolnost na palpaciju (TEN28-prema engl. *tenderness upon touching*) i otečenost zglobova (SW28-prema engl. *swelling*). Dodatno se određuje sedimentacija eritrocita (ESR-prema engl. *Erythrocyte sedimentation rate*; mm/h, određena prema Westergren metodi). Bolesnik također bilježi subjektivnu procjenu (SA-prema engl. *subjective assessment*) aktivnosti bolesti u proteklih 7 dana na skali od 0 do 100 pri čemu 0 znači da nema aktivnosti a 100 označava najvišu moguću aktivnost. Nakon određivanja ovih parametara DAS28 računa se prema navedenoj formuli:

$$DAS28 = 0.56 \times \sqrt{TEN28} + 0.28 \times \sqrt{SW28} + 0.70 \times \ln(ESR) + 0.014 \times SA$$

### 3.2. Izolacija DNA

DNA je izolirana iz 250  $\mu$ L uzorka pune krvi pomoću komercijalnog kita PureLink Genomic DNA (Invitrogen by hermo Termo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) prema protokolu proizvođača. Ukratko, prvo su pripremljeni lizati iz 200  $\mu$ L pune krvi, koji su dodani u sterilnu epruvetu za mikrocentrifugu; potom je uzorku dodano 20  $\mu$ L Proteinaze K. Uslijedilo je dodavanje 20  $\mu$ L RNase A, miješanje kratkim vorteksiranjem, te inkubiranje na sobnoj temperaturi kroz 2 minute. Slijedio je dodatak 200  $\mu$ L PureLink® Genomic Lysis/Binding pufera te dobro miješanje vorteksiranjem kako bi se dobila homogena otopina. Radi ubrzanja digestije proteina tijekom 10 minuta ta je otopina inkubirana u vodenoj kupelji na



55°C. U nastavku je dodano 200 µL 96% etanola lizatu te dobrim miješanjem vorteksiranjem kroz 5 sekundi zbog dobivanja homogene smjese.

Lizat je smješten u stupac za vezanje DNA (PureLink® Spin Column) umetnut u tubicu za skupljanje ostataka. Potom je uslijedilo centrifugiranje stupca kroz 1 minutu na 10000xg pri sobnoj temperaturi. Odvojena je korištena tubica za skupljanje te stupac za vezanje smješten u novu tubicu za skupljanje.

Stupac je ispran s 500 µL pufera za ispiranje pripremljenog s etanolom. Potom je stupac centrifugiran na 10000xg kroz 1 minutu na sobnoj temperaturi. Izdvojena je korištena tubica za skupljanje ostataka te je stupac smješten u novu tubicu. Stupac je potom ispran s 500 µL pufera za ispiranje pripremljenog s etanolom. Uslijedilo je centrifugiranje stupca maksimalnom brzinom kroz 3 minute pri sobnoj temperaturi, te odvajanje tubice za skupljanje ostataka.

Stupac je postavljen u sterilnu 1,5 ml tubicu te je potom izdvojena DNA koristeći 30 µL PureLink® Genomic pufera za izdvajanje. Nakon jednogminutne inkubacije stupaca pri sobnoj temperaturi uslijedilo je njihovo centrifugiranje maksimalnom brzinom tijekom jedne minute, također pri sobnoj temperaturi. Tubica je sadržavala pročišćenu gDNA (genomsku DNA), koja je potom uskladištena na -20°C do daljnje analize.

### 3.3. Izolacija plazme

Na 4mL otopine Histopaq (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD) nadodano je 4mL pune krvi te je potom uzorak centrifugiran u gradijentu fikola 20 minuta na 2000g na sobnoj temperaturi. Potom je uzet 1mL supernatanta plazme te pohranjen na -20°C za daljnju analizu.

### 3.4. Genotipizacija

Izolirana genomski DNA analizirana je na uređaju za lančanu reakciju polimerazom u stvarnom vremenu PCR ABI PRISM 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Polimorfizam gena *FOXO3* (rs12212067) i *FasL* (s763110) određivan je pomoću seta kemikalija TaqMan Assay (Applied Biosystems) prema uputama proizvođača. TaqMan Assay sastoji se od para specifičnih početnica i probe koja na 5' kraju ima fluorescentnu boju 6-FAM ili VIC, a na 3' kraju prigušivač fluorescencije (NFQ, prema engl. *nonfluorescent quencher*). Proba se veže na cDNA između početnica, a produljenjem početnice, DNA polimeraza cijepa probu i odvaja fluorescentnu boju od NFQ što dovodi do porasta fluorescencije sa svakim novim



ciklusom odnosno svakim stvarnim produljenjem. Za svaki gen korištena su dva seta, s istim početnicama i po dvije probe (označene različitim fluorescentnim bojama) od kojih je svaka specifična za određenu mutaciju tj. polimorfizam. Svaka reakcija napravljena je u duplikatu. Konačni reakcijski volumen za PCR bio je 10 $\mu$ l, koji je sadržavao 1 $\mu$ l 10 ng/ $\mu$ l genomske DNA, 5  $\mu$ l TaqMan univerzalne reakcijske smjese, 0.5  $\mu$ l 200 nM VIC/FAM-označenih proba te 3.5  $\mu$ l redestilirane vode. Za *FOXO3* SNP rs12212067, korištena je proba C\_\_30780203\_10, sekvence GTTCCCTAAATGCTTTTTAAGGGGG[G/T]ATAGCTGAATACTTGACTGGTCATT. Za *FasL* SNP rs763110, korištena je proba C\_\_3175437\_10, sekvence GCAAACAATGAAAATGAAAACATTG[C/T]GAAATACAAAGCAGCTCTGTGGGTT.

Amplifikacija je rađena u pločicama s 96-jažica s pozitivnim i negativnim kontrolama. Uvjeti reakcija bili su: Uzorci izolirane genomske DNA, set TaqMan Assay (s dvije fluorescentne probe) i set kemikalija za PCR (TagMan Genotyping Master Mix) prvo su bili inkubirani tijekom 2 minute na 50 °C kako bi se aktivirao enzim uracil N-glikozilaza, a potom 10 minuta na +95 °C da bi se uracil N-glikozilaza inaktivirala, a aktivirala DNA polimeraza. Potom je slijedilo 40 ciklusa tijekom kojih su se uzorci inkubirali na: 95 °C 15 s i 60 °C 60s. Postojanje polimorfizma analizirano je kao odnos dvije fluorescencije, tako da je za homozigotni *FOXO3* slijeda GTTCCCTAAATGCTTTTTAAGGGGGATAGCTGAATACTTGACTGGTCATT utvrđena fluorescencija samo boje FAM, a fluorescencija boje VIC detektirana je u uzorcima homozigotima slijeda GTTCCCTAAATGCTTTTTAAGGGGGTATAGCTGAATACTTGACTGGTCATT, dok je za homozigotni *FasL* slijeda GCAAACAATGAAAATGAAAACATTGCGAAATACAAAGCAGCTCTGTGGGTT utvrđena fluorescencija samo boje FAM, a fluorescencija VIC detektirana je u uzorcima homozigotima slijeda GCAAACAATGAAAATGAAAACATTGTGAAATACAAAGCAGCTCTGTGGGTT. Uzorci u kojima su utvrđene obje fluorescencije sadržavali su heterozigotnu DNA.

### 3.5. ELISA

Koncentracije citokina IL-10 i TNF $\alpha$  (Quantikine High Sensitivity Immunoassay, R&D systems, Minneapolis, MN, USA) u plazmi, određivane su prema uputama proizvođača ELISA (prema engl. *enzyme linked immunosorbent assay*) kitova.

Ukratko, svi reagensi su prije upotrebe stavljeni na sobnu temperaturu. Dodano je 100 ml koncentrata pufera za ispiranje destiliranoj radi pripremanja 1000 ml pufera za ispiranje. Potom je rekonstituiran liofilizirani supstrat s 6.0 ml supstratnog razrjeđivača 10 minuta prije upotrebe.

Rekonstitucija liofiliziranog pojačivača učinjena je s 6.0 ml pojačivačkog razrjeđivača 10 minuta prije upotrebe. Rekonstitucija standarda za humani TNF $\alpha$  i IL10 provedena je s pomoću kalibracijske otopine za razrjeđivanje, čime je dobivena zaliha otopina s 32 pg/mL. Standard je odstajao kroz najmanje 15 minuta uz pažljivo protresanje prije pravljenja otopine. Korištene su polipropilenske tubice. Pipetirano je 500  $\mu$ L kalibracijske otopine za razrjeđivanje u svaku tubicu. Zaliha otopina korištena je u proceduri razrjeđivanja. Nerazrijeđeni standard služio je kao gornji standard (32 pg/mL). Kalibracijska otopina za razrjeđivanje služila je kao nulti standard (0 pg/mL).

Svi standardi i uzorci bili su testirani u duplikatu. Dodano je 50  $\mu$ L testne otopine za razrjeđivanje u svaki zdenac. Potom je u svaki zdenac stavljeno 200  $\mu$ L standarda, uzorka ili kontrole, uslijedilo je pokrivanje s ljepljivom trakom i inkubacija kroz 3 sata na sobnoj temperaturi.

Tekućina iz zdenaca otklonjena je preokretanjem pločice i izlivanjem sadržaja, te sušenjem tapkanjem po papirnatom ručniku.

Potom je svaki zdenac napunjen s 400  $\mu$ L pufera za ispiranje, nakon čega je uslijedilo uklanjanje tekućine iz zdenaca preokretanjem ploče i izlivanjem sadržaja. Ovaj je postupak ponavljan ukupno 6 puta. Nakon posljednjeg ispiranja osušena je preokrenuta pločicu tapkanjem po čistom papirnatom ručniku kako bi se uklonio višak pufera za ispiranje.

Dodano je 200  $\mu$ L ljudskog TNF $\alpha$  ili IL-10 konjugata u svaki zdenac. Ploča je pokrivena ljepljivom vrpcom te inkubirana kroz 2 sata na sobnoj temperaturi. Ponovljen je postupak ispiranja. Potom je dodano 50  $\mu$ L otopine supstrata u svaki zdenac. Sadržaj je pokriven ljepljivom trakom te inkubiran kroz 1 sat na sobnoj temperaturi. Uslijedilo je dodavanje 50  $\mu$ L pojačivačke otopine u svaki zdenac kako bi otopina pokrenula razvoj boje. Ponovno je uslijedilo pokrivanje ljepljivom trakom te inkubiranje kroz 30 minuta na sobnoj temperaturi. Dodano je 50  $\mu$ L zaustavne otopine u svaki zdenac.

Optička gustoća određivana je unutar 15 minuta na mikropločnom čitaču (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) postavljenom na 490 nm. Titar svakog antitijela određen je u relativnim jedinicama prema standardnoj krivulji dobivenoj očitanjem serijskih razrjeđenja standardnog uzorka.

### **3.6. Statistička analiza**

Rezultati su statistički analizirani tako da je najprije testirana raspodjela pojedinih varijabli (učestalost polimorfizama, koncentracije citokina) Kolmogorov–Smirnov testom, a s obzirom da je potvrđeno kako distribucija nije normalna korišteni su neparametrijski testovi. Podatci su prikazani kao medijan sa inter-kvartilnim rasponom.

Određene su potencijalne razlike dviju skupina u učestalosti genskih polimorfizama te razinama odabranih citokina. Analizirane su i međusobne korelacije tih varijabli odgovarajućim testovima.

Kategorijske vrijednosti su prikazane kao frekvencije i udjeli.

Korišten je  $\chi^2$  test za analizu razlike kategorijskih vrijednosti (učestalosti polimorfizama), dok je za analizu kvantitativnih vrijednosti (razina citokina) korišten Mann-Whitneyev U-test. Za međusobnu korelaciju spomenutih neparametrijskih varijabli, korišten je Spearmanov koeficijent korelacije rho ( $\rho$ ) s 95%-tnim intervalom pouzdanosti (CI, prema engl. *confidence interval*). U svim testovima za razinu statističke značajnosti (vrijednost  $\alpha$ ) postavljena je  $p < 0,05$ . Za statističku obradu podataka korišten je računalni program MedCalc (Mariakerke, Belgija).

## 4. REZULTATI

### 4.1. Usporedba koncentracije TNF $\alpha$ i IL-10 u serumima bolesnika oboljelih od RA i kontrolne skupine

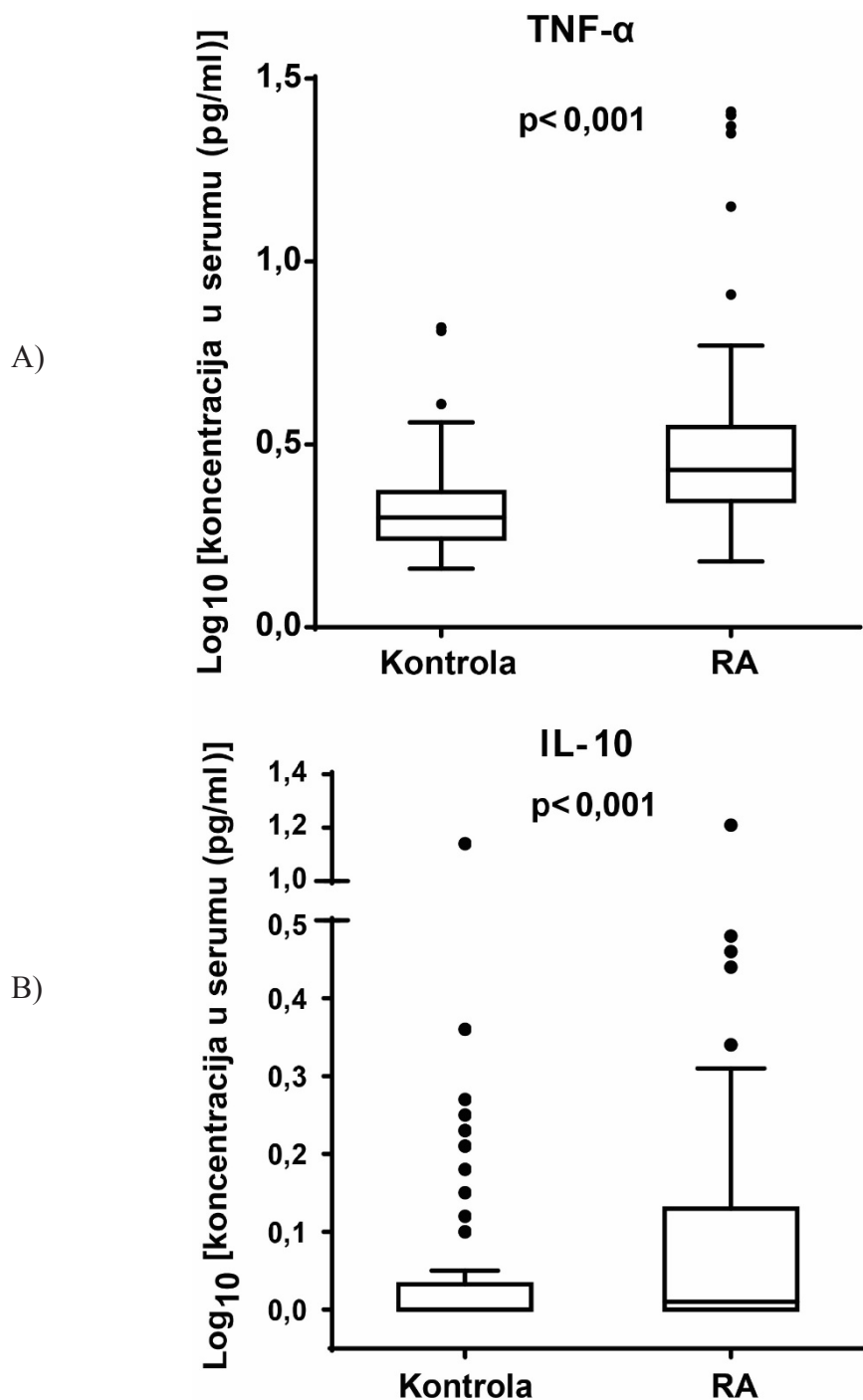
Serumske proteinske koncentracije TNF $\alpha$  i IL-10 u bolesnika oboljelih od RA i kontrolne skupine određene su metodom ELISA s visokom osjetljivošću. Razina detekcije za otkrivanje TNF $\alpha$  bila je 0,191 pg/mL, a za otkrivanje IL-10 osjetljivost je bila 0,17 pg/mL. Koncentracije TNF $\alpha$  u svim serumima ispitanika oboljelih i kontrolne skupine bile su iznad praga osjetljivosti eseja. S druge strane serumske koncentracije IL-10 su u 50% uzoraka pacijenata oboljelih od RA i 72 % uzoraka ispitanika kontrolne skupine bile niže od granice osjetljivosti.

Serumske koncentracije TNF $\alpha$  u skupini oboljelih bile su statistički značajno veće od koncentracija TNF $\alpha$  kontrolne skupine ( $2,86 \pm 4,39$  za RA, a  $1,27 \pm 0,99$  za kontrolnu skupinu,  $p < 0,001$ , testom po Mann Whitneyu, Slika 6.A).

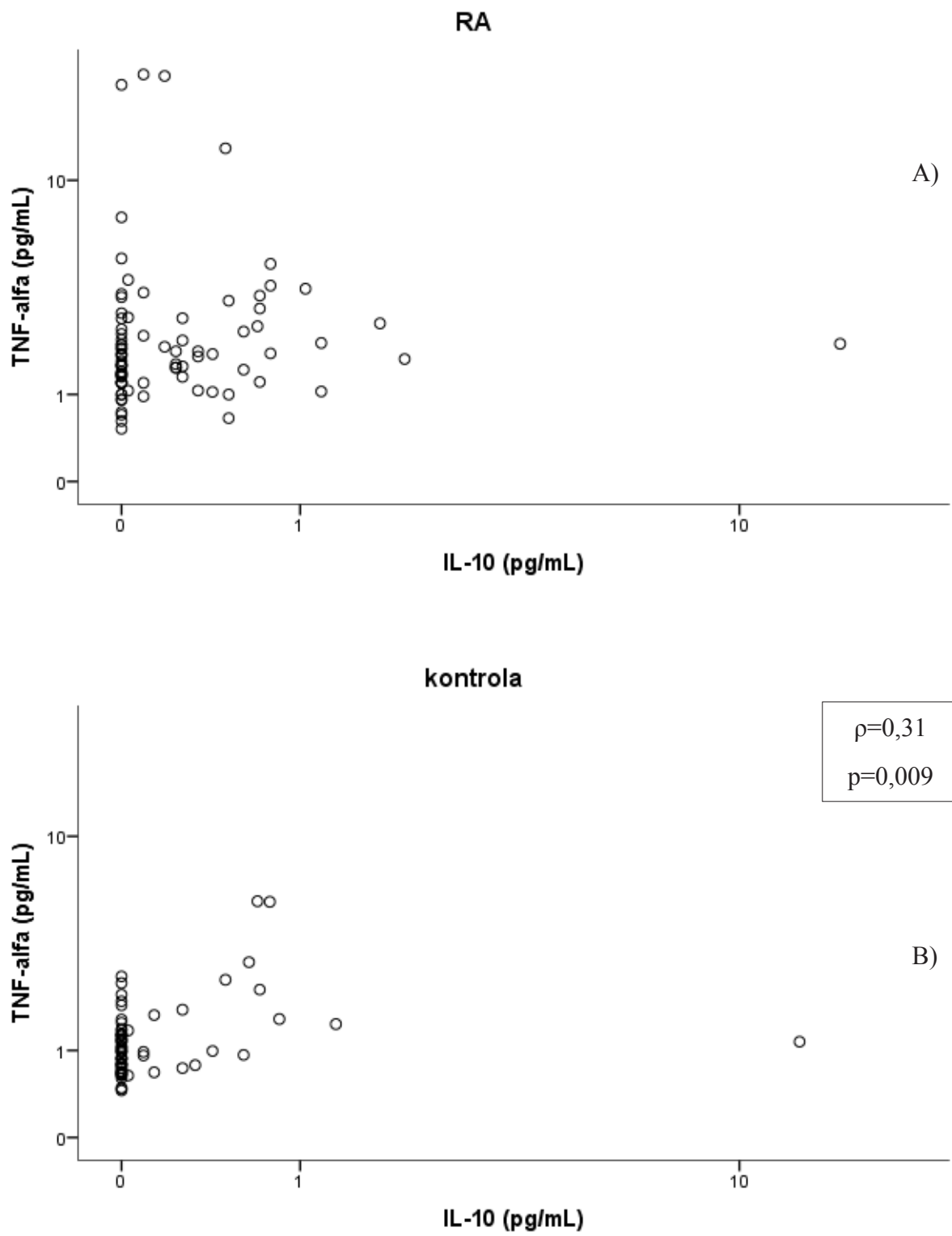
Skupina oboljelih imala je statistički višu razinu imunosupresivnog citokina IL-10 ( $0,69 \pm 1,43$  za skupinu oboljelih od RA, u usporedbi s  $0,31 \pm 1,57$  za kontrolnu skupinu  $p = 0,02$ , testom po Mann Whitneyu, slika 6. B).

