

Poremećaji genskoga izražaja u bolesnika s juvenilnim seronegativnim spondiloartropatijama

Lamot, Lovro

Doctoral thesis / Disertacija

2014

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:914213>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-27**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine
Digital Repository](#)





Središnja medicinska knjižnica

Lamot, Lovro (2014) *Poremećaji genskoga izražaja u bolesnika s juvenilnim seronegativnim spondiloartropatijama [Distinctive gene expression in patients with juvenile seronegative spondyloarthtopathy]*. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

<http://medlib.mef.hr/2100>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Lovro Lamot

**Poremećaji genskoga izražaja u
bolesnika s juvenilnim seronegativnim
spondiloartropatijama**

DISERTACIJA



Zagreb, 2014.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Lovro Lamot

**Poremećaji genskoga izražaja u
bolesnika s juvenilnim seronegativnim
spondiloartropatijama**

DISERTACIJA

Zagreb, 2014.

Disertacija je izrađena u Dječjoj bolnici Srebrnjak te na Odjelu za funkcionalnu genomiku Centra za translacijska i klinička istraživanja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, u sklopu projekta “Uloga biomarkera u patofiziologiji seronegativnih spondiloartropatija”. Istraživanje je financiralo Ministarstvo znanosti, obrazovanja i sporta Republike Hrvatske sredstvima namijenjenim navedenom znanstvenoistraživačkom projektu.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Miroslav Harjaček, dr. med.

Mnogo je ljudi koji su mi pomogli pri izradi ovog rada i kojima dugujem zahvalnost.

Prije svih, to je moj mentor, prof. dr. sc. Miroslav Harjaček, dr. med., koji mi je otkrio divno i neiscrpno područje istraživanja dječje reumatologije, rasplamsao u meni akademsku znatiželju, navodio me na pravi put i ukazivao na moguće stranputice, ostavljajući mi autonomiju za vlastite odluke i poduhvate. Zahvalnost ne mogu izreći riječima, već obvezom da nastavim djelo koje smo zajedno započeli.

Isto tako, neizmjereno sam zahvalan na velikodušnoj pomoći prof. dr. sc. Franu Borovečkom, dr. med., i njegovim suradnicima, Kristini Gotovac, dipl. ing., i Filipu Binguli, ing., čija su mi znanja i umijeća uvijek bila na raspolaganju.

Nezamjenjiva je i neprestana podrška mojih dragih kolegica prim. mr. sc. Lane Tambić Bukovac, dr. med., i Mandice Vidović, dr. med., kojima od srca zahvaljujem.

Zahvaljujem svojoj obitelji za životno ozračje u kojem sam odgajan, za razvijanje nadahnuća za znanje i dobro djelovanje, za nesebično ulaganje u mene kao čovjeka.

Posebnu zahvalnost dugujem dragom prijatelju i kumu Ivici Balagoviću, dr. med., koji je sa mnom dijelio i podučio me mnogim vrijednim životnim i profesionalnim iskustvima.

I na kraju, hvala mojoj Marini za ljubav, podršku, beskonačnu strpljivost i neprestanu motivaciju.