Analizom korelacije TNF $\alpha$  i IL-10 pokazuje da su koncentracije TNF $\alpha$  pozitivno korelale s koncentracijama IL-10 ( $\rho = 0,21$  i  $\rho = 0,044$  za skupinu oboljelih, odnosno  $\rho = 0,31$  i  $\rho = 0,009$  za kontrolnu skupinu. Slika 7.).

Također je određena osjetljivost i specifičnost izmjerenih koncentracija TNF $\alpha$  u razlikovanju ispitanika kontrolne skupine i skupine oboljelih od RA. Analiza je učinjena uporabom ROC-krivulja kojima se procjenjuje „dijagnostička učinkovitost“ odnosno razlika vrijednosti između kontrolne skupine i skupine oboljelih na temelju osjetljivosti i specifičnosti kod određene „prijelomne točke“. Pokazano je da se uz „prijelomnu točku 1,29 pg/mL, kontrolna skupina može razlikovati od skupine oboljelih uz osjetljivost 74,7% i specifičnost 72,1% ( $p < 0,001$ ) (Slika 8.)

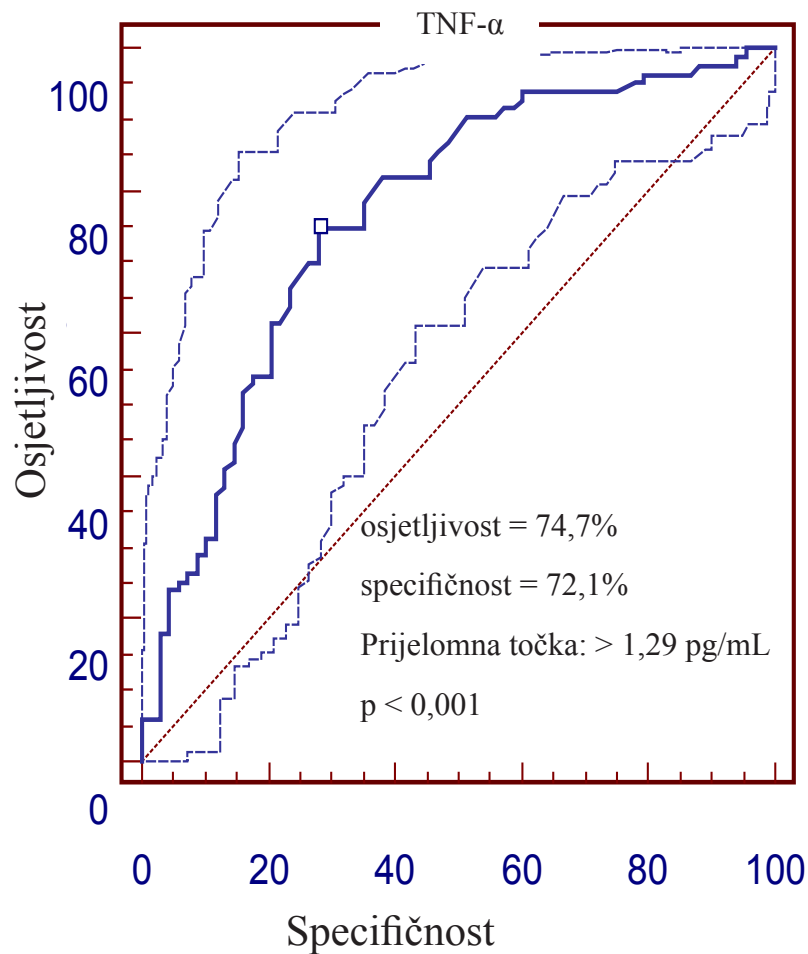


**Slika 6.** Koncentracije citokina TNF $\alpha$  i IL-10 u serumima oboljelih i kontrolne skupine. A) usporedba koncentracije TNF $\alpha$  u serumima kontrolne skupine i bolesnika oboljelih od RA,  $p < 0,001$ , testom po Mann Whitneyju. B) usporedba koncentracije IL-10 u serumima kontrolne skupine i bolesnika oboljelih od RA  $p < 0,001$ , testom po Mann Whitneyju. Prikazani su medijan, gornja i donja kvartila, te minimalna i maksimalna vrijednost. Kružići prikazuju udaljene vrijednosti (*outliere*).



**Slika 7.** Korelacija serumskih koncentracija TNF $\alpha$  i interleukina-10.

Koncentracije imunocitokina TNF $\alpha$  i IL-10 određene su u serumima bolesnika u oboljelih od RA (A) i kontrolne skupine (B) metodom ELISA. Točke prikazuju vrijednosti koncentracija za pojedinih ispitanika, a  $\rho$  spearmanov koeficijent korelacije.



**Slika 8.** Osjetljivost i specifičnost koncentracije TNF $\alpha$  u razlikovanju oboljelih i kontrolne skupine.

Razina razlikovne koncentracije TNF $\alpha$  statistički je ispitana ROC- krivuljama (prema engl. *receiver operating characteristic*. „Dijagnostička učinkovitost“ odnosno razlika tih vrijednosti između oboljelih od RA i kontrolne skupine ocijenjena je na temelju specifičnosti i osjetljivosti testa za određenu „prijelomnu vrijednost“. Prikazana je statistička analiza ROC-krivulja za prijelomnu točku 1,29 i osjetljivost i specifičnost za tu točku.

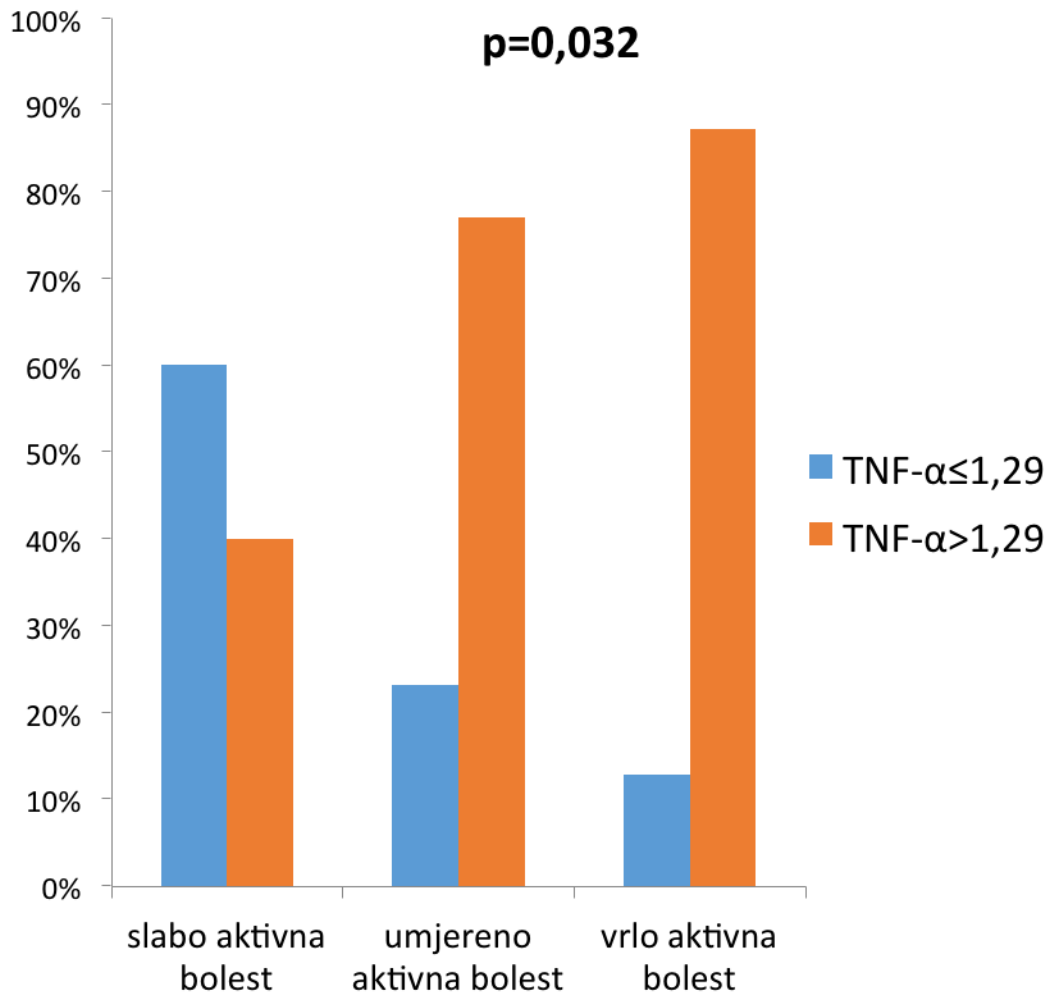


#### **4.1.1. Povezanost serumske koncentracije TNF $\alpha$ s kliničkom aktivnošću bolesti i razinom upalnih biljega u skupini oboljelih**

Na temelju prijelomne vrijednosti dobivene analizom ROC krivulje (1,2 pg/mL, Slika 4.5), pacijenti oboljeli od RA podijeljeni su na podskupinu koja je imala povišene vrijednosti TNF $\alpha$  (TNF $\alpha$ >1,29 pg/mL) i podskupinu koja nije imala povišenu koncentraciju TNF $\alpha$  (TNF $\alpha$ ≤1,29 pg/mL). Ukupno je 81,5% oboljelih imalo povišen TNF $\alpha$  u serumu, a 18,5% ih je imalo normalne razine TNF $\alpha$  (Slika 9.).

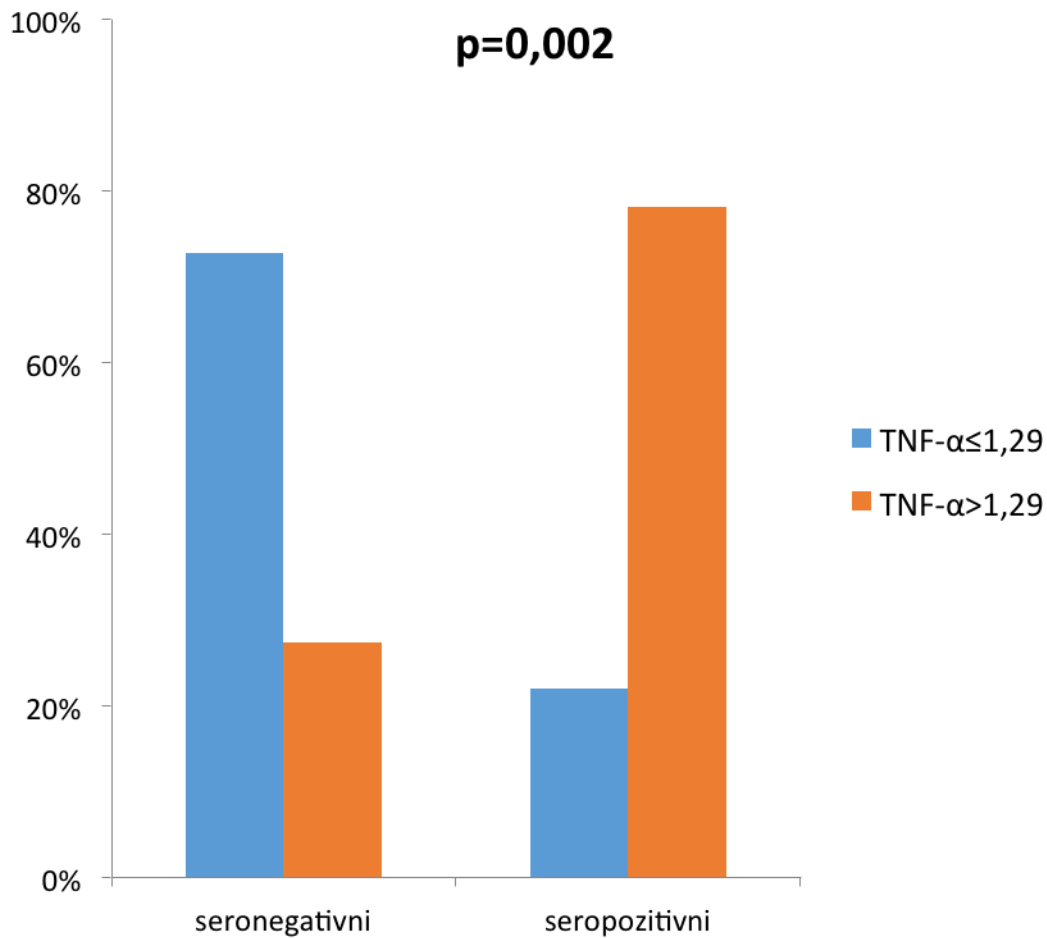
Kako je opisano ranije (Tablica 1, Slika 4.), aktivnost bolesti je procijenjena računanjem indeksa DAS 28 (Tablica 1, Slika 4.). U podskupini bolesnika koji su imali slabo aktivnu bolest 60% ih nije imalo povišenu koncentraciju TNF $\alpha$ , a kod 40% razina TNF $\alpha$  je bila povišena (slika 9.). Zabilježeno je kako se s povećanjem aktivnosti bolesti povećava i udio bolesnika s povećanom razinom TNF $\alpha$ . Tako je među bolesnicima s umjereno aktivnom bolešću udio pacijenata s visokim TNF $\alpha$  bio 76,9, a među bolesnicima s vrlo aktivnom bolešću 87,2 %, dok ih svega 12,8% nije imalo povišenu razinu TNF $\alpha$  (Slika 9.,  $p<0,05$  hi-kvadrat testom). Rezultati su pokazali kako je veći udio seropozitivnih bolesnika imao i povišene koncentracije TNF $\alpha$ .. Tako je među seropozitivnim bolesnicima njih 78,1% imalo povišen TNF $\alpha$ , dok ih je među seronegativnim bolesnicima povišenu razinu TNF $\alpha$  imalo 27,3% ( $p=0,002$ ,  $\chi^2$ -testom, slika 10.).

Razina TNF $\alpha$  bila je u pozitivnoj korelaciji sa SE ( $\rho=0,36$ ,  $p=0,001$ , Slika 11. A) i s koncentracijom CRP-a ( $\rho=0,21$ ,  $p=0,6$ , Slika 11. B).



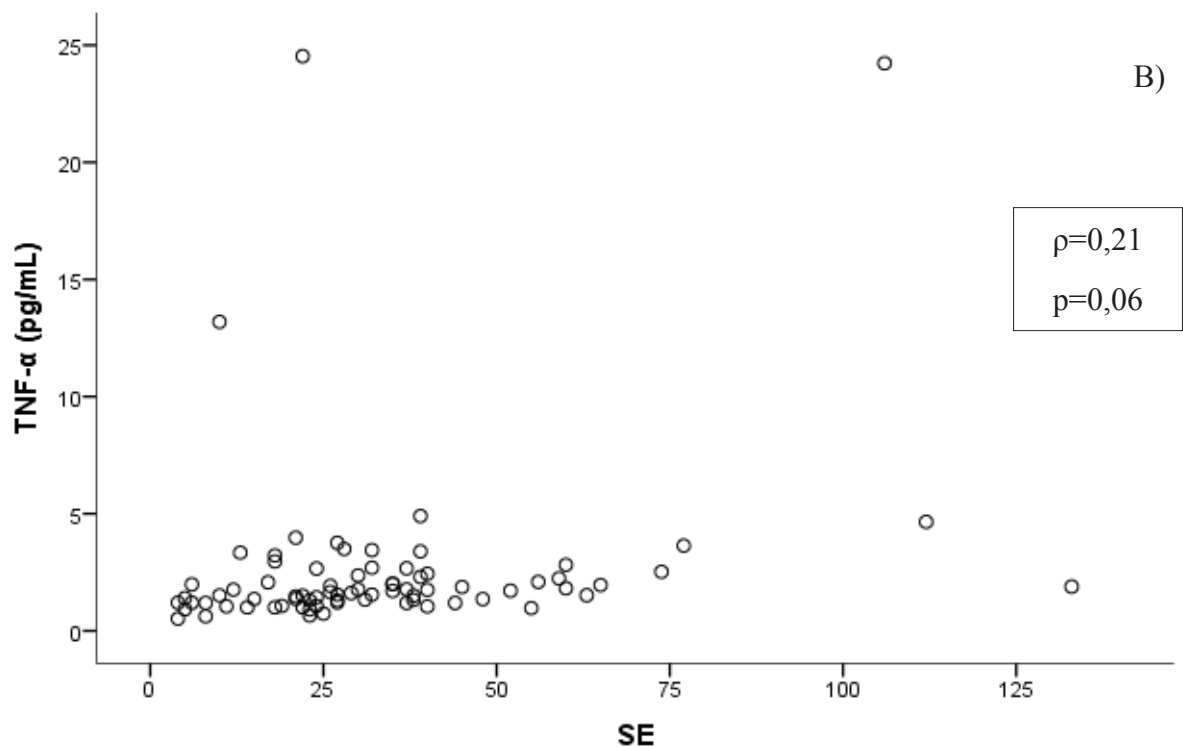
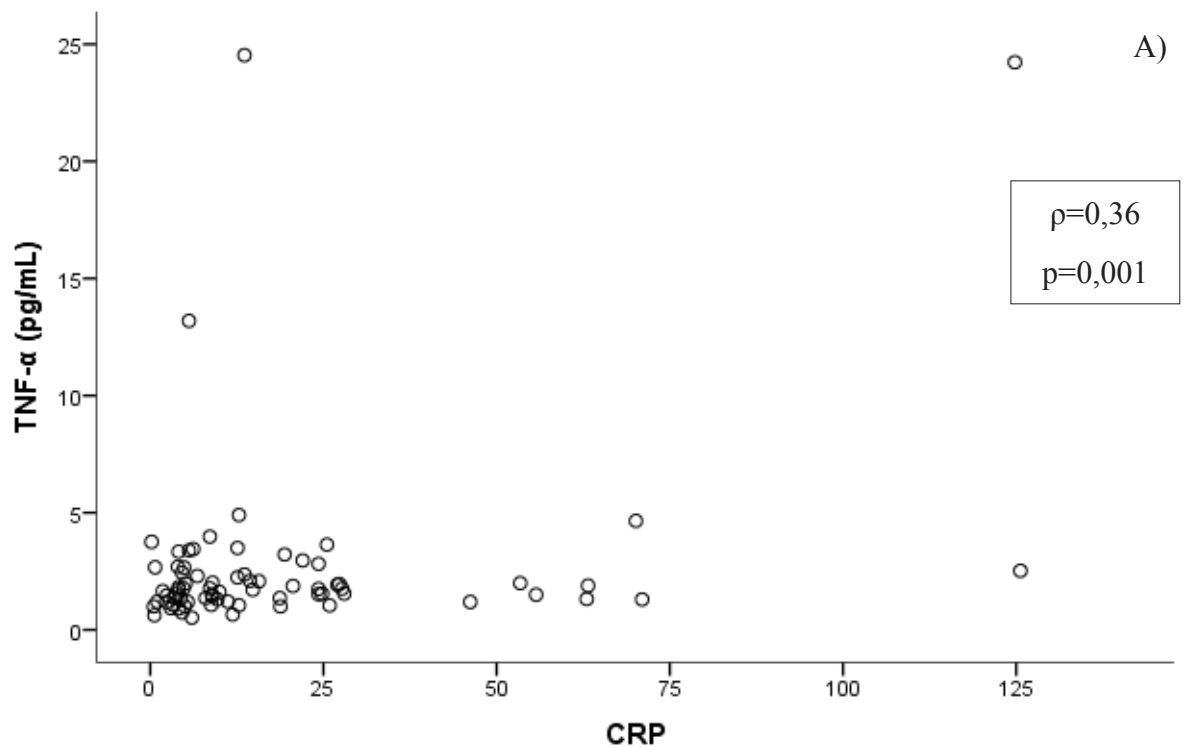
**Slika 9.** Povezanost koncentracije TNF $\alpha$  i kliničke aktivnosti bolesti

Aktivnost bolesti je određena računanjem vrijednosti DAS28 bodovne ljestvice. Bolesnici sa slabo aktivnom bolesti su oni kojima je DAS28 bio manji od 3,2, bolesnicima s umjereno aktivnom bolesti je DAS28 bio između 3,2 i 5,1, a bolesnicima s vrlo aktivnom bolešću veći od 5,2. Razina TNF $\alpha$  je određena iz seruma oboljelih metodom ELISA. p=0,032,  $\chi^2$ -testom.



**Slika 10.** Povezanost serumske koncentracije TNF $\alpha$  i seropozitivnosti bolesnika oboljelih od RA

Koncentracija TNF $\alpha$  u serumima bolesnika oboljelih od RA određena je metodom ELISA. Titar reumatoidnog faktora i anticitrulinskih protutijela određene su u kliničkom laboratoriju, a seropozitivnima su smatrani bolesnici kojima je izmjeren titar reumatoidnog faktora >15,9 ili titar anticitrulinskih protutijela >10. p vrijednost je određena hi kvadrat testom.



**Slika 11.** Korelacija serumskih koncentracija TNF $\alpha$  sa razinom C-reaktivnog proteina i sedimentacijom eritrocita. Serumske koncentracije imunocitokina TNF $\alpha$  određene su u serumima bolesnika oboljelih od RA metodom ELISA. Koncentracija C-reaktivnog proteina (CRP) i sedimentacija eritrocita (SE) određene su u kliničkom laboratoriju. Točke prikazuju vrijednosti za pojedinog ispitanika.  $\rho$  spearmanov koeficijent korelacije.

#### 4.2. Učestalost polimorfizma jednog nukleotida gena *FasL* (FasL-844 C>T, rs763110) i povezanost s vjerojatnošću obolijevanja od RA

Kao što je prikazano na slici 12., analizom rezultata dobivenih kvantitativnim PCR-om uporabom Taqmanovih eseja učinkovito se azlikuju tri različita genotipa za genski polimorfizam FasL-844 C>T. Ispitivani uzorak hrvatske populacije imao je veću učestalost alela C (učestalost alela C: učestalost alela T = 63,7%:36,3%).

Usporedbom učestalosti alela za *FasL* u kontrolnoj skupini i skupini oboljelih utvrđeno je kako prisutnost pojedinog alela nije bila značajno povezana s rizikom obolijevanja od RA. Omjer izgleda (OR, prema engl. *Odds ratio*), za oboljevanje od RA pri prisutnosti alela T iznosio je 0,87 uz intervale pouzdanosti 0,56-1,35 (p=0,54). Isto tako niti jedna od tri moguće kombinacije genotipova nije bila povezana s pojavom RA: OR za genotip CC je bio 0,97 (0,53-1,78, p=0,94), za genotip CT: 1,36 (0,7-2,5, p=0,31), a za genotip TT: 0,56 (0,23-1,35, p=0,19) (Tablica 2.).

**Tablica 2. Povezanost FasL rs763110 genotipa i učestalosti reumatoidnog artritisa**

FasL (rs763110)	Kontrolna skupina	RA	OR <sup>a</sup>	p
<b>Genotip</b>				
CC	40 (42,6%)	34 (42%)	0,97 (0,53-1,78)	0,94
CT	37 (39,4%)	38 (46,9%)	1,36 (0,7-2,5)	0,31
TT	17 (16,1%)	9 (11,1%)	0,56 (0,23-1,35)	0,19
<b>Alel<sup>b</sup></b>				
C	117 (62,2%)	106 (65,4%)	1,15 (0,74-1,78)	0,54
T	71 (37,8%)	56 (34,6%)	0,87 (0,56-1,35)	0,54

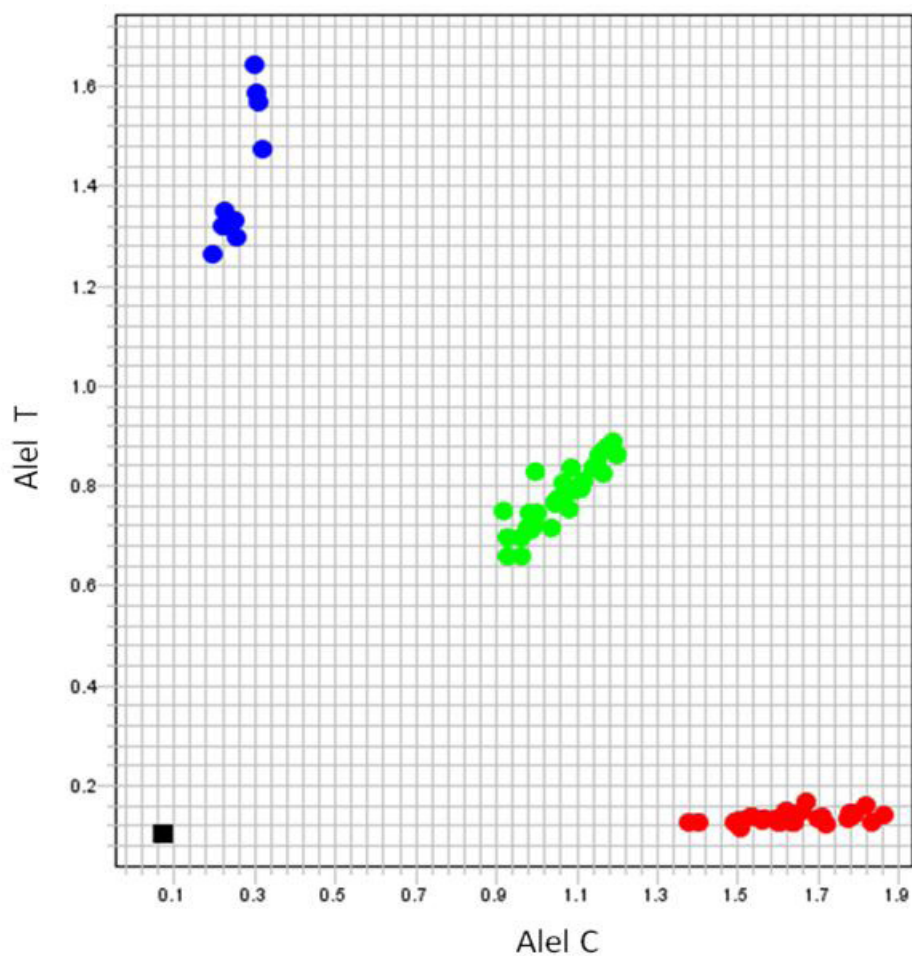
<sup>a</sup> prikazan je OR i 95% intervali pouzdanosti

<sup>b</sup> broj alela, Ukupni broj je dvostruko veći od broja pacijenata

RA - reumatoidni artritis,

OR – omjer izgleda (prema engl. *Odds ratio*)

Alelni razlikovni graf



**Slika 12. Alelni razlikovni graf za genotipizaciju polimorfizma FasL-844 C>T.**

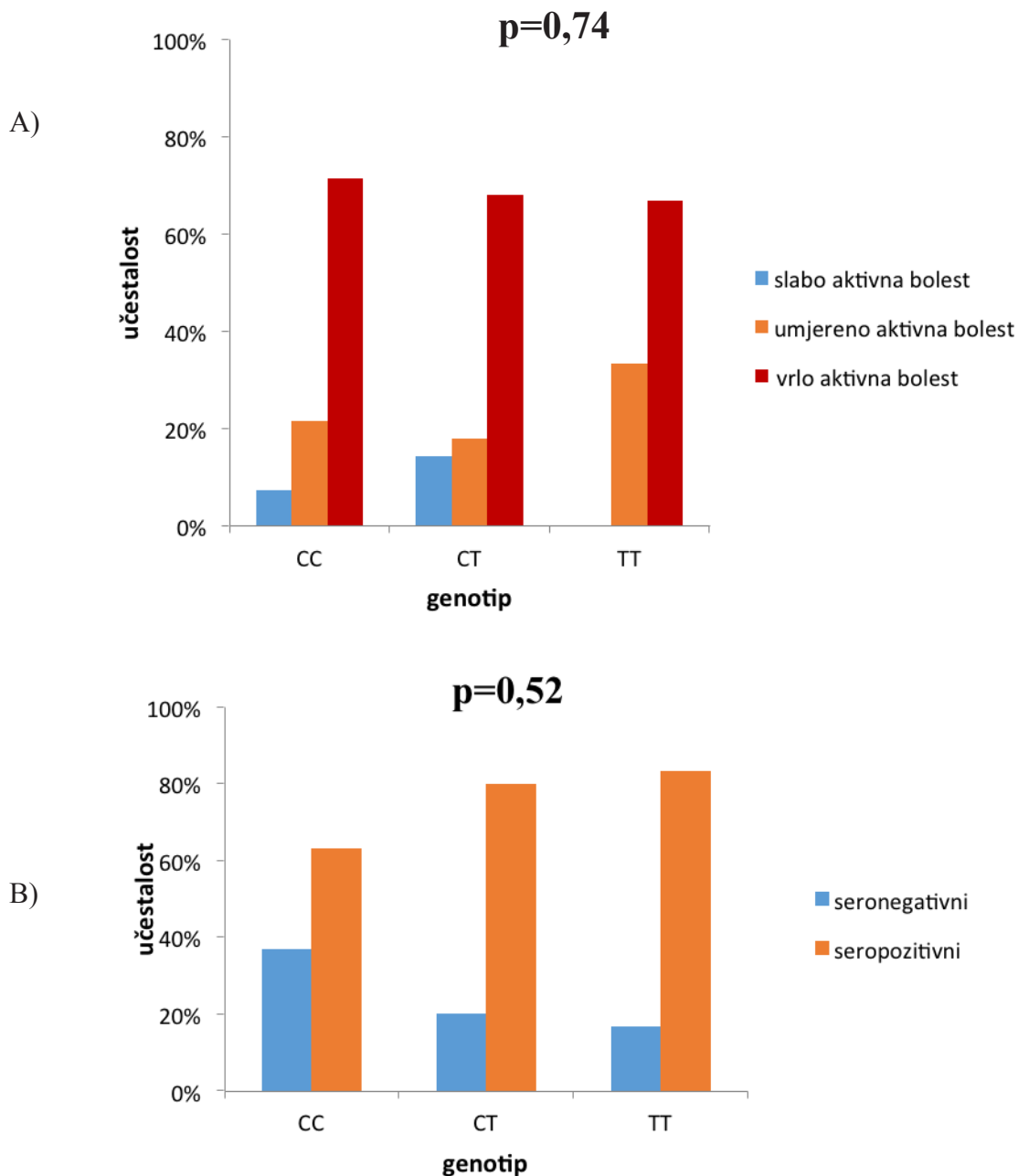
Podatci su dobiveni PCR-analizom na aparatu ABI Prism 7500 uporabom eseja Taqman za određivanje pojedinačnih genskih polimorfizama. Prikazani su rezultati jedne serije analize uzoraka: plave točke označavaju prisutnost genotipa TT, genotip CT je prikazan zelenim, a genotip CC crvenim točkama. Crni kvadratić prikazuje uzorak u koji nije dodana DNA (engl. *non template control*).

#### **4.2.1. Povezanost polimorfizma jednog nukleotida gena *FasL* (FasL-844 C>T, rs763110) s kliničkim tijekom reumatoidnog artritisa**

Analiza povezanosti genotipa za FasL-844 C>T i veličine vrijednosti DAS28 bodovne ljestvice je pokazala da niti jedan od genotipa nije bio povezan s promjenjenom aktivnošću bolesti. Vrlo aktivnu bolest imalo je 71% pacijenata genotipa CC, 68% pacijenata genotipa CT, te 67% pacijenata genotipa TT,  $p=0,74$ ,  $\chi^2$ -testom (Slika 13. A). Iako su bolesnici genotipa CC nešto rjeđe bili seropozitivni (63,2%), u usporedbi s bolesnicima genotipa CT (80%) i bolesnicima genotipa TT (83,3%), razlika nije bila statistički značajna,  $p=0,52$ ,  $\chi^2$ -testom (Slika 13. B).

U sljedećem setu analiza istraženo je je li genotip za FasL-844 C>T povezan s koncentracijama citokina TNF $\alpha$  i IL-10 u serumima bolesnika oboljelih od RA. Kao što je prikazano na slici 14. koncentracije obaju imunocitokina bile su vrlo ujednačene i nisu se značajno razlikovale između različitih genotipova ( $p=0,23$  za TNF $\alpha$  i  $p=0,81$  za IL-10, Kruskal-Wallisovim testom) (Slika 14.). U skladu s podjednakim koncentracijama TNF $\alpha$  (medijan za genotip CC - 2, za genotip CT - 1,5 i za genotip TT- 1,75 pg/mL) ni vrijednosti kliničkih biljega upale (koncentracije CRP i SE) nisu se značajno razlikovale između genotipova ( $p=0,97$  za koncentraciju CRP,  $p=0,87$  za SE, Kruskal-Wallisovim testom) (Slika 15.).



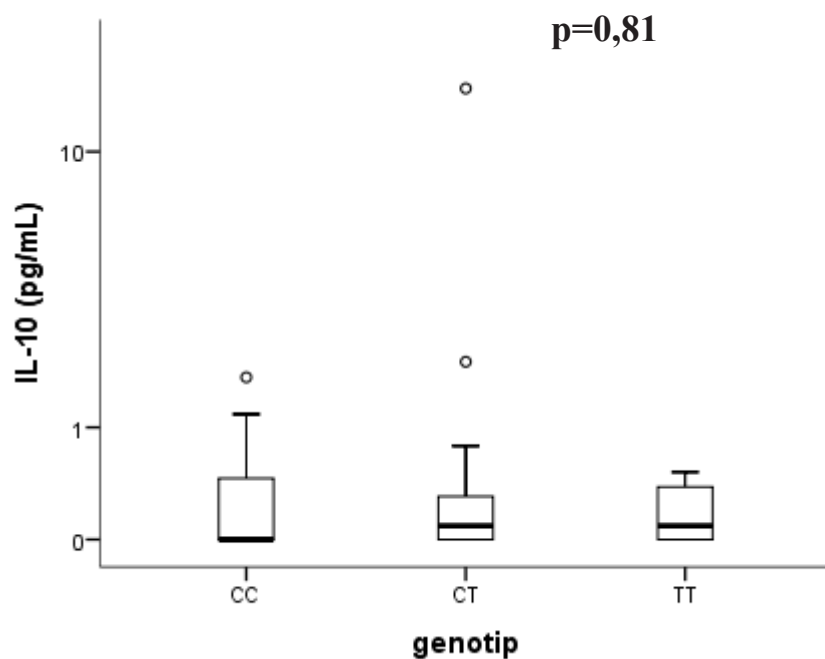
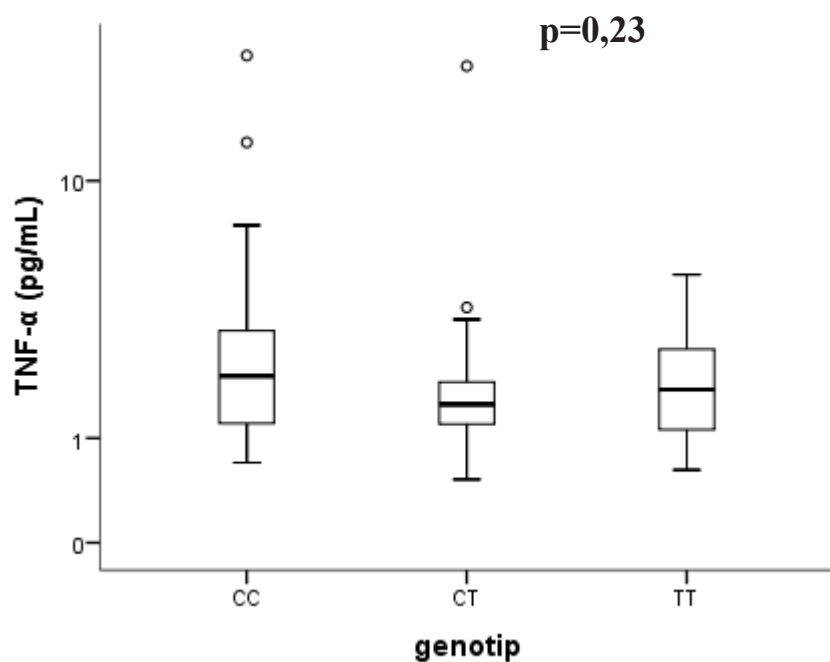


**Slika 13. Povezanost genotipa rs763110 (FasL-844 C>T) sa kliničkom aktivnošću bolesti i seropozitivnošću pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa.**

**A)** Aktivnost bolesti je određena računanjem DAS28 skora. Bolesnici sa slabo aktivnom bolesti su oni kojima je DAS28 bio manji od 3,2, bolesnicima s umjereno aktivnom bolesti je DAS28 bio između 3,2 i 5,1, a bolesnicima s vrlo aktivnom bolešću veći od 5,2.

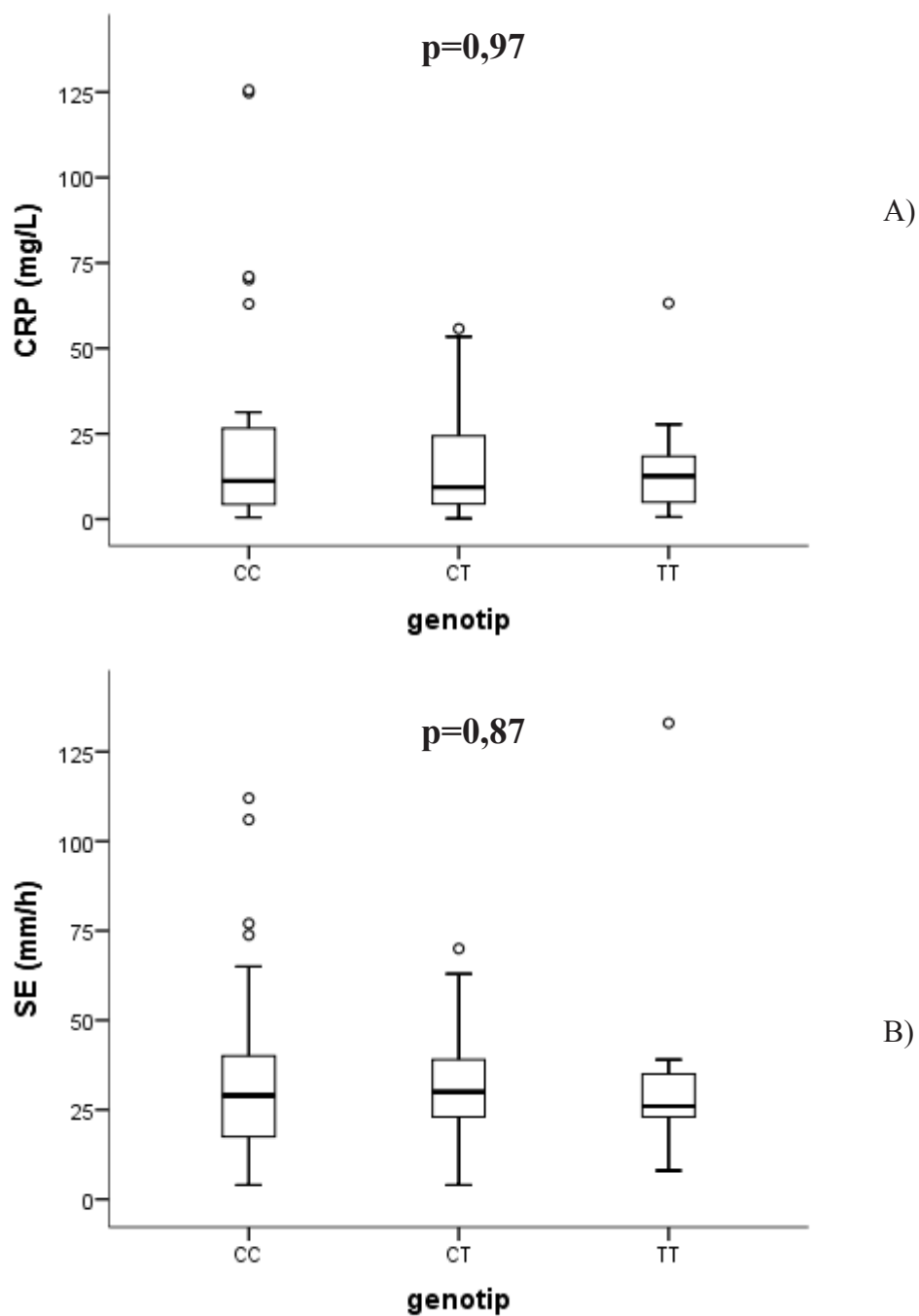
**B)** Seropozitivnim su se smatrali bolesnici kojima je izmjeren povećan titar reumatoidnog faktora (RF>15,9) ili anticitrulinskih protutijela.(accp>10).