SADRŽAJ

POPIS OZNAKA I KRATICA	I
1. UVOD	1
1.1. Osnovne karakteristike spondiloartritisa	1
1.1.1. Terminologija	1
1.1.2. Definicija	1
1.1.3. Kriteriji	2
1.1.4. Epidemiologija	5
1.1.5. Klinička slika	6
1.1.5.1. Zglobne manifestacije	6
1.1.5.2. Izvanzglobne manifestacije	7
1.1.6. Dijagnostička obrada	9
1.1.7. Liječenje	10
1.2. Klasifikacija imunoloških bolesti	10
1.3. Patogeneza upale u spondiloartritisu	12
1.3.1. Uloga stečenog imunološkog sustava	13
1.3.2. Uloga prirođenog imunološkog sustava	18
1.4. Patogeneza oštećenja u spondiloartritisu	20
1.5. Histopatologija spondiloartritisa	22
1.5.1. Enteze	22
1.5.2. Sinovija	24
1.5.3. Crijevo	25
1.6. Genetika spondiloartritisa	26
1.6.1. Uloga HLA genotipa	27
1.6.2. Uloga gena izvan MHC sustava	30
1.7. Funkcionalna genomika	31
1.7.1. Genom	33
1.7.2. Transkriptom	34
1.7.3. Proteom	35
1.8. Analiza genskoga izražaja	36
1.8.1. Razvoj i vrste čipova	36
1.8.2. Ispitivanje genskoga izražaja pomoću DNA čipa	38
1.8.2.1. Građa DNA čipa	39
1.8.2.3. Izolacija RNA	41
1.8.2.4. Označavanje ciljnih molekula	43
1.8.2.5. Hibridizacija	43
1.8.2.6. Očitavanje čipova i analiza dobivene slike	43
1.8.3. Affymetrixov GeneChip® sustav	45
1.8.4. Obrada podataka dobivenih očitanjem čipova	47
1.8.5. Pohrana podataka	48
1.8.6. Analiza grupa i obilježja	49
1.8.7. Analiza mreža i puteva	51
1.8.8. Potvrda rezultata	53
1.9. Dosadašnja istraživanja genskoga izražaja u bolesnika sa spondiloartritisima ...	55
2. HIPOTEZA	61
3. CILJEVI	61
3.1. Opći cilj	61
3.2. Specifični ciljevi	61

4. SUDIONICI I METODE	62
4.1. Odabir sudionika	62
4.2. Izolacija RNA	64
4.3. Ispitivanje genskoga izražaja na DNA čipovima	65
4.4. Hijerarhijsko grupiranje gena	65
4.5. Analiza zastupljenosti termina genske ontologije	66
4.6. Analiza zastupljenosti skupina gena	66
4.7. Analiza puteva i mreža	67
4.8. Odabir gena za potvrdu rezultata neovisnom metodom	68
4.9. Potvrda rezultata qRT-PCR analizom	69
5. REZULTATI	71
5.1. Rezultati ispitivanja genskoga izražaja na DNA čipovima	71
5.2. Rezultati analize zastupljenosti termina genske ontologije	73
5.3. Rezultati analize zastupljenosti skupina gena	92
5.4. Rezultati analize mreža i puteva	96
5.5. Potvrda rezultata	103
6. RASPRAVA	109
6.1. Analiza izražaja sveukupnoga genskog sadržaja	109
6.2. Obilježja i izražaj odabranih gena	112
6.3. Patogeneza juvenilnih spondiloartritisa	121
6.4. Prednosti i nedostaci provedenog istraživanja	124
6.5. Daljnja istraživanja	125
7. ZAKLJUČCI	126
8. SAŽETAK	127
9. SUMMARY	128
10. POPIS LITERATURE	129
11. ŽIVOTOPIS	143

Φύσις κρύπτεσθαι φιλεῖ – Fýsis krýptesthai filēi.*

* Priroda se voli prikrivati. Heraklit, fragment 123.

POPIS OZNAKA I KRATICA

ACR	Američko reumatološko društvo (engl. <i>American College of Rheumatology</i>)
ANA	antinuklearna antitijela (engl. <i>antinuclear antibodies</i>)
APC	antigen-predočna stanica (engl. <i>antigen presenting cell</i>)
AS	ankilozantni spondilitis (engl. <i>ankylosing spondylitis</i>)
β2m	β2 mikroglobulin (engl. <i>β2-microglobulin</i>)
BMP	koštani morfogogenetski protein (engl. <i>bone morphogenic protein</i>)
CD	biljeg stanične diferencijacije (engl. <i>cluster of differentiation</i>)
cDNA	komplementarna deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>complementary deoxyribonucleic acid</i>)
CTL	citotoksični limfociti T (engl. <i>cytotoxic T cells</i>)
DAMP	molekularni obrasci povezani s ozljedom tkiva (engl. <i>damage-associated molecular patterns</i>)
DMARD	antireumatski lijekovi koji utječu na tijek bolesti (engl. <i>disease-modifying antirheumatic drugs</i>)
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
ErA	entezitis povezan s artritisom (engl. <i>enthesitis related arthritis</i>)
ES	suma zastupljenosti (engl. <i>enrichment score</i>)
ESSG	Europsko društvo za proučavanje spondiloartropatija (engl. <i>European Spondyloarthropathy Study Group</i>)
ERK	kinaza regulirana izvanstaničnim signalom (engl. <i>extracellular-signal-regulated kinase</i>)
FDR	postotak lažnih otkrića (engl. <i>false discovery rate</i>)
GCOS	program za upravljanje GeneChip® sustavom (engl. <i>GeneChip® Operating Software</i>)
HLA	glavni kompleks gena tkivne podudarnosti (engl. <i>human leukocyte antigen</i>)
IBD	upalna bolest crijeva (engl. <i>inflammatory bowel disease</i>)
IFN	interferon (engl. <i>interferon</i>)
ILAR	Međunarodna liga reumatoloških udruženja (engl. <i>International League of Associations for Rheumatology</i>)
IL	interleukin (engl. <i>interleukin</i>)