Vrijednost p je izračunata  $\chi^2$ -testom testom.



**Slika 14. Povezanost genotipa rs763110 (FasL-844 C>T) s koncentracijama TNF $\alpha$  i IL-10 u serumima bolesnika oboljelih od reumatoidnog artritisa.**

**A)** povezanost genotipa rs763110 (FasL-844 C>T) s koncentracijom TNF $\alpha$  u serumima bolesnika oboljelih od reumatoidnog artritisa. **B)** povezanost genotipa rs763110 (FasL-844 C>T) s koncentracijama IL-10 u serumima bolesnika oboljelih od reumatoidnog artritisa. Serumske koncentracije TNF $\alpha$  i IL-10 su određene metodom ELISA. Prikazani su Medijan, gornja i donja kvartila, te minimalna i maksimalna vrijednost. Kružići prikazuju udaljene vrijednosti (*outliere*). p vrijednost je izračunata Kruskal-Wallisovim-testom.



**Slika 15. Povezanost genotipa rs763110 (FasL-844 C>T) s koncentracijama CRP i brzinom SE u bolesnika oboljelih od reumatoidnog artritisa.**

A) povezanost genotipa rs763110 (FasL-844 C>T) s koncentracijom CRP-a u serumima bolesnika oboljelih od reumatoidnog artritisa. B) povezanost genotipa rs763110 (FasL-844 C>T) sa SE u bolesnika oboljelih od reumatoidnog artritisa. Serumske koncentracije CRP-a i brzina SE su određene u kliničkom laboratoriju. Prikazani su Medijan, gornja i donja kvartila, te minimalna i maksimalna vrijednost. Kružići prikazuju udaljene vrijednosti (*outliere*). p vrijednost je izračunata Kruskal-Wallisovim-testom. SE- sedimentacija eritrocita.

### 4.3. Učestalost polimorfizma jednog nukleotida gena za FOXO3 (FOXO3 T>G, rs12212067) i povezanost s vjerojatnošću obolijevanja od RA

Slično kao i kod gena *FasL*, pokazano je kako se analizom podataka dobivenih kvantitativnim PCR-om uporabom eseja Taqman za određivanje pojedinačnih genskih plimorfizama mogu razlikovati genski polimorfizmi za FOXO3 T>G (Slika 16.). Međutim, budući da je učestalost alela G u ispitivanoj populaciji bila relativno niska (učestalost alela T: učestalost alela G = 91,7%:8,3%), niti jedan ispitanik, ni u kontrolnoj ni u skupini oboljelih nije imao genotip GG. Usporedbom učestalosti alela za FOXO3 u kontrolnoj skupini i skupini oboljelih utvrđeno je kako prisutnost pojedinog alela nije bila značajno povezana s rizikom obolijevanja od RA. Omjer izgleda (OR, prema engl. *Odds ratio*), za oboljevanje od RA pri prisutnosti alela G iznosio je 1,48 uz intervale pouzdanosti 0,69-3,17 (p=0,32). Isto tako niti jedna od dvije otkrivene kombinacije genotipova nije bila povezana s pojavom RA: OR za genotip GT je bio 1,53 (0,68-3,41, p=0,3) (Tablica 3.)

**Tablica 3. Povezanost FOXO3 rs12212067 genotipa i učestalosti reumatoidnog artritisa**

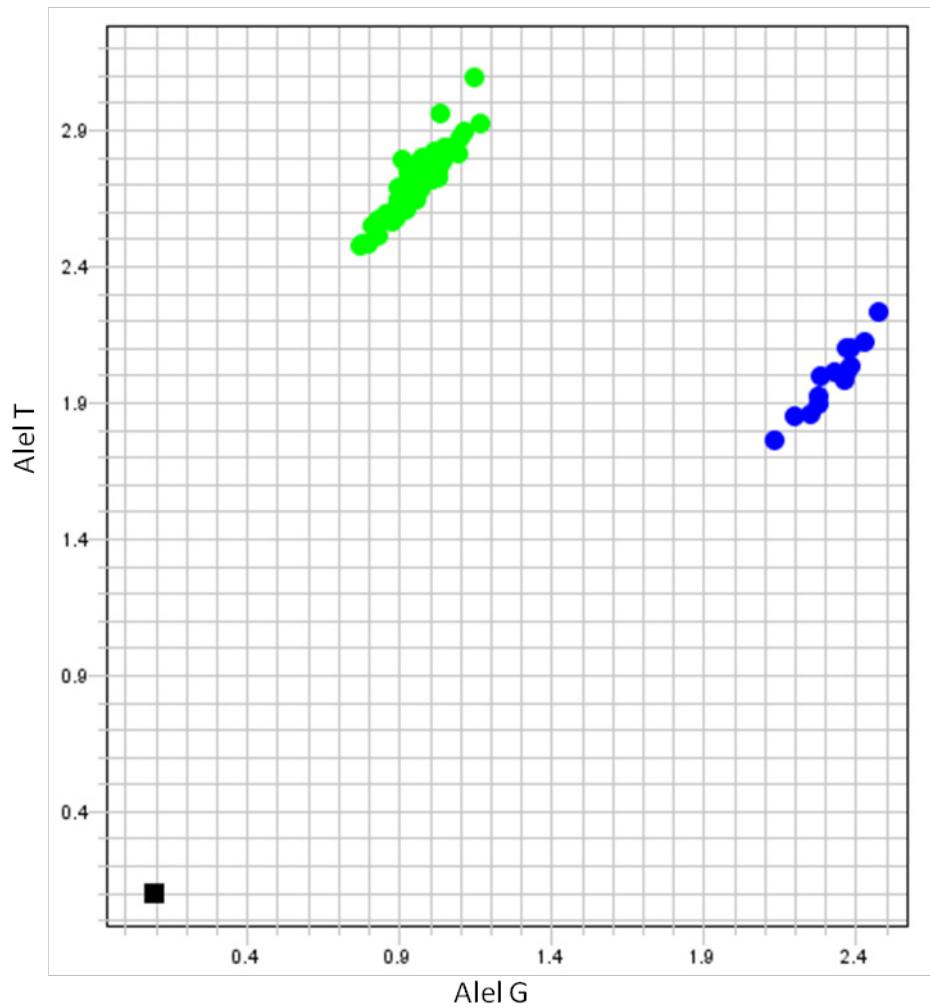
FOXO3(rs12212067)	Kontrolna skupina	RA	ORa	p
<b>Genotip</b>				
GT	13 (13,8%)	16 (19,8%)	1,53 (0,68-3,41)	0,3
TT	81 (86,2%)	65 (80,2%)	0,65 (0,29-1,45)	0,3
<b>Alel</b>				
G	13 (6,9%)	16 (9,9%)	1,48 (0,69-3,17)	0,32
T	175 (93,1%)	146 (90,1%)	0,68 (0,32-1,46)	0,32

<sup>a</sup> prikazan je OR i 95% intervale pouzdanosti

<sup>b</sup> broj alela, Ukupni broj je dvostruko veći od broja pacijenata

RA - reumatoidni artritis,

OR – omjer izgleda (prema engl. *Odds ratio*)



**Slika 16. Alelno razlikovni graf za genotipizaciju polimorfizma FOXO3 rs12212067.**

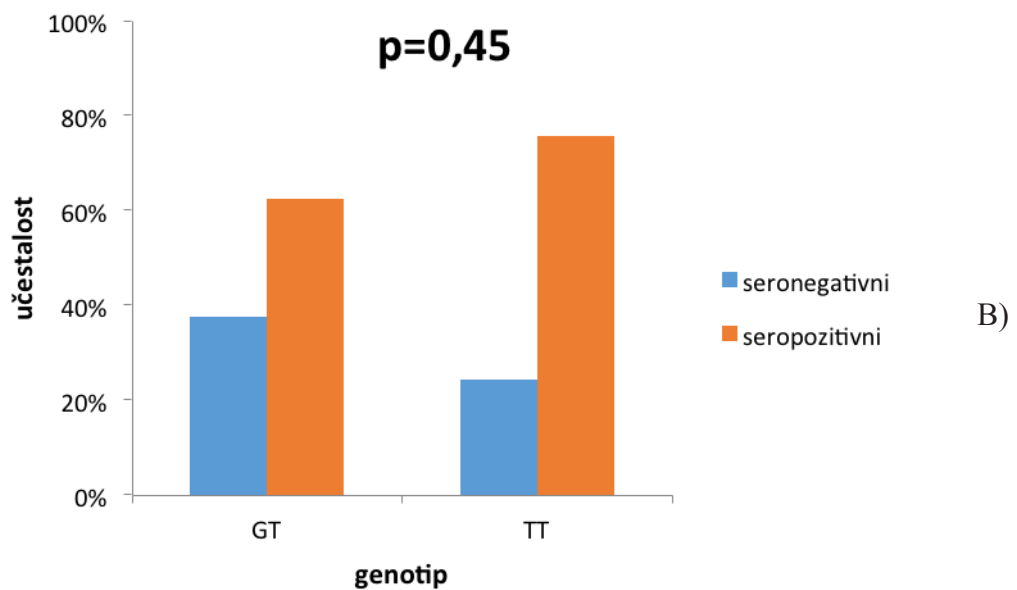
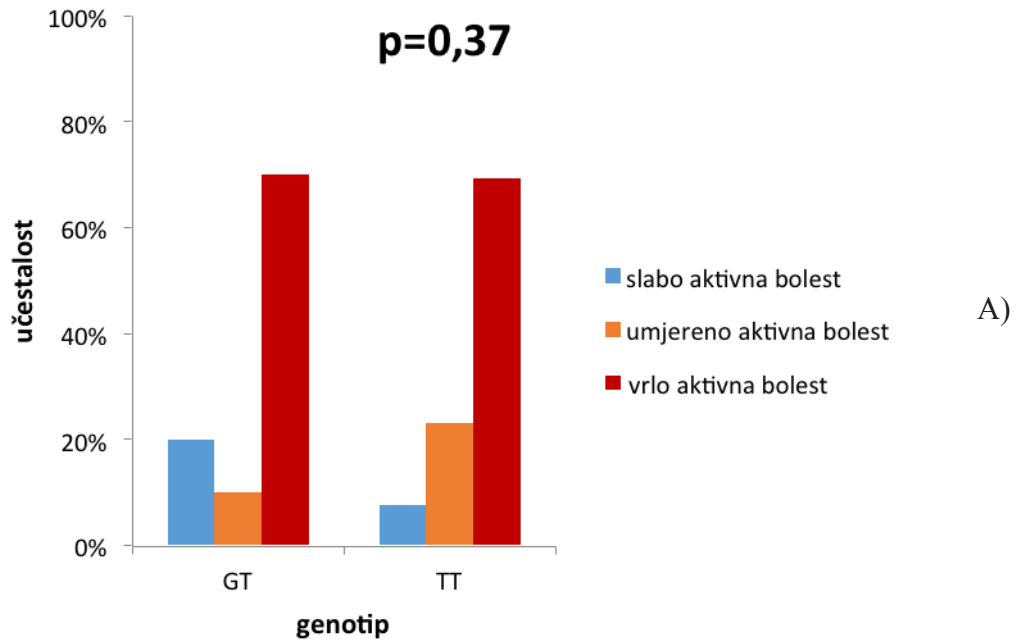
Podatci su dobiveni PCR-analizom na aparatu ABI Prism 7500 uporabom eseja Taqman za određivanje pojedinačnih genskih polimorfizama. Prikazani su rezultati analize jedne serije uzoraka: plave točke označavaju prisutnost genotipa GT, a zelene točke genotip G. Zbog niske učestalosti alela G u ispitivanoj populaciji, niti jedan ispitanik nije imao genotip GG. Crni kvadratić prikazuje uzorak u koji nije dodana DNA (engl. *non template control*).

#### **4.3.1. Povezanost polimorfizma jednog nukleotida gena za FOXO3 (FOXO3 T>G, rs12212067) s kliničkim tijekom reumatoidnog artritisa**

Ispitivana je povezanost genotipa za FOXO3 s različitim kliničkim obilježjima RA u skupini oboljelih.

Analiza povezanosti genotipa za FOXO3-T>G i veličine skora DAS28 je pokazala da niti jedan od genotipova nije bio povezan s promjenjenom aktivnošću bolesti. Vrlo aktivnu bolest imalo je 70% pacijenata genotipa GT, dok ih je među pacijentima genotipa TT 69,2% imalo vrlo aktivnu bolest,  $p=0,37$ ,  $\chi^2$ -testom (Slika 17. A). Iako su bolesnici s heterozigotnim genotipom GT nešto rjeđe bili seropozitivni (62,5%), u usporedbi s bolesnicima genotipa TT (75,7%), razlika nije bila statistički značajna,  $p=0,45$ ,  $\chi^2$ -testom (Slika 17. B).

U završnom setu analiza istraženo je je li genotip za FOXO3-T>G povezan s koncentracijama citokina TNF $\alpha$  i IL-10 u serumima bolesnika oboljelih od RA. Kao što je prikazano na slici 18. koncentracije obaju imunocitokina nisu se značajno razlikovale između različitih genotipova ( $p=0,28$  za TNF $\alpha$  i  $p=0,91$  za IL-10, Mann Whitneyevim testom) (Slika 18.). U skladu s podjednakim koncentracijama TNF $\alpha$  (medijan za genotip Gt – 1,77, a za genotip TT - 1,6 pg/mL): ni vrijednosti kliničkih biljega upale: koncentracije CRP-a i SE nisu se značajno razlikovale između genotipova ( $p=0,14$  za koncentraciju CRP-a, te  $p=0,46$  za SE, Mann Whitneyevim testom) (Slika 19.).



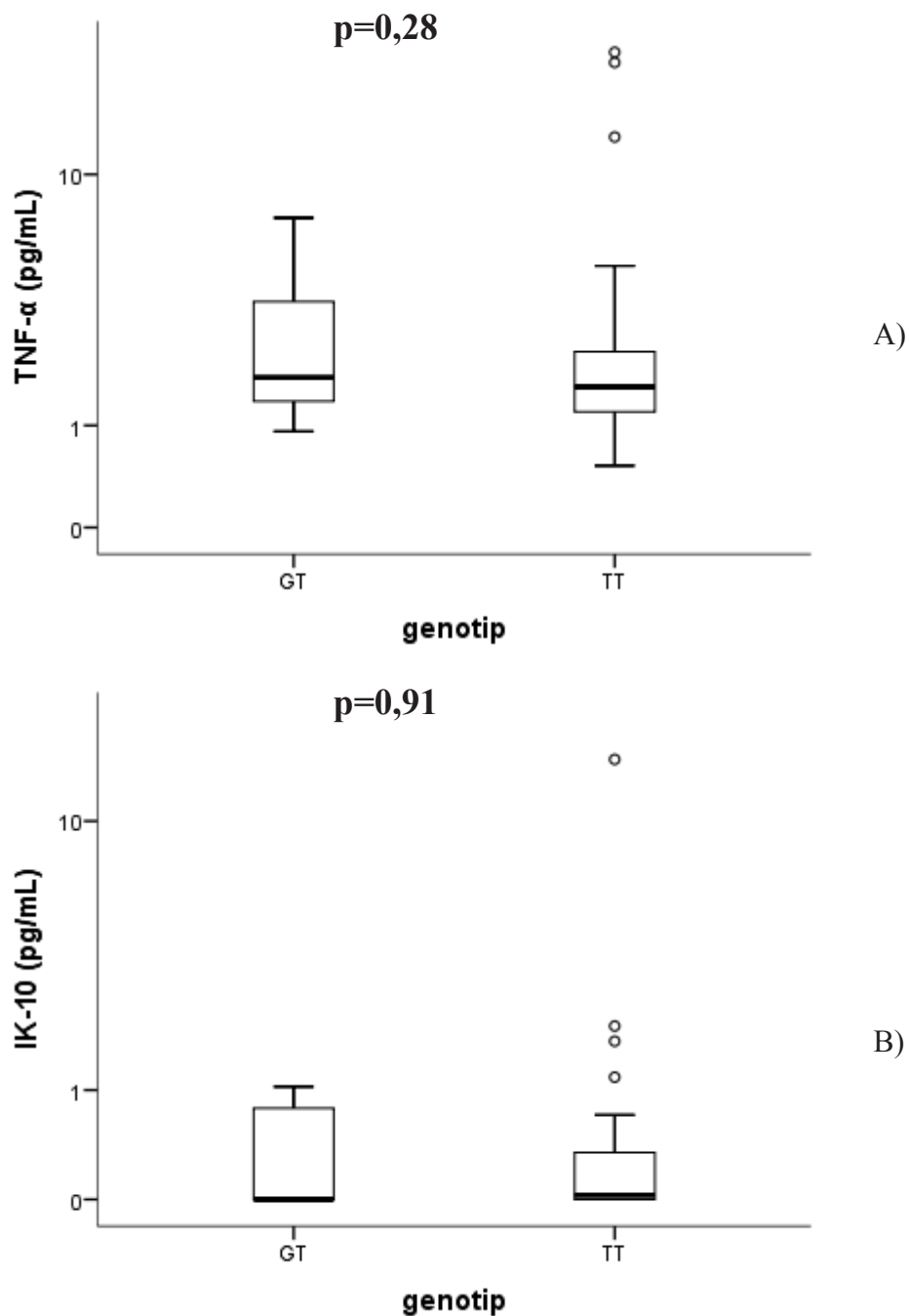
**Slika 17. Povezanost genotipa FOXO3 (FOXO3 T>G, rs12212067) sa kliničkom aktivnošću bolesti i seropozitivnošću pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa.**

**A)** Aktivnost bolesti je određena računanjem DAS28 skora. Bolesnici sa slabo aktivnom bolesti su oni kojima je DAS28 bio manji od 3,2, bolesnicima s umjereno aktivnom bolesti je DAS28 bio između 3,2 i 5,1, a bolesnicima s vrlo aktivnom bolešću veći od 5,2.

**B)** Seropozitivnim su se smatrali bolesnici kojima je izmjerena povećana titar reumatoidnog faktora (RF>15,9) ili anticitrulinskih protutijela (accp>10).

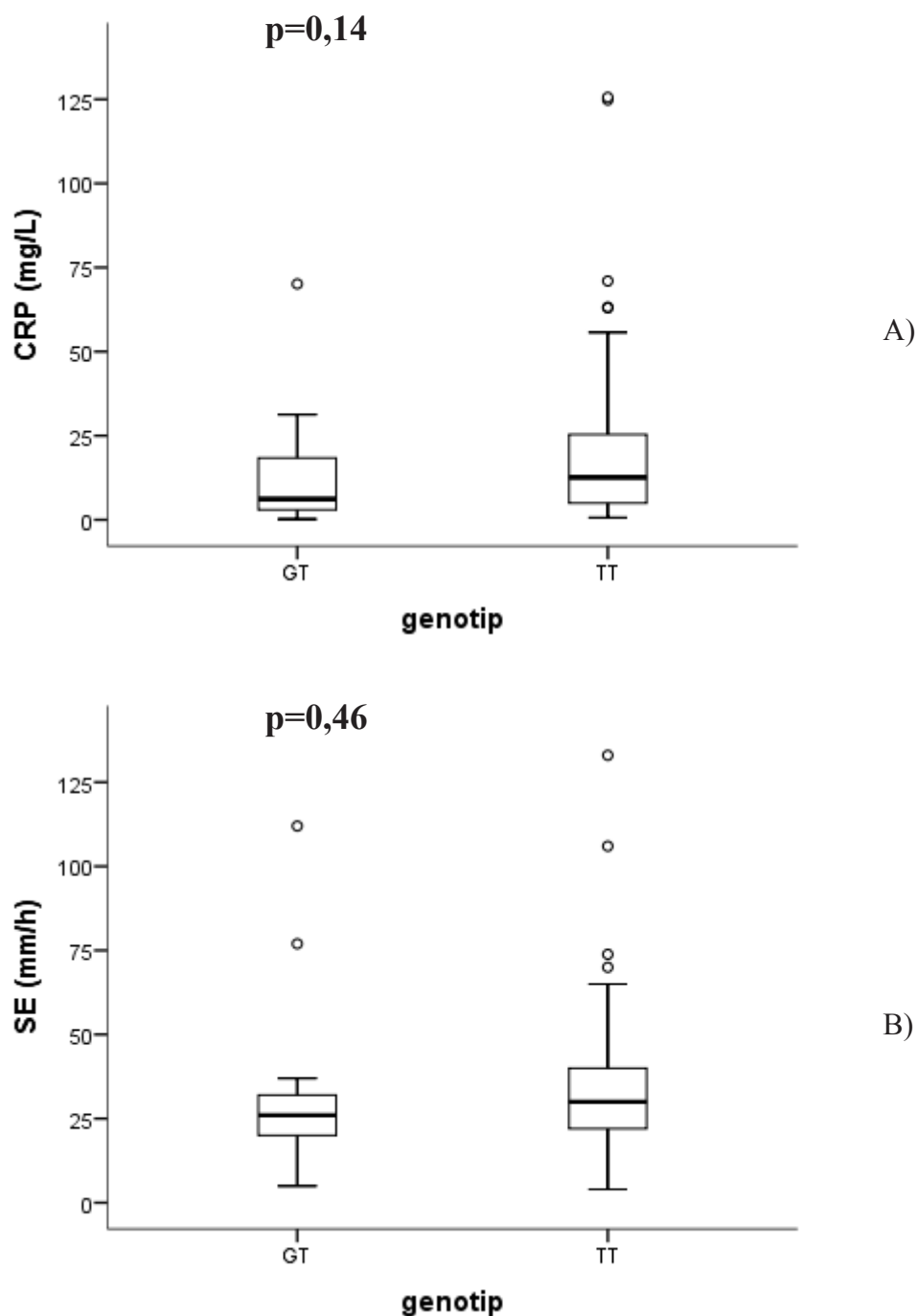
Vrijednost p je izračunata hi-kvadrat testom.