IVT	<i>in vitro</i> prepisivanje (engl. <i>in vitro transcription</i>)
jAS	juvenilni ankilozantni spondilitis (engl. <i>juvenile ankylosing spondylitis</i>)
JIA	juvenilni idiopatski artritis (engl. <i>juvenile idiopathic arthritis</i>)
JNK	c-Jun N-terminalna kinaza (engl. <i>c-Jun N-terminal kinase</i>)
jSpA	juvenilni spondiloartritis; juvenilna spondiloartropatija (engl. <i>juvenile spondyloarthritis; juvenile spondyloarthropathy</i>)
KS	kortikosteroidi (engl. <i>corticosteroids</i>)
LPS	lipopolisaharid (engl. <i>lipopolysaccharide</i>)
MAPK	protein kinaze aktivirane mitogenima (engl. <i>mitogen-activated protein kinases</i>)
M-CSF	čimbenik stvaranja monocitnih kolonija (engl. <i>macrophage colony-stimulating factor</i>)
MEK	MAPK ERK kinaza (engl. <i>MAPK ERK kinase</i>)
MHC	glavni kompleks histokompatibilnosti (engl. <i>major histocompatibility complex</i>)
MIAME	minimum potrebnih informacija o eksperimentu na čipu (engl. <i>Minimum Information About a Microarray Experiments</i>)
MKP	fosfateze protein kinaza aktiviranih mitogenom (engl. <i>mitogen-activated protein kinase phosphatase</i>)
mRNA	glasnička ribonukleinska kiselina (engl. <i>messenger ribonucleic acid</i>)
NES	normalizirana suma zastupljenosti (engl. <i>normalized enrichment score</i>)
NF-κB	jezgrin čimbenik kappa B (engl. <i>nuclear factor kappa B</i>)
NLR	NOD-u sličan receptor (engl. <i>NOD-like receptor</i>)
NSAIL	nesteroidni protuupalni lijekovi (engl. <i>non-steroidal anti-inflammatory drugs</i>)
OPG	osteoprotegerin (engl. <i>osteoprotegrin</i>)
PAMP	molekularni obrasci povezani s patogenima (engl. <i>pathogen-associated molecular patterns</i>)
PBMC	mononuklearne stanice periferne krvi (engl. <i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PCR	lančana reakcija polimerazom (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PRR	receptori koji prepoznaju molekularne obrasce (engl. <i>pattern recognition receptors</i>)
PsA	psorijatični artritis (engl. <i>psoriatic arthritis</i>)
PTK	protein tirozin kinaze (engl. <i>protein tyrosin kinase</i>)