**Slika 18. Povezanost genotipa FOXO3 (FOXO3 T>G, rs12212067) s koncentracijama TNF $\alpha$  i IL-10 u serumima bolesnika oboljelih od reumatoidnog artritisa.**

**A)** povezanost genotipa rs12212067 (FOXO3 T>G) s koncentracijom TNF- $\alpha$  u serumima bolesnika oboljelih od reumatoidnog artritisa. **B)** povezanost genotipa rs12212067 (FOXO3 T>G) s koncentracijama IL-10 u serumima bolesnika oboljelih od reumatoidnog artritisa. Serumske koncentracije TNF $\alpha$  i IL-10 su određene metodom ELISA. Prikazani su Medijan, gornja i donja kvartila, te minimalna i maksimalna vrijednost. Kružići prikazuju udaljene vrijednosti (*outliere*). p vrijednost je izračunata Mann-Whitneyevim-testom.



**Slika 19. Povezanost genotipa genotipa FOXO3 (FOXO3 T>G, rs12212067) s koncentracijom CRP-a i brzinom SE u bolesnika oboljelih od reumatoidnog artritisa.**

**A)** povezanost genotipa rs12212067 (FOXO3 T>G) s koncentracijom CRP-a u serumima bolesnika oboljelih od reumatoidnog artritisa. **B)** povezanost genotipa rs12212067 (FOXO3 T>G) sa SE u bolesnika oboljelih od reumatoidnog artritisa. Serumske koncentracije CRP i SE su određene u kliničkom laboratoriju. Prikazani su Medijan, gornja i donja kvartila, te minimalna i maksimalna vrijednost. Kružići prikazuju udaljene vrijednosti (*outliere*). p vrijednost je izračunata Mann Whitneyevim-testom. SE-sedimentacija eritrocita

## **5. RASPRAVA**

### **5.1. Citokinski profil ispitanika**

Citokini reguliraju široki spektar upalnih procesa uključenih u patogenezu reumatoidnog artritisa. Neravnoteža proupalnih i protuupalnih citokina dovodi do indukcije autoimunosti, kronične upale i oštećenja zglobova (9). U ovom je istraživanju određena razina TNF $\alpha$  kao ključnog proupalnog citokina, te razina IL-10 kao primjer protuupalnog citokina.

#### **5.1.1. Serumska razina TNF $\alpha$ povišena je u skupini oboljelih od reumatoidnoga artritisa u ispitivanom dijelu hrvatske populacije u odnosu na kontrolnu skupinu bolesnika**

TNF $\alpha$  poznat je kao ključni proupalni citokin u RA te se i suvremeno liječenje RA temelji na primjeni anti-TNF $\alpha$  lijekova. Dosadašnja istraživanja jasno su pokazala značajno povišene razine ovog citokina u sinovijalnoj tekućini oboljelih, dok su njegove serumske razine često bile nedetektabilne ili se nisu značajno razlikovale prema kontrolnoj skupini, a nađen je čak i porast serumske koncentracije nakon primjene anti-TNF $\alpha$  lijekova (193, 255-257). Neka istraživanja pokazala su pak značajno povišene serumske razine TNF $\alpha$  kod oboljelih od RA u usporedbi s kontrolama i to kod bolesnika s aktivnom bolešću. Razine ovog citokina pri tome su rasle s napredovanjem bolesti procijenjenim na temelju radioloških oštećenja kostiju i zglobova (192). U ovom istraživanju skupina oboljelih od reumatoidnog artritisa imala je statistički značajno veće serumske vrijednosti TNF $\alpha$  od kontrolne skupine. Na osnovu ranijih istraživanja, moguće je da je rezultat ove studije povezan s vrlo aktivnom bolešću u ispitivanih pacijenata jer je 70% ispitanika imalo vrlo visoku aktivnost bolesti mjerenu vrijednošću DAS28 bodovne ljestvice (DAS28>5.2) (258).

#### **5.1.2. Serumska razina IL-10 povišena je u skupini oboljelih od reumatoidnoga artritisa u ispitivanom dijelu hrvatske populacije u odnosu na kontrolnu skupinu bolesnika**

Poznata je imunosupresivna uloga IL-10 na CD4+ T-limfocite i makrofage, glavne pokretače upale u reumatoidnom artritisu, kao što je poznata i njegova sposobnost da smanji ekspresiju niza proupalnih citokina (259), što je razlog proučavanja razina ovog citokina u sinovijalnoj tekućini i serumu oboljelih. U ovom istraživanju serumske razine IL-10 bile su niske unutar kontrolne skupine te kod mnogih nisu bile detektabilne. Analizom koncentracije

IL-10 nađene su značajno više koncentracije u serumu oboljelih od RA u usporedbi s kontrolnom skupinom bolesnika ( $p < 0,001$ , testom po Mann-Whitneyu). Medijan serumske koncentracije IL-10 pokazao se povišen u bolesnika s RA u usporedbi s kontrolama i u ranijim istraživanjima (190). Takav se nalaz dijelom tumači činjenicom da mononukleari periferne krvi oboljelih spontano proizvode IL-10 u staničnim kulturama (260) te predstavljaju glavni izvor ovog citokina u cirkulaciji. Pri tome razina serumskog IL-10 u dosadašnjim istraživanjima nije bila u korelaciji s kliničkim pokazateljima aktivnosti bolesti, ali je bila u pozitivnoj korelaciji s razinom serumskog reumatoidnog faktora (190). Nasuprot tome, postoje istraživanja koja su pokazala statistički značajno niže serumske razine IL-10 kod oboljelih od RA u komparaciji s kontrolama, s tendencijom snižavanja serumske razine ovog citokina tijekom napredovanja bolesti (192) što je tumačeno razvojem hijerarhijske citokinske mreže tijekom bolesti, unutar koje jedan citokin stimulira ili inhibira produkciju drugih. Na osnovu dosadašnjih istraživanja može se zaključiti da su ovakve razlike moguće posljedica kliničke heterogenosti RA temeljene na različitoj ekspresiji gena povezanih s bolešću, koja utječe na limfoidnu organizaciju sinovije, a samim time stvaraju se i različiti citokinski profili (261).

### **5.1.3. Serumska razina TNF $\alpha$ u pozitivnoj je korelaciji s razinama IL-10 u skupini oboljelih od reumatoidnoga artritisa u ispitivanom dijelu hrvatske populacije**

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je koncentracija TNF $\alpha$  u oboljelih bila u pozitivnoj korelaciji s koncentracijom IL-10 ( Spearmanov koeficijent korelacije = 0.35,  $p < 0.001$ ). Patofiziološki mehanizam ove korelacije može se objasniti istraživanjem koje je pokazalo da *ex vivo* kulture sinovijalnog tkiva koje sadržavaju miješane sinovijalne stanice (fibroblaste, makrofage i limfocite) produciraju IL-10 jednako kao i proupalne citokine poput TNF $\alpha$  (184-185) te da proupalni citokini sami po sebi potiču sintezu IL-10, što je viđeno u pokusima u kojima je dodavanje TNF $\alpha$  stimuliralo produkciju IL-10 (184). Neutralizacija endogenog IL-10 specifičnim protutijelima u istim je pokusima dovela do pojačane produkcije TNF $\alpha$  i drugih proupalnih citokina (184). Takvi rezultati predlažu model organizacije citokinske mreže u kojoj IL-10 služi za inhibiciju sinovijalne upale, u mehanizmu pozitivne povratne sprege s TNF $\alpha$ . Nasuprot rezultatima ovog rada, skupina rumunjskih autora pronašla je da su visokim razinama proupalnog TNF $\alpha$  u aktivnom reumatoidnom artritisu pridružene niske serumske koncentracije protuupalnog IL-10, dok su najviše razine IL-10 zabilježene u serumu zdravih kontrola (192). Ove je razlike moguće tumačiti manjim brojem rumunjskih ispitanika (37 oboljelih i 25 kontrola) te primjenom ELISA testova visoke senzitivnosti u ovom istraživanju.

## 5.2. Učestalost polimorfizma jednog nukleotida gena *FasL* (FasL-844 T>C, rs763110) i povezanost s vjerojatnošću oboljevanja od reumatoidnog artritisa

Genetska sklonost za reumatoidni artritis, osobito za teže oblike bolesti, primarno se povezivala s HLA genima (262-263). Međutim, pokazalo se da je HLA-DR regija odgovorna za svega 40% ukupne genetske predisponiranosti za RA. Izvan HLA sustava svega je nekoliko gena povezano s predispozicijom i tijekom bolesti (264-265). Između mnogih gena čija se uloga povezuje s razvojem i tijekom reumatoidnoga artritisa ističu se neki vezani s procesom stanične smrti, odnosno apoptoze, kao što su primjerice *Fas* i *FasL* geni (140). Ranije studije ukazivale su na dva najznačajnija polimorfizma promotorske regije *Fas* gena (-670 A>G) i *FasL* gena (-844 T>C) povezana s promjenama transkripcijske aktivnosti (89, 141). Pokazalo se da tranzicija A → G na poziciji -670 u promotorskoj regiji *Fas* gena destruiira stimulatorni protein 1 (Sp-1, prema engl. *stimulatory protein-1*) i vezno mjesto proteina koji pojačava signal i aktivira transkripciju (STAT-1, prema engl. *signal transducer and activator of transcription 1*) (139). Polimorfizam FasL-844 T>C lociran je na veznom mjestu za transkripcijski faktor koji pojačava vezanje proteina (CAAT/ *enhancer-binding protein b*). Povišena ekspresija FasL gena pokazala se u stanicama koje imaju C alel u komparaciji sa stanicama koje imaju T alel što je bilo povezano sa stimulacijom apoptoze (266).

Navedena istraživanja gena *Fas* i *FasL* ohrabrila su istraživače da pokušaju povezati rizik oboljevanja od RA i različit tijek bolesti s polimorfizmima pojedinačnog nukleotida promotorske regije ovih dvaju gena ili regije introna 2 kod FasL IVS A>G-124 polimorfizma (88-89, 139). Do sada najviše istraživani polimorfizmi gena *Fas* jesu Fas-670 A>G, rs 1800682 i Fas-1377 G>A, rs2234767, dok su istraživani polimorfizmi gena *FasL* FasL-844 T>C, rs763110 i FasLIVS2nt-124 A>G, rs5030772.

U ovom istraživanju proučena je povezanost RA s FasL-844 T>C (rs763110) u populaciji hrvatskih pacijenata te nije utvrđena statistički značajna razlika u zastupljenosti bilo kojeg alela ili genotipa između oboljelih od reumatoidnoga artritisa i kontrolne skupine.

Prema rezultatima ovog rada prisutnost T alela nije značajno povećavala vjerojatnost razvoja RA, prisutnost C alela također nije povećavala vjerojatnost pripadnosti bilo kojoj od dvije skupine ispitanika, a niti jedna od tri moguće kombinacije genotipa (CC, CT ili TT) nije imala utjecaj na rizik oboljevanja od RA.

Mohammadzadeh i sur. proučavali su 2012. godine povezanost polimorfizma (Fas-670 A>G, FasL-844 T>C i FasL IVS2nt\_124 A>G) na populaciji od 120 oboljelih od reumatoidnog artritisa te 112 kontrola u Iranu (143). Pretpostavka je bila da obzirom na Fas-FasL put imunoregulacije navedeni polimorfizmi mogu imati značajan utjecaj na inicijaciju autoimune bolesti, obzirom da je stanična smrt putem apoptoze neophodna za održavanje normalnih staničnih funkcija (267), te da promjene izražaja gena *Fas* i *FasL* smanjuju apoptotsku

sposobnost stanica (268). Ovi molekularnogenetski mehanizmi koji reguliraju ekspresiju gena *Fas* i *FasL* smatraju se ključnim u indukciji autoimunosti kod RA. Spomenuti polimorfizmi proučavani su kod oboljelih od RA kako bi se ispitala povezanost sa predispozicijom za bolest. Za polimorfizam *FasL*-844 C>T frekvencija homozigotnog genotipa TT bila je češća u bolesnika nego u kontrolnoj skupini, ali bez statistički značajne povezanosti s rizikom oboljevanja. Učestalost CT i CC genotipa nije bila povezana s rizikom oboljevanja od RA, odnosno nije pronađena statistički značajna povezanost između istraživanih polimorfizama i rizika oboljevanja od artritisa u skupini iranskih ispitanika. Takvi rezultati za SNP *FasL*-844(T>C) odgovaraju rezultatima u ispitivanom dijelu hrvatske populacije.

S druge strane, Yildir i sur. došli su do zanimljivih rezultata povezanosti SNP *FasL* gena rs763110 s reumatoidnim artritismom. Na uzorku od 100 oboljelih i 101 kontrole utvrđena je veća učestalost T alela *FasL*-844 polimorfizma u oboljelih, dok je C alel bio zastupljeniji u kontrolama nego među oboljelima. Rezultati ovog istraživanja sugeriraju da bi polimorfizam -844 T>C gena *FasL* povezanog s apoptozom mogao biti povezan s predispozicijom za bolest u turskoj populaciji oboljelih (15). Ovo istraživanje je pokazalo da učestalost polimorfizma jednog nukleotida gena *FasL* nema utjecaj na rizik oboljevanja od reumatoidnog artritisa u ispitivanom dijelu hrvatske populacije što je sukladno rezultatima dobivenim na sličnom uzorku dijela iranske populacije, a u suprotnosti je s rezultatima koji su nađeni u turskoj populaciji (TT i CT genotip i T alel u *FasL*-844 polimorfizmu su povezani s većom predispozicijom oboljevanja od RA). Ovakvi rezultati sugeriraju potrebu daljnjih istraživanja povezanosti ovog polimorfizma i reumatoidnog artritisa unutar različitih etničkih skupina te na većim skupinama pacijenata.

### **5.2.1. Povezanost genotipa *FasL* (*FasL*-844 T>C) s razinom citokina i kliničkim nalazima u ispitivanom uzorku hrvatske populacije**

U konačnici je istraženo postojanje povezanosti genotipa *FasL* s razinom citokina i kliničkim pokazateljima bolesti. Rezultati su pokazali usporedivu učestalost T i C alela između grupa ispitanika. Korelirani su *FasL* genotipovi CC, CT i TT s koncentracijom citokina TNF $\alpha$ , IL-10 i kliničkim nalazima (indeks aktivnosti bolesti-DAS28, razina reumatoidnog faktora-RF, razina anticitrulinskih protutijela-anti-CCP, C reaktivni protein-CRP). U ispitivanoj grupi nije bilo statističkih pokazatelja povezanosti bilo kojeg genotipa niti s učestalošću reumatoidnog artritisa niti s kliničkim tijekom, odnosno težinom kliničke slike. Pojedinci s TT genotipom imali su nešto nižu aktivnost bolesti iskazanu s DAS28 u odnosu na ostale skupine, ali bez statistički značajne razlike. Također se nisu statistički značajno razlikovali u koncentracijama citokina. Bolesnici s TT genotipom i CT genotipom bili su nešto češće seropozitivni (83,3% i 80%) u usporedbi s bolesnicima CC genotipa (63,2%) ali razlika nije bila statistički značajna. Ovakav trend može se objasniti ranijim podacima o većoj učestalosti T alela u oboljelih

(15), a sukladan je i studiji Kobaka i sur. koja polimorfizme promotora gena *Fas* i *FasL* ne smatra važnim genetskim čimbenicima predispozicije za RA, ali ih povezuje s produkcijom protutijela odnosno a-CCP pozitivnošću (144). Također se uklapa u rastući broj dokaza da različita genetska podloga utječe na razvoj seropozitivnog i seronegativnog RA kao dva različita entiteta (269). Općenito je malo podataka o interakciji citokina s Fas-FasL sustavom. *In vitro* istraživanja na kulturama stanica pokazala su da TNF $\alpha$  iz aktiviranih T-limfocita tankog crijeva inducira ekspresiju Fas liganda te je predložen potencijalni mehanizam povratne sprege u kojem jedan član TNF superobitelji posreduje regulaciju drugog člana te utječe na limfocitnu infiltraciju i upalu tankog crijeva (270). Poznato je da promjena ekspresije ili funkcije Fas-FasL sustava može pridonijeti perzistentnoj upali u RA regulacijom apoptoze (15). Povećana bazalna ekspresija Fas liganda povezana je s prisustvom C alela u polimorfizmu FasL-844 i ta povećana ekspresija stimulira apoptotsku aktivnost Fas-FasL puta kod bolesnika sa sistemskim lupusom (89). Nije poznato je li ovakav mehanizam u korelaciji s citokinskim profilom oboljelih. Poznato je da su razine TNF $\alpha$  povišene u sinovijalnoj tekućini oboljelih od reumatoidnog artritisa. Nadalje, najnoviji rezultati su pokazali povećan izražaj mFas, a poglavito sFas u FLS nakon stimulacije s TNF $\alpha$  što dovodi do poremećaja apoptoze čime se može utjecati na perzistenciju upale u reumatoidnom artritisu (135). U ovom istraživanju *FasL* genotip (FasL-844 T>C) nije povezan s razinom citokina i kliničkim obilježjima pacijenata u ispitivanom uzorku hrvatske populacije, što je u skladu s ranije objavljenim radovima u kojima se također ne nalaze povezanosti FasL-844 polimorfizma s kliničkim obilježjima bolesnika (15).

### **5.3. Učestalost polimorfizma jednog nukleotida gena *FOXO3* (*FOXO3* T>G, rs12212067) i povezanost s vjerojatnošću oboljevanja od reumatoidnog artritisa**

Prvotna istraživanja identifikacije gena uključenih u razvoj i tijek različitih bolesti u ljudi na britanskoj populaciji nisu povezivala ovaj polimorfizam s predispozicijom za RA (67), ali su kasnije studije utvrdile povezanost G alela s blažim tijekom Chronove bolesti i reumatoidnog artritisa (14). Susljedno je istraživanje praćenjem 5 neovisnih grupa ispitanika (ukupno 2300 ispitanika) pokazalo da se prethodna opservacija iz Velike Britanije ne može ekstrapolirati u druge populacije, jer nije nađena povezanost genetskih varijanti *FOXO3* s tijekom RA kao niti s postizanjem remisije (271). U ovom istraživanju genotipizacijom navedenog polimorfizma nije pronađen niti jedan pacijent s GG genotipom. Usporedba vjerojatnosti oboljevanja od RA za ostala dva genotipa (GT i TT) nije pokazala da bilo koji od njih nosi povišen rizik oboljevanja pri čemu je za GT genotip OR = 1.53, p = 0.3; dok je za TT genotip OR = 0.65, p = 0.3. Ovakvi su rezultati, iako na malom uzorku, konzistentni s rezultatima GWAS studija na britanskoj populaciji. Učestalost pojedinačnog polimorfizma *FOXO3* gena nema utjecaj na rizik oboljevanja od reumatoidnog artritisa u ispitivanom dijelu hrvatske populacije.



### 5.3.1. Povezanost polimorfizma jednog nukleotida rs12212067 (T>G) na *FOXO3* lokusu s razinom citokina i kliničkim nalazima u ispitivanom uzorku hrvatske populacije

Rezultati ovog istraživanja pokazali su usporedivu distribuciju genotipova GT i TT između grupe oboljelih od RA i kontrolne skupine, nakon čega je učinjena korelacija obaju genotipova s koncentracijom citokina TNF $\alpha$  i IL-10 kao i korelacija s kliničkim nalazima. Na ispitivanom uzorku hrvatske populacije nije nađena povezanost razine citokina ili kliničkih nalaza s određenim genotipom ili alelom. Ranijim studijama povezanosti gena s razvojem i tijekom bolesti na uzorku 2985 oboljelih od Chronove bolesti (pri čemu je učinjena analiza 1134 polimorfizma na 81 genu) je dobivena snažna korelacija s tijekom bolesti za SNP rs12212067 (T>G) na *FOXO3* lokusu, koji ranije nije bio povezan s rizikom za autoimune bolesti u ljudi. Pokazalo se da je prisustvo *minor* alela (G) povezano s pokretanjem puta ovisnog o TGF $\beta$ -1 koji u monocitima utječe na smanjenje ekspresije TNF $\alpha$  i nekoliko drugih proupalnih citokina, kao i povećanu ekspresiju IL-10 koji je povezan s protuupalnim učincima (18, 14). Iako nositelji *minor* alela nisu imali veću predispoziciju za Chronovu bolest, pokazala se jasna povezanost s blažim tijekom bolesti. Takva genetska varijacija u kojoj FOXO3 modulira produkciju proupalnih citokina u monocitima mogla bi biti važna i u drugim bolestima čiji patofiziološki mehanizmi uključuju navedene citokine, primjerice reumatoidnom artritisu. Stoga je genotipiziran rs12212067 u prospektivno skupljenim kohortama bolesnika s RA pri čemu su serijski praćeni radiološki nalazi šaka i stopala (14, 103). Utvrđeno je da je *minor* alel (G), koji je povezan s blažim tijekom Chronove bolesti, u ovom slučaju bio povezan s blažim tijekom RA, što je utemeljeno na manjim zglobnim oštećenjima na radiološkim nalazima tijekom vremena, ali razine citokina nisu određivane. Rezultati ovog istraživanja ne pokazuju povezanost G alela s razinom citokina ili pak drugim kliničkim obilježjima čemu zasigurno doprinose manja skupina ispitanika, razlike u promatranim kliničkim obilježjima, te kompleksnost signalne mreže koja regulira produkciju citokina različito za svaku pojedinačnu autoimunu bolest.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Bolesnici s reumatoidnim artritismom imaju povišene serumske razine TNF $\alpha$  i IL-10 u komparaciji s kontrolama, pri čemu je koncentracija TNF $\alpha$  u pozitivnoj korelaciji s koncentracijom IL-10, sedimentacijom eritrocita i razinom C-reaktivnog proteina.
2. SNP FasL-844 T>C (rs763110) nije povezan s vjerojatnošću oboljevanja od reumatoidnog artritisa u ispitivanom uzorku hrvatskih pacijenata. Niti prisutnost pojedinog alela niti bilo koja od tri moguće kombinacije genotipova nisu značajno povezani s rizikom razvoja RA.
3. SNP FasL-844 T>C (rs763110) nije povezan s razinom citokina TNF $\alpha$  i IL-10 kao niti s kliničkim parametrima bolesti u ispitivanom uzorku hrvatskih pacijenata.
4. SNP *FOXO3* gena (FOXO3 T>G, rs12212067) nije povezan s vjerojatnošću oboljevanja od reumatoidnog artritisa u ispitivanom uzorku hrvatskih pacijenata. Niti prisutnost pojedinog alela niti bilo koja od dvije otkrivene kombinacije genotipova nisu povezani s razvojem RA.
5. SNP *FOXO3* gena (FOXO3 T>G, rs12212067) nije povezan s razinom citokina TNF $\alpha$  i IL-10 kao niti s kliničkim parametrima bolesti u ispitivanom uzorku hrvatske populacije.

## 7. POPIS LITERATURE

1. Sweeney SE, Firestein GS (2004) Rheumatoid arthritis: regulation of synovial inflammation. *Int J Biochem Cell Biol* 36:372-8.
2. Firestein GS (2008) Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 423:356-61.
3. Lundkvist J, Kastang F, Kobelt G (2008) The burden of rheumatoid arthritis and access to treatment: health burden and costs. *Eur J Health Econ* 8 Suppl 2:S49-60.
4. Stastny P (1978) Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 298:869-71.
5. Bowes J, Barton A (2008) Recent advances in the genetics of RA susceptibility. *Rheumatology (Oxford)* 47:399-402.
6. Imboden JB (2009) The immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Annu Rev Pathol* 4:417-34.
7. Plant D, Flynn E, Mbarek H *et al* (2010) Investigation of potential non-HLA rheumatoid arthritis susceptibility loci in a European cohort increases the evidence for nine markers. *Ann Rheum Dis* 69:1548-53.
8. Orozco G, Eyre S, Hinks A *et al* (2010) Association of CD40 with rheumatoid arthritis confirmed in a large UK case-control study. *Ann Rheum Dis* 69:813-6.
9. McInnes IB, Schett G (2007) Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 7:429-42.
10. Scott IC, Steer S, Lewis CM, Cope AP (2011) Precipitating and perpetuating factors of rheumatoid arthritis immunopathology: linking the triad of genetic predisposition, environmental risk factors and autoimmunity to disease pathogenesis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 25:447-68.
11. Suzuki A, Yamamoto K (2015) From genetics to functional insights into rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 33:40-3.
12. Manolio TA, Guttmacher AE, Manolio TA (2010) Genomewide association studies and assessment of the risk of disease. *N Engl J Med* 363(2):166-76.

13. Pearson TA, Manolio TA (2008) How to interpret a genome-wide association study. *JAMA* 299(11): 1335-44.
14. Lee JC, Espéli M, Anderson CA, Linterman MA, Pocock JM, Williams NJ, Roberts R, Viatte S, Fu B, Peshu N, Hien TT, Phu NH, Wesley E, Edwards C, Ahmad T, Mansfield JC, Garry R, Dunstan S, Williams TN, Barton A, Vinuesa CG; UK IBD Genetics Consortium, Parkes M, Lyons PA, Smith KG (2013) Human SNP links differential outcomes in inflammatory and infectious disease to a FOXO3-regulated pathway. *Cell* 155:57-69.
15. Yıldıır S, Sezgin M, Barlas İÖ, Türköz G, Ankaralı HÇ, Şahin G, Erdal ME (2013) Relation of the Fas and FasL gene polymorphisms with susceptibility to and severity of rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 33:2637-45.
16. Jonsson H, Allen P, Peng SL (2005) Inflammatory arthritis requires Foxo3a to prevent Fas ligand-induced neutrophil apoptosis. *Nat Med* 11:666-71.
17. Turrel-Davin F, Tournadre A, Pachot A, Arnaud B, Cazalis MA, Mougin B, Miossec P (2010) FoxO3a involved in neutrophil and T cell survival is overexpressed in rheumatoid blood and synovial tissue. *Ann Rheum Dis* 69:755-60.
18. Gregersen PK, Manjarrez-Orduno Nataly (2013) FOXO in the Hole: Leveraging GWAS for Outcome and Function. *Cell* 155:11-12.
19. Wang T, Zheng XJ i sur (2015) Clinical features of rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease. *Sci Rep* 5: 14897.
20. Prasad M, Hermann J, Gabriel SE i sur (2015) Cardiorheumatology: cardiac involvement in systemic rheumatic disease. *Nat Rev Cardiol* 12(3): 168-76.
21. Smolen JS, Aletaha D, Redlich K (2012) The pathogenesis of rheumatoid arthritis: new insights from old clinical data? *Nature Rev Rheumatol* 8:235-43.
22. Stipić Marković A (2012) Immunopathophysiology of rheumatoid arthritis. U: *Book of Abstracts, 2<sup>nd</sup> International Conference of Regenerative Orthopedics and Tissue Engineering*, Opatija, 35-36.
23. Ronnelid J i sur (1998) Production of T-cell cytokines at the single-cell level in patients with inflammatory arthritides: enhanced activity in synovial fluid compared to blood. *Br J Rheumatol* 37: 7–14.
24. Tak PP, Bresnihan B (2000) The pathogenesis and prevention of joint damage in rheumatoid arthritis: advances from synovial biopsy and tissue analysis. *Arthritis Rheum* 43:2619-2633.

25. Athanasou NA (1995) Synovial macrophages. *Ann Rheum Dis* 54:392-4.
26. Knedla A, Neumann E, Muller-Ladner U (2007) Developments in the synovial biology field. *Arthritis Res Ther* 9:209.
27. Muller-Ladner U, Ospelt C, Gay S, Distler O, Pap T (2007) Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther* 9:223.
28. Lee JW, Ok MR, Lee S, Lim JI (2015) Detecting changes in arthritic fibroblast-like synoviocytes using atomic force microscopy. *Microsc Res Tec* 78(11): 982-8.
29. Santiago B, Calonge E, Del Rey MJ i sur (2011) CXCL12 gene expression is upregulated by hypoxia and growth arrest but not by inflammatory cytokines in rheumatoid synovial fibroblasts. *Cytokine* 53:184-90.
30. Huh YH, Lee G, Song WH, Koh JT, Ryu JH (2015) Crosstalk between FLS and chondrocytes is regulated by HIF-2 $\alpha$ -mediated cytokines in arthritis. *Exp Mol Med* 4: 47.
31. Lipsky PE (2007) Why does rheumatoid arthritis involve the joints? *N Engl J Med* 356(23):2419-20.
32. Roberts CA, Dickinson AK, Taams LS (2015) The interplay between monocytes/macrophages and CD4+ T cell subsets in rheumatoid arthritis. *Front Immunol* 6: 571.
33. Ranjany T, Kelli PA i sur (1999) Dendritic cells and the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Journal of Leukocyte Biology* 66: 286-292
34. Taneja V (2015) Cytokines pre-determined by genetic factors are involved in pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Cytokine* 75(2): 216-21.
35. Klareskog L, Padyukov L, Alfredsson L (2007) Smoking as a trigger for inflammatory rheumatic diseases. *Curr Opin Rheumatol* 19: 49-54.
36. Clifton O, Bingham III, Malini M (2013) Periodontal disease and rheumatoid arthritis: The evidence accumulates for complex pathobiologic interactions. *Curr Opin Rheumatol* 25(3):345-353.
37. Panayi GS (2011) Developments in the immunology of rheumatoid arthritis, a personal perspective. *Rheumatology* 50(5):815-7.
38. Brusca SB, Abramson SB, Scher JU (2014) Microbiome and mucosal inflammation as extra-articular triggers for rheumatoid arthritis and autoimmunity. *Curr Opin Rheumatol* 26(1): 101-107.
39. Van der Woude D, Alemayehu WG, Verduijn W, de Vries RR, Houwing-Duistermaat JJ, Huizinga TW, i sur (2010) Gene–environment interaction influences the reactivity of autoantibodies to citrullinated antigens in rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 42(10):814–816.

40. Lawrence JS (1970) Rheumatoid arthritis—nature or nurture? *Ann Rheum Dis* 29:357–379.
41. Del Junco D, Luthra HS, Annegers JF, Worthington JW, Kurland LT (1984) The familial aggregation of rheumatoid arthritis and its relationship to the HLA-DR4 association. *Am J Epidemiol.* 119:813–829.
42. Hemminki K, Li X, Sundquist J, Sundquist K (2009) Familial associations of rheumatoid arthritis with autoimmune diseases and related conditions. *Arthritis Rheum* 60:661–668.
43. Jones MA, Silman AJ, Whiting S, Barrett EM, Symmons DP (1996) Occurrence of rheumatoid arthritis is not increased in the first degree relatives of a population based inception cohort of inflammatory polyarthritis. *Ann Rheum Dis* 55:89–93.
44. MacGregor AJ *et al* (2000) Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum* 43:30–37.
45. Cutolo M (2007) Sex and rheumatoid arthritis: mouse model versus human disease. *Arthritis Rheum.* 56:1–3.
46. Luckey D, Medina K, Taneja V (2012) B cells as effectors and regulators of sex-biased arthritis. *Autoimmunity* 45:364–376.
47. Eyre S *et al* (2012) High-density genetic mapping identifies new susceptibility loci for rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 44:1336–1340.
48. Carrel L, Willard HF (2005) X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature* 434:400–404.
49. Stastny P, Fink CW (1977) HLA-Dw4 in adult and juvenile rheumatoid arthritis. *Transplant Proc* 9:1863–1866
50. Deighton CM, Walker DJ, Griffiths ID, Roberts DF (1989) The contribution of HLA to rheumatoid arthritis. *Clin Genet* 36:178–182.
51. Rigby AS, Silman AJ, Voelm L, Gregory JC, Ollier WE, Khan MA, Nepom GT, Thomson G (1991) Investigating the HLA component in rheumatoid arthritis: an additive (dominant) mode of inheritance is rejected, a recessive mode is preferred. *Genet Epidemiol* 8:153–175.
52. McMichael AJ, Sasazuki T, McDevitt HO *et al* Payne RO (1977) Increased frequency of HLA-Cw3 and HLA-Dw4 in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 20: 1037–1042.
53. Kochi Y, Suzuki A, Yamada R *et al* Yamamoto K (2010) Ethnogenetic heterogeneity of rheumatoid arthritis-implications for pathogenesis. *Nat Rev Rheumatol* 6: 290–295.

54. Gregersen PK, Silver J i Winchester RJ (1987) The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 30: 1205–1213.
55. Raychaudhuri S, Sandor C, Stahl EA, Freudenberg J, Lee HS, Jia X, Alfredsson L, Padyukov L, Klareskog L, Worthington J, Siminovitch KA, Bae SC, Plenge RM, Gregersen PK i de Bakker PI (2012) Five amino acids in three HLA proteins explain most of the association between MHC and seropositive rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 44: 291–296.
56. Raychaudhuri S (2010) Recent advances in the genetics of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 22:109–118.
57. Bax M, van HJ, Huizinga TW, Toes RE (2011) Genetics of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Immunogenetics* 63:459–466.
58. Kunz M, Ibrahim SM (2011) Non-major histocompatibility complex rheumatoid arthritis susceptibility genes. *Crit Rev Immunol* 31:99–114.
59. Visscher PM, Brown MA, McCarthy MI, Yang J (2012) Five years of GWAS discovery. *Am J Hum Genet* 90:7–24.
60. Suzuki A, et al (2003) Functional haplotypes of PADI4 , encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 34:395–402.
61. Begovich AB i sur (2004) A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase ( PTPN22 ) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet.* 75:330–337.
62. Plenge RM i sur (2005) Replication of putative candidate-gene associations with rheumatoid arthritis in >4,000 samples from North America and Sweden: association of susceptibility with PTPN22 , CTLA4 , and PADI4 . *Am J Hum Genet* 77:1044–1060.
63. Kurreeman FA i sur (2007) A candidate gene approach identifies the TRAF1/C5 region as a risk factor for rheumatoid arthritis. *PLoS Med* 4:e278.
64. Kochi Y i sur (2005) A functional variant in FCRL3 , encoding Fc receptor-like 3, is associated with rheumatoid arthritis and several autoimmunities. *Nat Genet* 37:478–485.
65. Plenge RM i sur (2007) Two independent alleles at 6q23 associated with risk of rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 39:1477–1482.
66. Plenge RM i sur (2007) TRAF1-C5 as a risk locus for rheumatoid arthritis—a genome-wide study. *N Engl J Med* 357:1199–1209.
67. WTCCC (2007) Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 447:661–678.



68. Stahl EA i sur (2010) Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. *Nat Genet* 42:508–514.
69. Okada Y i sur (2012) Meta-analysis identifies nine new loci associated with rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Nat Genet* 44:511–516.
70. Splawski JB, Fu SM, Lipsky PE (1993) Immunoregulatory role of CD40 in human B cell differentiation. *J Immunol* 150(4): 1276-85.
71. Berner B, Wolf G, Hummel KM, Muller GA, reuss-Borst MA (2000) Increased expression of CD40 ligand (CD154) on CD4+ T cells as a marker of disease activity in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 59(3): 190-5.
72. Asaga H, Nakashima K, Senshu T, Ishigami A i Yamada M (2001) Immunocytochemical localization of peptidylarginine deiminase in human eosinophils and neutrophils. *J Leukoc Biol* 70: 46 –51.
73. Chang X, Yamad, R, Suzuki A, Sawada T, Yoshino S, Tokuhiko S i Yamamoto K (2005) Localization of peptidylarginine deiminase 4 (PADI4) and citrullinated protein in synovial tissue of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 44: 40-50.
74. Iwamoto T, Ikari K, Nakamura T, Kuwahara M, Toyama Y, Tomatsu T, Momohara S i Kamatani N (2006) Association between PADI4 and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Rheumatology (Oxford)* 45: 804–807.
75. Klareskog L, Padyukov L, Ronnelid J i Alfredsson L (2006) Genes, environment and immunity in the development of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Immunol* 18: 650–655.
76. Zheng J, Ibrahim S, Petersen F i Yu X (2012) Meta-analysis reveals an association of PTPN22 C1858T with autoimmune diseases, which depends on the localization of the affected tissue. *Genes Immun* 13: 641–652.
77. Maine CJ, Hamilton-Williams EE, Cheung J i sur (2012) PTPN22 alters the development of regulatory T cells in the thymus. *J Immunol* 188(11): 5267-75.
78. Kochi Y, Okada Y, Suzuki A, Ikari K i sur (2010) A regulatory variant in CCR6 is associated with rheumatoid arthritis susceptibility. *Nat Genet* 42: 515–519.
79. Hirota K, Yoshitomi H, Hashimoto M i sur (2007) Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. *J Exp Med* 204: 2803–2812.
80. Walunas TL, Bakker CY, Bluestone JA (1996). CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. *J. Exp. Med.* 183 (6): 2541–50.



81. Ueda H, Howson JM, Esposito L, Heward J, Snook H, Chamberlain G, Rainbow DB i sur (2003) Association of the Tcell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 423:506–511
82. Rodriguez MR, Nunez-Roldan A, Aguilar F, Valenzuela A, Garcia A, Gonzalez-Escribano MF (2002) Association of the CTLA4 3 untranslated region polymorphism with the susceptibility to rheumatoid arthritis. *Hum Immunol* 63:76– 81.
83. Maini RN, Zvaifler NJ (1994) Rheumatoid arthritis and sponyloarthropathy. U: Klippel JH, Dieppe PA (eds) *Rheumatology*. Mosby, St Louis, 1-4.
84. Sumida T, Hasunuma T, Asahara H, Maeda T, Nishioka K (1998) Rheumatoid arthritis and apoptosis. *Intern Med* 37:184–188.
85. Nishioka K, Hasunuma T, Kato T, Sumida T, Kobata T (1998) Apoptosis in rheumatoid arthritis: a novel pathway in the regulation of synovial tissue. *Arthritis Rheum* 41:1–9.
86. Nakajima T, Aono H, Hasunuma T, Yamamoto K, Shirai T, Hirohata K i sur (1995) Apoptosis and functional Fas antigen in rheumatoid arthritis synoviocytes. *Arthritis Rheum* 38:485–491.
87. Asahara H, Hasumuna T, Kobata T, Yagita H, Okumura K, Inoue H i sur (1996) Expression of Fas antigen and Fas ligand in the rheumatoid synovial tissue. *Clin Immunol Immunopathol* 81: 27–34.
88. Sibley K, Rollinson S, Allan JM, Smith AG, Law GR, Roddam PL i sur (2003) Functional FAS promoter polymorphisms are associated with increased risk of acute myeloid leukemia. *Cancer Res* 63:4327–4330.
89. Wu J, Metz C, Xu X, Abe R, Gibson AW, Edberg JC i sur (2003) A novel polymorphic CAAT/enhancer-binding protein b element in the FasL gene promoter alters Fas ligand expression: a candidate background gene in African American systemic lupus erythematosus patients. *J Immunol* 170:132–138.
90. Liew FY, McInnes IB (2005) A fork in the pathway to inflammation and arthritis. *Nature Med* 11:601-602.
91. Leavy Olive (2013) SNPing at *FOXO3* to limit inflammation. *Nat Rev Immunol* 13(11): 771.
92. Miossec P (2014) Rheumatoid arthritis in 2013. *Translational medicine in RA: time for change*. *Nat Rev Rheumato.* 10: 74–76.
93. Tuteja G, Kaestner KH (2007) Snapshot: forkhead transcription factors 1. *Cell* 130(6): 1160.