PTP	protein tirozin fosfataze (engl. <i>protein tyrosine phosphatase</i>)
qRT-PCR	kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (engl. <i>quantitative real time polymerase chain reaction</i>)
RA	reumatoidni artritis (engl. <i>rheumatoid arthritis</i>)
RANK	receptor za pobudu jezgrinog čimbenika kappa-B (engl. <i>receptor activator of nuclear factor kappa-B</i>)
RANKL	ligand receptora za pobudu jezgrinog čimbenika kappa-B (engl. <i>receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand</i>)
ReA	reaktivni artritis (engl. <i>reactive arthritis</i>)
RF	IgM reumatoidni faktor (engl. <i>rheumatoid factor</i>)
RIN	vrijednost integriteta ribonukleinske kiseline (engl. <i>ribonucleic acid integrity number</i>)
RNA	ribonukleinska kiselina (engl. <i>ribonucleic acid</i>)
SEA	sindrom seronegativne entezopatije i artropatije (engl. <i>seronegative enthesopathy and arthropathy syndrome</i>)
SEM	standardna pogreška aritmetičke sredine (engl. <i>standard error of the mean</i>)
SFMC	mononuklearne stanice sinovijalne tekućine (engl. <i>synovial fluid mononuclear cells</i>)
SNP	polimorfizam pojedinačnog nukleotida (engl. <i>single nucleotide polymorphism</i>)
SpA	spondiloartritis; spondiloartropatija (engl. <i>spondyloarthritis; spondyloarthropathy</i>)
STAT	provodnik signala i pobudnik transkripcije (engl. <i>signal transducer and activator of transcription</i>)
TCR	receptor limfocita T (engl. <i>T-cell Receptor</i>)
TH	pomoćnički limfocit T (engl. <i>T-helper</i>)
TLR	Toll-u sličan receptor (engl. <i>Toll-like receptor</i>)
TNF	čimbenik tumorske nekroze (engl. <i>tumor necrosis factor receptor</i>)
TNFR	receptor čimbenika tumorske nekroze (engl. <i>tumor necrosis factor receptor</i>)
TRAF	čimbenik povezan s receptorima obitelji TNF (engl. <i>TNF receptor-associated factors</i>)
Treg	regulatorni limfocit T (engl. <i>regulatory T-cell</i>)
UPR	odgovor stanica na nakupljanje nesmotanih proteina (engl. <i>unfolded protein response</i>)
uSpA	nediferencirani SpA (eng. <i>undifferentiated SpA</i>)
WB	puna krv (engl. <i>whole blood</i>)

1. UVOD

1.1. Osnovne karakteristike spondiloartritisa

1.1.1. Terminologija

Prije samog uvoda, važno je opisati terminologiju koja će se koristiti u nastavku disertacije. Budući da još uvijek ni u domaćoj ni u stranoj literaturi ne postoji općeprihvaćen naziv za skupinu bolesti koja su tema ove disertacije, potrebno je raščlaniti i opravdati korištenje termina koji ih najbolje opisuje. Uvriježeno je da se nastavak *–itis*^{*} upotrebljava za označavanje upalnog procesa kod kojeg postoji definiran uzrok, dok se nastavak *–pathia*[†] upotrebljava za bolna stanja kod kojih je uzrok teško odrediti (1).

Kada u Pubmed bazu podataka unesemo pojam “*spondyloarthrtis*” ili “*spondyloarthropathy*”, u oba slučaja dobijemo oko 18 000 rezultata, a ako tome pridodamo još “*juvenile*” dobivamo oko 800 rezultata za svaki termin. Slično je i kada pridodamo pojam “*seronegative*”, pa dobijemo oko 700 rezultata za svaku od pretraga. Potrebno je napomenuti da se oba termina otprilike jednako koriste od šezdesetih godina prošlog stoljeća pa sve do najnovijih publikacija objavljenih ove godine. Stoga možemo zaključiti da ova zanimljiva grupa bolesti, osim mnoštva nozoloških, još uvijek izaziva i etimološke nedoumice. S obzirom da je cilj ove disertacije pokazati kako za ovu skupinu bolesti ipak postoji nozološka posebnost, “*in bonam fidem*” koristit će se termin spondiloarthritis (engl. *spondyloarthritis*, SpA).

1.1.2. Definicija

SpA je naziv za skupinu upalnih bolesti koje imaju mnoga preklapajuća obilježja, a od drugih oblika upalnih artritisa razlikuju se u genetskoj predispoziciji, patogenezi i ishodu (2). U ovu skupinu bolesti svrstava se ankilozantni spondilitis (engl. *ankylosing spondylitis*, AS), reaktivni artritis (engl. *reactive arthritis*, ReA), psorijatični artritis (engl. *psoriatic arthritis*, PsA), artritis povezan s upalnom bolesti crijeva (engl. *inflammatory bowel disease*, IBD) i nediferencirani SpA (engl. *undifferentiated spondyloarthritis*, uSpA). Jedno od osnovnih

^{*} *Arthritis, idis*, f. (mn. *arthritides*) – zglobna upala, upala zgloba (zglobova), artritis, artroflogoza: upala koja zahvaća jedan zglob (*monoarthritis*), više zglobova (*oligoarthritis*) ili mnogo zglobova (*polyarthritis*); različita je uzroka, najčešće autoimunosnoga, a može biti akutna, subakutna ili kronična. (Može biti samostalna bolest ili kao dio neke druge bolesti.) Isto: *arthrophlogosis*, is, f. (zast.?).