94. Zaret KS, Carroll JS (2011) Pioneer transcription factors: establishing competence for gene expression. *Genes Dev* 25(21): 2227-41.
95. Lehmann OJ, Sowden JC (2003) Fox's in development and disease. *Trends in Genetics* 19(6): 339-344.
96. Hu MC, Lee DF i sur (2004) Ikappa B kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3. *Cell* 117: 225-237.
97. Calnan DR, Brunet A (2008) The FoxO code. *Oncogene* 27:2276-2288)
98. Riou C, Yassine-Diab B i sur (2007) Convergence of TCR and cytokine signaling leads to FOXO3 phosphorylation and drives the survival of CD4+ central memory T cells. *J Exp Med* 204:79-91.
99. Lin L, Hron JD, Peng SL (2004) Regulation of NF-kappaB, Th activation, and autoinflammation by the forkhead transcription factor FOXO3. *Immunity* 21: 203-13.
100. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, Lee JC, Schumm LP, Sharma Y, Anderson CA i sur (2012) International IBD Genetics Consortium (IIBDGC). Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* 491: 119–124.
101. McClellan J i King MC (2010) Genetic heterogeneity in human disease. *Cell* 141: 210–217.
102. Feldmann M i Maini SR (2008) Role of cytokines in rheumatoid arthritis: an education in pathophysiology and therapeutics. *Immunol Rev* 223: 7–19.
103. Symmons DP i Silman AJ (2003) The Norfolk Arthritis Register (NOAR). *Clin Exp Rheumatol* 21(5): 94–99.
104. James D, Young A, Kulinskaya E, Knight E, Thompson W, Ollier W i Dixey J (2004) Early Rheumatoid Arthritis Study Group (ERAS), UK. Orthopaedic intervention in early rheumatoid arthritis. Occurrence and predictive factors in an inception cohort of 1064 patients followed for 5 years. *Rheumatology (Oxford)* 43: 369–376.
105. Boini S, Guillemin F (2001) Radiographic scoring methods as outcome measures in rheumatoid arthritis: properties and advantages. *Ann Rheum Dis* 2011 60: 817-827.
106. Hassin D, Garber OG, Meiraz A, Schiienbauer YS, Berke G (2011) Cytotoxic T lymphocyte perforin and Fas ligand working in concert even when Fas ligand lytic action is still not detectable. *Immunology* 133(2): 190-6.
107. Matsumoto H, Murakami Y i sur (2015) Membrane-bound and soluble Fas ligands have opposite functions in photoreceptor cell death following separation from the retinal pigment epithelium. *Cell death Dis* 19:6.

108. Inazawa J, Itah N, Abe T, Nagata S (1992) Assignment of the human Fas antigen gene (Fas) to 10q24.1. *Genomics* 14(3):821-2.
109. Green DR, Llambi F (2015) Cell Death Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7(12).
110. Žlender V (2003) Apoptoza-programirana smrt stanice. *Arh Hig Rada Toksikol* 54: 267-274.
111. Köhler C, Sten O, Boris Z (2002) Evaluation of caspase activity in apoptotic cells. *J Immunol Methods* 265: 97111.
112. Choi C, Chae C (2002) Expression of tumour necrosis factor- $\alpha$  is associated with apoptosis in lungs of pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Res Vet Sci* 72:45-9.
113. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM (1995) FADD, a novel death domain containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81(4): 505-512.
114. Faubion W, Gores G (1999) Death receptors in liver biology and pathobiology. *Hepatology* 29:1-4.
115. Vaux DL (2002) Apoptosis and toxicology-what relevance? *Toxicology* 181-182: 3-7.
116. Wang L, Wang FS, Gershwin ME (2015) Human autoimmune diseases: a comprehensive update. *J Intern Med* 278(4): 369-95.
117. Andrade F, Casciola-Rosen L, i Rosen A (2000) Apoptosis in systemic lupus erythematosus: clinical implications. *Rheumatic Disease Clinics of North America* 26(2): 215–227.
118. Munoz LE, Van Bavel C, Franz S, Berden J, Herrmann M, i Van Der Vlag J (2008) Apoptosis in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Lupus* 17(5): 371–375.
119. Nagata S i Suda T (1995) Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations. *Immunology Today* 16(1): 39–43.
120. Wu J, Zhou T, he J, Mountz JD (1993) Autoimmune disease in mice due to integration of an endogenous retrovirus in an apoptosis gene. *J Exp Med* 178:461-8.
121. Ren Y, Tang J, Mok MY, Chan AWK, Wu A i Lau CS (2003) Increased apoptotic neutrophils and macrophages and impaired macrophage phagocytic clearance of apoptotic neutrophils in systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism* 48(10): 2888–2897.
122. Fukuyama H, Adachi M, Suematsu S i sur (2002) Requirement of FAS expression in B cells for tolerance induction. *European Journal of Immunology* 32: 223–230.

123. Mor A, Abramson SB, Pillinger MH (2005) The fibroblast-like synovial cell in rheumatoid arthritis: a key player in inflammation and joint destruction. *Clin Immunol* 115(2): 118-28.
124. Hashimoto H, Tanaka M, Suda T, Tomita T, Hayashida K, Takeuchi E I sur (1998) Soluble Fas ligand in the joints of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 41(4): 657-62.
125. Drynda A, Quax PH i sur (2005) Gene transfer of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 reverses the inhibitory effects of TNF-alpha on Fas-induced apoptosis in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *J Immunol* 174:6524-31.
126. Peng SL (2006) Fas(CD95)-related apoptosis in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 45(1): 26-30.
127. Kobayashi T, Okamoto K, Kobata T i sur (2000) Differential regulation of Fas-mediated apoptosis of rheumatoid synoviocytes by tumor necrosis factor alpha and basic fibroblast growth factor is associated with the expression of apoptosis-related molecules. *Arthritis Rheum* 43(5):1106-14.
128. Santiago B, Galindo M, Rivero M, Pablos JL (2001) Decreased susceptibility to Fas-induced apoptosis of systemic sclerosis dermal fibroblasts. *Arthritis Rheum* 44(7): 1667-76.
129. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C i sur (1998) Two CD95 (APO-1/Fas) signalling pathways. *EMBO J* 17:1675-87
130. Ogawa Y, Kuwahara H, Kimura T, Tani Y, Yonehara S, Shiraishi A i sur (2001) Therapeutic effect of anti-Fas antibody on a collagen induced arthritis model. *J Rheumatol* 28(5): 950-5.
131. Zhang H, Yang Y, Horton JL; Samoilova EB, Judge TA, Turka LA i sur (1997) Amelioration of collagen-induced arthritis by CD95 gene transfer. *J Clin Invest* 100(8): 1951-7.
132. Kim SH, Kim S, Oligino TJ, Robbins PD (2002) Effective treatment of established mouse collagen-induced arthritis by systemic administration of dendritic cells genetically modified to express FasL. *Mol Ther* 6(5): 584-90.
133. Audo R, Calman-Hamaty F, Papon I, Combe B, Morel J, Hahne M (2014) Distinct effects of soluble and membrane bound Fas ligand in fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheumatol* 66(12): 3289-99.
134. Calmon-Hamaty F, Audo R, Combe B, Morel J, Hahne M (2015) Targeting the Fas/FasL system in Rheumatoid Arthritis therapy: Promising or risky? *Cytokine* 75: 228-233.

135. Hong S, Kim EJ, Lee EJ, Koo BS, Ahn SM, Bae SH, Lim DH, Kim YG, Yoo B, Lee CK (2015) TNF $\alpha$  confers resistance to Fas-mediated apoptosis in rheumatoid arthritis through the induction of soluble Fas. *Life Sciences* 122: 37-41.
136. Fukuyama H, Adachi M, Suematsu S i sur (1994) Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by point mutation in the Fas ligand. *Cell* 76(6): 969-976.
137. Suzuki N, Sakane T (1996) Abnormal Fas and Fas ligand in expression of lymphocytes in patients with SLE. *Japanese Journal of Clinical Medicine* 54(7): 1955-1959.
138. Wu J, Wilson J, He J, Xiang L, Schur PH, Mountz DJ (1996) Fas ligand mutation in a patient with systemic lupus erythematosus and lymphoproliferative disease. *Journal of Clinical Investigation* 98(5): 1107–1113.
139. Huang QR, Morris D, Manolios N (1997) Identification and characterisation of polymorphisms in the promoter region of the human Apo-1/Fas (CD95) gene. *Molecular Immunology* 34(8-9): 577–582.
140. Huang QH, Danis V, Lassere M, Edmonds J, Manolios N (1999) Evaluation of a new Apo-1/Fas promoter polymorphism in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus patients. *Rheumatology* 38(7): 645–651.
141. Kanemitsu S, Ihara K, Saifddin A i sur (2002) A functional polymorphism in Fas(CD95/APO-1) gene promoter associated with systemic lupus erythematosus. *Journal of Rheumatology* 29(6): 1183-1188.
142. Moudi B, Salimi S, Mashhadi FF, Sandoughi M, Zakeri Z (2013) Association of Fas and Fas ligand genes polymorphism and risc of systemic lupus erythematosus. *The Scientific World Journal* 2013: Article ID 176741, 6 stranica.
143. Mohammadzadeh A, Pourfathollah AA, Tahoori MT, Daneshmandi S, Langroudi L, Akhlaghi M (2011) Evaluation of apoptosis-related gene Fas (CD95) and FasL (CD178) polymorphisms in Iranian rheumatoid arthritis patients. *Rheumatol Int* 32(9):2833.6.
144. Kobak S, Berdeli A (2012) Fas/FasL promoter gene polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. *Reumatismo* 64:374–379.
145. Williams RO, Mason LJ, Feldmann M i Maini RN (1994) Synergy between anti-CD4 and antitumor necrosis factor in the amelioration of established collagen-induced arthritis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91: 2762–2766.
146. Shouda T i sur (2001) Induction of the cytokine signal regulator SOCS3/CIS3 as a therapeutic strategy for treating inflammatory arthritis. *J Clin Invest* 108: 1781–1788.
147. Schulze-Koops H i Kalden JR (2001) The balance of Th1/Th2 cytokines in rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 15: 677–691.

148. Lubberts E, Koenders MI i van den Berg WB (2005) The role of T-cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models. *Arthritis Res Ther* 7: 29–37.
149. Hirota K i sur (2007) T cell self-reactivity forms a cytokine milieu for spontaneous development of IL-17+ Th cells that cause autoimmune arthritis. *J Exp Med* 204: 41–47.
150. Raza K i sur (2005) Early rheumatoid arthritis is characterized by a distinct and transient synovial fluid cytokine profile of T cell and stromal cell origin. *Arthritis Res Ther* 7: 784–795.
151. Ehrenstein MR i sur (2004) Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNF $\alpha$  therapy. *J Exp Med* 200: 277–285.
152. Nadkarni S, Mauri C i Ehrenstein MR (2007) AntiTNF- $\alpha$  therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF- $\beta$ . *J Exp Med* 204: 33–39.
153. Kim GW, Lee NR, Pi RH, Lim YS, Lee YM, Lee JM, Jeong HS, Chung SH (2015) IL-6 inhibitors for treatment of rheumatoid arthritis: past, present and future. *Arch Pharm Res* 38(5): 575-84.
154. Sarkissian M, Lafyatis R (1998) Transforming growth factor-beta and platelet derived growth factor regulation of fibrillar fibronectin matrix formation by synovial fibroblasts. *J Rheumatol* (25): 613–22.
155. Massague J (1990) The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol* 6: 597–641.
156. Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M i sur (1992) Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 359:693–9.
157. Dickson MC, Martin JS, Cousins FM, Kulkarni AB, Karlsson S, Akhurst RJ (1995) Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knockout mice. *Development* 121:1845–54.
158. Kuruvilla AP, Shah R, Hochwald GM, Liggitt HD, Palladino MA, Thorbecke GJ (1991) Protective effect of transforming growth factor beta 1 on experimental autoimmune diseases in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:2918–21.
159. Song XY, Gu M, Jin WW, Klinman DM, Wahl SM (1998) Plasmid DNA encoding transforming growth factor-beta1 suppresses chronic disease in a streptococcal cell wall-induced arthritis model. *J Clin Invest* 101:2615–21.
160. Marinova-Mutafchieva L, Gabay C, Funa K, Williams RO (2006) Remission of collagen induced arthritis is associated with high levels of transforming growth factor beta expression in the joint. *Clin Exp Immunol* 146:287–93.

161. Van Beuningen HM, van der Kraan PM, Arntz OJ, van den Berg WB (1994) Transforming growth factor-beta 1 stimulates articular chondrocyte proteoglycan synthesis and induces osteophyte formation in the murine knee joint. *Lab Invest.* 71:279–90.
162. Carrier Y, Yuan J, Kuchroo VK, Weiner H (2007) Th3 cells in peripheral tolerance. II. TGF-beta-transgenic Th3 cells rescue IL-2-deficient mice from autoimmunity. *J Immunol* 178:172–8.
163. Kehrl JH, Wakefield LM, Roberts AB, Jakowlew S, Alvarez-Mon M, Derynck R i sur (1998) Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J Exp Med* 163:1037–50.
164. Cheon H, Yu SJ, Yoo DH, Chae IJ, Song GG, Sohn J (2002) Increased expression of proinflammatory cytokines and metalloproteinase-1 by TGF-beta1 in synovial fibroblasts from rheumatoid arthritis and normal individuals. *Clin Exp Immunol* 127: 547–52.
165. Berse B, Hunt JA, Diegel RJ, Morganelli P, Yeo K, Brown F i sur (1999) Hypoxia augments cytokine (transforming growth factor-beta (TGF-beta) and IL-1)-induced vascular endothelial growth factor secretion by human synovial fibroblasts. *Clin Exp Immunol* 115: 176–82.
166. Kim G, Jun JB, Elkon KB (2002) Necessary role of phosphatidylinositol 3-kinase in transforming growth factor beta-mediated activation of Akt in normal and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 46:1504–11.
167. Liu Y, Zhang P, Li J, Kulkarni AB, Perruche S, Chen W (2008) A critical function for TGF beta signaling in the development of natural CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat Immunol* 9:632–40.
168. Ouyang W, Beckett O, Ma Q, Li MO (2010) Transforming growth factor-beta signaling curbs thymic negative selection promoting regulatory T cell development. *Immunity* 32:642–53.
169. Headland SE, Jones HR, Norling LV, Kim A, Souza PR, Corsiero E, Gil CD, Nerviani A, Dell'Accio F, Pitzalis C, Oliani SM, Jan LY, Perretti M (2015) Neutrophil-derived microvesicles enter cartilage and protect the joint in inflammatory arthritis. *Sci Transl Med* 25(7): 315.
170. Xu X, Zheng L, Bian Q, Xie L, Liu W, Zhen G, Crane JL, Zhou X, Cao X (2015) Aberrant activation of TGF- $\beta$  in subchondral bone at the onset of rheumatoid arthritis joint destruction. *J Bone Miner Res* 30(11): 2033–43.
171. 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(2): 120–8.



172. Mosser DM, Zhang X (2008) Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunological reviews* 226(1):205-18
173. Gastl GA, Abrams JS, Nanus DM, Oosterkamp R, Silver J, Liu F i sur(1993) Interleukin-10 production by human carcinoma cell lines and its relationship to interleukin-6 expression. *Int J Cancer* 55:96–101.
174. Pisa P, Halapi E, Pisa EK, Gerdin E, Hising C, Bucht A i sur (1992) Selective expression of interleukin 10, interferon-gamma and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in ovarian cancer biosies. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:7708–12.
175. Henningsson L, Eneljung T, Jirholt P, Tengvall S, Lidberg U, van den Berg WB, van de Loo FA, Gjertsson I (2012) Disease-dependent local IL-10 production ameliorates collagen induced arthritis in mice. *PLoS One* 7:e49731
176. Chadban SJ, Tesch GH, Foti R, Lan HY, Atkins RC, Nikolic-Paterson DJ (1998) Interleukin-10 differetially modulates MHC class II expression by mesangial cells and macrophages in vitro and in vivo. *Immunology* 94(1): 72-78
177. Malisan F, Brire F, Bridon JM, Harindranath N, Mius FC, Max EE i sur (1996) Interleukin-10 induces immunoglobulin G isotype switch recombination in human CD40-activated naïve B lymphocytes. *J Exp Med* 183(3): 937-947.
178. Tian G, Jiao-Long L, De-Guang W, Dian Z (2014) Targeting IL-10 in autoimmune diseases. *Cell Biochemistry and Biophysics* 70:37-49
179. Kasama T, Strieter RM, Lukacs NW, Lincoln PM, Burdick MD, Kunkel SL (1995) Interleukin 10 expression and chemokine regulation during the evolution of murine type II collagen induced arthritis. *J Clin Invest* 95:2868–76.
180. Carter NA, Rosser EC, Mauri C (2012) Interleukin-10 produced by B cells is crucial for the suppression of Th17/Th1 responses, induction of T regulatory type 1 cells and reduction of collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther* 14:R32.
181. Walmsley M, Katsikis PD, Abney E i sur (1996) Interleukin- 10 inhibition of the progression of established collageninduced arthritis. *Arthritis Rheum* 39: 495–503.
182. Joosten LAB, Lubberts E, Durez P i sur (1997) Role of interleukin-4 and interleukin-10 in murine collageninduced arthritis: Protective effect of interleukin-4 and interleukin-10 treatment on cartilage destruction. *Arthritis Rheum* 40: 249–60.
183. Kasama T, Yamazaki J, Hanaoka R i sur (1999) Biphasic regulation of the development of murine type II collagen-induced arthritis by interleukin-12: Possible involvement of endogenous interleukin-10 and tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Rheum* 42:100–9.



184. Katsikis PD, Chu C-Q, Brennan FM, Maini RN, Feldmann M (1994) Immunoregulatory role of interleukin 10 in rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 179:1517–27.
185. Chomarat P, Banchereau J, Miossec P (1995) Differential effects of interleukins 10 and 4 on the production of interleukin-6 by blood and synovium monocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 38: 1046–54.
186. Kawakami A, Eguchi K, Matsuoka N i sur (1997) Inhibitory effects of interleukin-10 on synovial cells of rheumatoid arthritis. *Immunology* 91:252–9.
187. Cohen SBA, Katsikis PD, Chu C i sur (1995) High level of interleukin-10 production by the activated T cell population within the rheumatoid synovial membrane. *Arthritis Rheum* 38:946–52.
188. Morita Y, Yamamura M, Kawashima M i sur (1998) Flow cytometric single-cell analysis of cytokine production by CD4+ T cells in synovial tissue and peripheral blood from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 41: 1669–76.
189. Reparon-Schuijt CC, van Esch WJE, van Kooten C, Levarht EWN, Breedveld FC, Verweij CL (1998) Functional analysis of rheumatoid factor-producing B cells from the synovial fluid of rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* 41: 2211–20.
190. Cush JJ, Splawski JB, Thomas R i sur (1995) Elevated interleukin-10 levels in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 38: 96–104.
191. Isomäki P, Luukkainen R, Saario R, Toivanen P, Punnonen J (1996) Interleukin-10 functions as an antiinflammatory cytokine in rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 39: 386–95.
192. Avrănescu C, Vere CC, Margaritescu CL, Turculeanu A, Balasoiu M, Rogoz S (1995) Cytokinic panel in rheumatoid arthritis and correlation with histological patterns of synovitis – active type of disease. *Rom J Morphol Embryol* 46:87–92.
193. Wright HL, Bucknall RC, Moots RJ, Edwards SW (2012) Analysis of SF and plasma cytokines provides insights into the mechanisms of inflammatory arthritis and may predict response to therapy. *Rheumatology* 51: 451-459.
194. Wang X, Dong L, Liang Y i sur (2015) Performance evaluation of flowcytomix assays to quantify cytokines in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Clin Exp Med* 8(9): 16158-16166.
195. Vermeij EA, Broeren MG, Bennink MB i sur (2015) Disease-regulated local IL-10 gene therapy diminishes synovitis and cartilage proteoglycan depletion in experimental arthritis. *Ann Rheum Dis* 24(11): 2084-91.

196. Brennan FM (1999) Interleukin 10 and arthritis. *Rheumatology* 38: 293-297.
197. Atta DS, Girbash EF, Abdelwahab SM, Abdeldayem HM, Tharwat I, Ggonaim R (2015) Maternal cytokines and disease severity influence pregnancy outcomes in women with rheumatoid arthritis. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2:1-17.
198. Ferguson-Smith AC, Chen YF, Newman MS, May LT, Sehgal PB, Ruddle FH (1988) Regional localization of the interferon-beta 2/B-cell stimulatory factor 2/hepatocyte stimulating factor gene to human chromosome 7p15-p21. *Genomics* 2(3): 203-8.
199. Yoshizaki K, Nakagawa T, Kaieda T, Muraguchi A, Yamamura Y and Kishimoto T (1982) Induction of proliferation and Ig production in human B leukemic cells by anti-immunoglobulins and T cell factors. *The Journal of Immunology* 128(3), 1296–1301.
200. Kishimoto T (1985) Factors affecting B-cell growth and differentiation. *Annual Review of Immunology* 3: 133–157.
201. Van der Poll T, Keogh CV, Guirao X, Buurman WA, Kopf M, Lowry SF (1997) Interleukin-6 gene-deficient mice show impaired defense against pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis* 176(2): 439-44.
202. Banks WA, Kastin AJ, Gutierrez EG (1994) Penetration of interleukin-6 across the murine blood-brain barrier. *Neurosci Lett* 179(1-2): 53-6.
203. Heinrich PC, Castell JV, Andus T (1990) Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 265(3): 621-636.
204. Bastard J, Jardel C, Delattre J, Hainque B i sur (1999) Evidence for a link between adipose tissue interleukin-6 content and serum C-reactive protein concentrations in obese subjects. *Circulation* 99(16): 2219-2222.
205. Taga T, Hibi M, Hirata Y i sur (1989) Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell* 58(3): 573–581.
206. Rose-John S (2012) IL-6trans-signaling via the solubleIL-6 receptor: importance for the proinflammatory activities of IL-6. *International Journal of Biological Sciences* 8(9): 1237–1247.
207. Akira S, Nishio Y, Inoueetal M (1994) Molecular cloning of APRE, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway. *Cell* 77(1): 63–71.
208. Gerhartz C, Heesel B, Sasse J i sur (1996) Differential activation of acute phase response factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130: I.Definition of a novel phosphotyrosine motif mediating STAT1 activation. *The Journal of Biological Chemistry* 271(22): 12991–12998.

209. Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, i Mills GB (2005) Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* 4(12): 988–1004.
210. Chien CM, Lin KL, Su JC i sur (2010) Naphtho[1,2-b]furan4,5-dione induces apoptosis of oral squamous cell carcinoma: involvement of EGFreceptor/PI3K/Akt signaling pathway. *The European Journal of Pharmacology* 636(1–3): 52–58.
211. Suematsu S, Matsuda T, Aozasaetal K (1989) IgG1plasmacytosis in interleukin 6 transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86(19): 7547–7551.
212. Rinc'on M, Anguita J, Nakamura T, Fikrig E i Flavell RA. Interleukin(IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells. *The Journal of Experimental Medicine* 185(3): 461–469.
213. Korn T, Bettelli E, Oukka M i Kuchroo VM (2009) IL-17 and Th17 cells. *Annual Review of Immunology* 27: 485–517.
214. Kimura A i Kishimoto T (2010) IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *European Journal of Immunology* 40(7): 1830–1835.
215. Suzuki M, Hashizume M, Yoshida H, and Mihara M (2010) Antiinflammatory mechanism of tocilizumab, a humanized antiIL-6R antibody: effect on the expression of chemokine and adhesion molecule. *Rheumatology International* 30(3): 309–315.
216. Palmqvist P, Persson E, Conaway H and Lerner UH (2002) IL-6, leukemia inhibitory factor and oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of receptor activator of NF-kB ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF-kB in mouse calvariae. *The Journal of Immunology* 169(6):3353-3362.
217. Nemeth E, Rivera S, Gabayan V i sur (2004) IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *The Journal of Clinical Investigation* 113(9): 1271–1276.
218. Yoshida Y i Tanaka T (2014) Interleukin 6 and rheumatoid arthritis. *Biomed Research International*: 698313.
219. Alonzi T, Fattori E, Lazzaroetal D (1998) Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis. *The Journal of Experimental Medicine* 187(4)461–468.
220. Fujimoto M, Serada S, Mihara M i sur (2008) Interleukin-6 blockade suppresses autoimmune arthritis in mice by the inhibition of inflammatory Th17 responses. *Arthritis & Rheumatism* 58(12): 3710–3719.

221. Ohshima S, Saeki Y, Mima T i sur (1998) Interleukin 6 plays a key role in the development of antigen-induced arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(14): 8222–8226.
222. Hata H, Sakaguchi N, Yoshitomi H i sur (2004) Distinct contribution of IL-6, TNF $\alpha$ , IL-1, and IL-10 to T cell-mediated spontaneous autoimmune arthritis in mice. *The Journal of Clinical Investigation* 114(4): 582–588.
223. Hirano T, Matsuda T, Turneretal M (1988) Excessiveproduction of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis. *European Journal of Immunology* 18(11): 1797–1801.
224. Madhok R, Crilly A, Watson J, i Capell HA (1993) Serum interleukin 6 levels in rheumatoid arthritis: correlations with clinical and laboratory indices of disease activity. *Annals of the Rheumatic Diseases* 52(3)232–234.
225. Ogata A, Morita T, Yoshida Y, Tanaka T (2015) Subcutaneous formulation of tocilizumab for treatment of rheumatoid arthritis. *Ther Deliv* 6(3): 283-95.
226. Gahring LC, Carlson NG, Kulmar RA, Rogers SW (1996) Neuronal expression of tumor necrosis factor alpha in the murine brain. *Neuroimmunomodulation* 3(5): 289-303.
227. Fahlman C, Jacobsen FW, Veiby OP i sur (1994) TNF- $\alpha$  potently enhances in vitro macrophage production from primitive murine hematopoietic progenitor cells in combination with stem cell factor and interleukin-7: novel stimulatory role of p55 TNF receptors. *Blood* 84(5): 1528-1533.
228. Theiss AL i sur (2005) Tumor necrosis factor alpha increases collagen accumulation and proliferation in intestinal myofibroblasts via TNF receptor2. *The Journal of Biological Chemistry (Online)*.
229. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P (2003) Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ*. 10 (1): 45–65.
230. Chen G, Goeddel DV (2002) TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 296 (5573): 1634–5.
231. Kant S, Swat W, Zhang S, Zhang ZY, Neel BG, Flavell RA, Davis RJ (2011) TNF-stimulated MAP kinase activation mediated by a Rho family GTPase signaling pathway. *Genes Dev* 25(19): 2069-78.
232. Gaur U, Aggarwal BB (2003) Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochem Pharmacol* 66(8): 1403–8.
233. Vasanthi P, Nalini G, Rajasekhar G (2007) Role of tumor necrosis factor-alpha in rheumatoid arthritis: a review. *APLAR Journal of Rheumatology* 10: 270-274.

234. Lundy SK, Sarkar S, Tesmer LA i Fox DA (2007) Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. T lymphocytes. *Arthritis Research & Therapy* 9: 202.
235. Crotty S (2011) Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annual Review of Immunology* 29: 621-663.
236. Feldmann M i Maini RN (2001) Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: What have we learned? *Annual Review of Immunology* 19: 163-196.
237. Green DM, Trial J i Birdsall, HH (1998) TNF- alpha released by comigrating monocytes promotes tran- sendothelial migration of activated lymphocytes. *The Journal of Immunology* 161: 2481-2489.
238. Rossol M, Schubert K, Meusch U, Schulz A, Biedermann B, Grosche J, Pierer M, Scholz R, Baerwald C, Thiel A, Hagen S i Wagner U (2013) Tumor necrosis factor receptor type I expression of CD4+ T cells in rheumatoid arthritis enables them to follow tumor necrosis factor gradients into the rheumatoid synovium. *Arthritis & Rheumatism* 65: 1468-1476.
239. McInnes IB i Schett G (2011) The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *The New England Journal of Medicine* 365: 2205-2219.
240. Ivashkiv LB (2011) Inflammatory signaling in macrophages: transitions from acute to tolerant and alternative activation states. *European Journal of Immunology* 41: 2477-2481.
241. Noss EH and Brenner MB (2008) The role and therapeutic implications of fibroblast-like synoviocytes in inflammation and cartilage erosion in rheumatoid arthritis. *Immunological Reviews* 223: 252-270.
242. Lee A, Qiao Y, Grigoriev G, Chen J, Park-Min KH, Park SH, Ivashkiv LB i Kalliolias GD (2013) Tumor necrosis factor alpha induces sustained signaling and a prolonged and unremitting inflammatory response in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis & Rheumatism* 65: 928-938.
243. Zhang YH, Heulsmann A, Tondravi MM, Mukherjee A, Abu-Amer Y (2001) Tumor necrosis factor-alpha (TNF) stimulates RANKL-induced osteoclastogenesis via coupling of TNF type 1 receptor and RANK signaling pathways. *J Biol Chem* 276:563-8.
244. Kitaura H, Zhou P, Kim HJ, Novack DV, Ross FP, Teitelbaum SL (2005) M-CSF mediates TNF-induced inflammatory osteolysis. *J Clin Invest* 115:3418-27.
245. Glass DA 2nd, Bialek P, Ahn JD, i sur (2005) Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell* 8:751-64.

246. Li P, Schwarz EM, O'Keefe RJ, Ma L, Boyce BF, Xing L (2004) RANK signaling is not required for TNF $\alpha$ -mediated increase in CD11(hi) osteoclast precursors but is essential for mature osteoclast formation in TNF $\alpha$ -mediated inflammatory arthritis. *Bone Miner Res* 19:207-13.
247. Keffer J, Probert L, Cazlaris H i sur (1991) Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J* 10:4025-31.
248. Williams RO, Feldmann M, Maini RN (1992) Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:9784-8.
249. Gilbert L, He X, Farmer P i sur (2000) Inhibition of osteoblast differentiation by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Endocrinology* 141:3956-64.
250. Kuroki T, Shingu M, Koshihara Y, Nobunaga M (1994) Effects of cytokines on alkaline phosphatase and osteocalcin production, calcification and calcium release by human osteoblastic cells. *Br J Rheumatol* 33:224-30.
251. Gilbert L, He X, Farmer P i sur (2002) Expression of the osteoblast differentiation factor RUNX2 (Cbfa1/AML3/Pebp2 $\alpha$  A) is inhibited by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J Biol Chem* 277:2695701.
252. Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Parfitt AM, Manolagas SC (1998) Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. *J Bone Miner Res* 13:793-802.
253. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ i sur (2010) 2010 Rheumatoid arthritis Classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* 62(9): 2569-81.
254. Gardiner PV, Bell AL, Taggart AJ, Wright G, Kee F, Smyth A, McKane R, Lee J, Rooney ME, Whitehead E (2005) A potential pitfall in the use of the Disease Activity Score (DAS 28) as the mean response criterion in treatment guidelines for patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 64(3): 506-7.
255. Charles P, Elliott MJ, Davis D i sur (1999) regulation of cytokines, cytokine inhibitors and acute phase proteins following anti-TNF $\alpha$  therapy in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 163:1521-1528.
256. Amital H, Barak V, Winkler RE i sur (2007) Impact of treatment with infliximab on serum cytokine profile of patients with rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 1110: 649-660.



257. Ikić M, Jajić Z, Lazić E, Ivčević S, Grubišić F, Marušić A, Kovačić N, Grčević D (2014) Association of systemic and intra-articular osteoclastogenic potential, pro-inflammatory mediators and disease activity with the form of inflammatory arthritis. *Int Orthop* 38(1): 183-92.
258. Edrees AF, Misra SN, Abdou NI (2005) Anti-tumor necrosis factor (TNF) therapy in rheumatoid arthritis: correlation of TNF-alpha serum level with clinical response and benefit from changing dose or frequency of infliximab infusions. *Clin Exp Rheumatol* 23(4): 469-74.
259. St Clair EW (1999) Interleukin-10 treatment for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 58: 99-102.
260. Llorente L, Richaud-Patin Y, Fior R i sur. (1994) In vivo production of interleukin-10 by non-T cells in rheumatoid arthritis, Sjögren's syndrome, and systemic lupus erythematosus. A potential mechanism of B lymphocyte hyperactivity and autoimmunity. *Arthritis Rheum* 37: 1647-55.
261. Weyand CM, Klimiuk PA, Goronzy JJ (1998) Heterogeneity of rheumatoid arthritis: from phenotypes to genotypes. *Springer semin Immunopathol* 20(1-2): 5-22.
262. Silman AJ (1997) Problems complicating the genetic epidemiology of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 24:194-196.
263. Taneja V, Giphart MJ, Verduijn W, Naipal A, Malaviya AN, Mehra NK (1996) Polymorphism of HLA-DRB, -DQA1, and -DQB1 in rheumatoid arthritis in Asian Indians: association with DRB1\*0405 and DRB1\*1001. *Hum Immunol* 46:35-41.
264. Silman AJ, MacGregor AJ, Thomson W, Holligan S, Carthy D, Farhan A, Ollier WE (1993) Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study. *Br J Rheumatol* 32:903-907.
265. John S, Hajeer A, Marlow A, Myerscough A, Silman AJ, Ollier WE, Worthington J (1997) Investigation of candidate disease susceptibility genes in rheumatoid arthritis: principles and strategies. *J Rheumatol* 24:199-201.
266. Huang WX, Huang MP, Gomes MA, Hillert J (2000) Apoptosis mediator's fasL and TRAIL are upregulated in peripheral blood mononuclear cells in MS. *Neurology* 55:928-934.
267. Krammer PH (2000) CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407:789-795.
268. Shimonishi T, Isse K, Shibata F i sur (2000) Up-regulation of fas ligand at early stages and down-regulation of Fas at progressed stages of intrahepatic cholangiocarcinoma reflect evasion from immune surveillance. *Hepatology* 32:761-769.

269. Pratt AG, Isaacs JD (2014) Seronegative rheumatoid arthritis: pathogenetic and therapeutic aspects. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 28(4): 651-9.
270. Pinkoski MJ, Droin NM i sur (2002) TNF $\alpha$  up-regulates non-lymphoid Fas-ligand following superantigen-induced peripheral lymphocyte activation. *Journal of Biological Chemistry* 2227: 42380-42385.
271. Van Steenberg HW i sur (2014) Does a genetic variant in *FOXO3* predict a milder course of rheumatoid arthritis? *Arthritis & Rheumatology* 66:1678-1681.



## 8. PRILOG A - POPIS KRATICA

anti-CCP	protutijela usmjerena protiv cikličkih citruliranih proteina
AFM	mikroskopija atomske snage (prema engl. <i>atomic force microscopy</i> )
AnXA-1	Annexin, protein koji inhibira fosfolipaze
AP	alkalna fosfataza (prema engl. <i>alkaline phosphatase</i> )
APC	antigen prezentirajuće stanice (prema engl. <i>antigenpresenting cells</i> )
Bcl 2	regulacijski protein (prema engl. <i>B-cell lymphoma 2</i> )
CD	diferencijacijski biljeg (prema engl. <i>cluster of differentiation</i> )
CIA	artritis potaknut kolagenom (prema engl. <i>collagen induced arthritis</i> )
CTLA-4	površinski T-limfocitni receptor (prema engl. <i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i> )
DD	smrtonosna domena (prema engl. <i>death domain</i> )
DED	izvršna smrtonosna domena (prema engl. <i>death effector domain</i> )
DISC	smrtonosni signalni sklop (prema engl. <i>death-inducing signaling complex</i> )
ELISA	imunoenzimski postupak (prema engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
FADD	smrtonosna domena pridružena receptoru Fas (prema engl. <i>Fas-associated death domain</i> )
FasL	Fas ligand, transmembranski protein koji pripada obitelji čimbenika tumorske nekroze
FCRL3 gen	gen koji kodira imunoglobulinske receptore (prema engl. <i>Fc receptor-like protein 3</i> )
FGF	čimbenik rasta fibroblasta (prema engl. <i>fibroblast growth factor</i> )
FLS	sinoviociti nalik na fibroblaste (prema engl. <i>fibroblast-like synoviocytes</i> )
FOXO	“O” podklasa FOX (prema engl. <i>forkhead box</i> ) skupine transkripcijskih čimbenika
GWAS	studije koje istražuju povezanost genoma i bolesti na velikim populacijskim uzorcima (prema engl. <i>genome wide association studies</i> )
HIF	transkripcijski čimbenik osjetljiv na hipoksiju (prema engl. <i>hypoxia-inducible factor</i> )

HLA sustav	sustav glavnih antigena tkivne snošljivosti u ljudi (prema engl. <i>human leukocyte antigen</i> )
HSPs	bjelančevine toplinskog šoka (prema engl. <i>heat shock proteins</i> )
IFN	interferon
IGF	čimbenik rasta sličan inzulinu (prema engl. <i>insulin-like growth factor</i> )
IL	interleukin
LT	limfotoksin
MAPK	mitogenom aktivirane protein kinaza
M-CSF	čimbenik poticanja makrofagnih kolonija (prema engl. <i>macrophage-colony stimulating factor</i> )
MHC	skup gena tkivne podudarnosti (prema engl. <i>major histocompatibility complex</i> )
MMPs	metaloproteinaze međustanične tvari (prema engl. <i>matrix metalloproteinases</i> )
MV	mikrovezikule
NF- $\kappa$ B	jezgrin čimbenik $\kappa$ B (prema engl. <i>nuclear factor <math>\kappa</math>B</i> )
OC	osteokalcin
OPG	osteoprotegerin
PAMP	molekularni uzorci vezani za patogen (prema engl. <i>pathogen-associated molecular patterns</i> )
PCR	lančana reakcija polimerazom (prema engl. <i>polymerase chain reaction</i> )
PDGF	čimbenik rasta porijeklom iz trombocita (prema engl. <i>platelet derived growth factor</i> )
PMN	polimorfonuklearne stanice
RA	reumatoidni artritis
RANK	receptor za pobudu jezgrinog čimbenika $\kappa$ B (prema engl. <i>receptor activator of nuclear factor <math>\kappa</math>B</i> )
RANKL	ligand receptora za pobudu jezgrinog čimbenika $\kappa$ B (prema engl. <i>receptor activator of nuclear factor-<math>\kappa</math>B ligand</i> )
RF	reumatoidni faktor, protutijelo na Fc fragment IgG protutijela
rs	identifikacijski broj polimorfizma pojedinačnog nukleotida iz javne arhive
Runx2	transkripcijski čimbenik povezan s bjelančevinom "runt" 2 (prema engl. <i>runt-related transcription factor 2</i> )

SNP	polimorfizam pojedinačnog nukleotida (prema engl. <i>single nucleotide polymorphism</i> )
TGF	transformirajući čimbenik rasta (prema engl. <i>transforming growth factor</i> )
TLRs	membranski receptori izraženi na makrofagima i dendritičkim stanicama (prema engl. <i>Toll-like receptors</i> )
TNF	čimbenik tumorske nekroze (prema engl. <i>tumor necrosis factor</i> )
TNFR	TNF receptor
TRAF	čimbenik povezan s receptorima obitelji TNF (prema engl. <i>TNF-receptor associated factor</i> )
Wnt	hibridna kratica od Wg (prema engl. <i>wingless in Drosophila</i> ) i Int (prema engl. <i>integration 1</i> )

## 9. ŽIVOTOPIS

Marinko Artuković rođen je 7. studenog 1972. u Zagrebu. Nakon završene XV. gimnazije u Zagrebu studirao je na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu na kojem je diplomirao 1997. s prosječkom ocjena 4.5 te stekao naziv doktora medicine.

Nakon završenog pripravničkog staža specijalizirao je internu medicinu u Kliničkoj bolnici Sveti Duh u Zagrebu. Od 2005 radi kao specijalist interne medicine na Odjelu za kliničku imunologiju, pulmologiju i reumatologiju Klinike za unutarnje bolesti Kliničke bolnice Sveti Duh. 2012. godine nakon završenog usavršavanja u užoj specijalizaciji prema programu MZRH postaje subspecijalist reumatologije. Aktivno sudjeluje u radu Referentnog centra za kliničku alergologiju MZRH te Hrvatskog društva za alergologiju i kliničku imunologiju, HLZ.

Autor je niza stručnih i znanstvenih publikacija u indeksiranim časopisima, asistent na Katedri za internu medicinu Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Osijeku "J.J. Strossmayer". Sudjeluje u nastavi Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu kroz dodiplomsku nastavu na elektivnim predmetima "Alergije i astma" i "Doktore, guši me", te kroz nastavu studija na engleskom jeziku kroz elektivni predmet "Allergy and asthma".