[†] *Arthropathia*, ae, f. – zglobobolja, artropatija, “zglobna bolest”: opći (zajednički) naziv za bolesna stanja ili simptome zglobova, osobito za one bez upale kojima ne možemo odrediti nozološku posebnost, odnosno konačnu dijagnozu.

obilježja cijele skupine je seronegativnost za IgM reumatoidni faktor (RF) i antinuklearna antitijela (ANA) te činjenica da upala s vremenom može zahvatiti kralježnicu i/ili sakroilijačne zglobove (aksijalni skelet). Bolesti iz ove skupine spadaju među najčešće kronične reumatske bolesti s prevalencijom od 0,3% u Zapadnoj Europi (3-6). Obično počinju u trećem ili četvrtom desetljeću života, no 10 – 20% bolesnika može iskusi prve simptome prije šesnaeste godine života, pa tada govorimo o juvenilnom spondiloartritisu (engl. *juvenile spondyloarthritis*, jSpA) (7). SpA u djece obično počinje kao nediferencirana bolest: prvi simptomi, za razliku od SpA u odraslih, rijetko su povezani s kralježnicom, a mnogo češće se javlja nesimetrični oligoartritis zglobova donjih ekstremiteta, daktilitis i periferni entezitis (8). Upravo zbog toga opravdana je gruba podjela jSpA na nediferencirane i diferencirane oblike (7). U nediferencirane oblike ubraja se sindrom seronegativne entezopatije i artropatije (engl. *seronegative enthesopathy and arthropathy syndrome*, SEA) te entezitis povezan s artritisom (engl. *enthesitis related arthritis*, ErA), koji je podskupina juvenilnog idiopatskog artritisa (engl. *juvenile idiopathic arthritis*, JIA). U diferencirane oblike ubraja se juvenilni ankilozantni spondilitis (engl. *juvenile ankylosing spondylitis*, jAS), PsA, ReA i artritis povezan s IBD-om. Nediferencirani oblici često vremenom prelaze u diferencirane pa se tako pokazalo da čak 75% bolesnika sa SEA sindromom, pet godina nakon postavljanja dijagnoze, zadovoljava dijagnostičke kriterije za AS (9).

1.1.3. Kriteriji

Upotreba postojećih klasifikacijskih kriterija za djecu ili primjena kriterija za odrasle bolesnike sa SpA-om još uvijek nosi sa sobom određene izazove, što je zasigurno jedan od razloga zbog kojih se bolest u djece može i previdjeti (2, 7, 8). Među postojeće kriterije razvijene za jSpA spadaju kriteriji za SEA sindrom (10), Garmisch-Partenkirchen (G-P) kriteriji za jSpA (11), kriteriji za atipični spondiloartritis u djece (12) te klasifikacijski kriteriji za JIA koje je postavila Međunarodna liga reumatoloških udruženja (engl. *International League of Associations for Rheumatology*, ILAR) (13, 14). Osim navedenih, u djece se mogu koristiti i kriteriji za postavljanje dijagnoze u odraslih, kao što su Amorovi kriteriji (15, 16) te kriteriji Europskog društva za proučavanje spondiloartropatija (engl. *European Spondyloarthropathy Study Group*, ESSG) (17), u kojima zahvaćenost kralježnice nije jedan od preduvjeta za postavljanje dijagnoze, dok se u slučaju zahvaćenosti kralježnice i u djece mogu koristiti New York kriteriji za dijagnozu AS-a (18). Veću osjetljivost u djece pokazali su novorazvijeni kriteriji Međunarodnog društva za procjenu spondiloartritisa (engl.

Assessment of SpondyloArthritis International Society, ASAS), pomoću kojih se procjenjuje periferni spondiloartritis u odraslih koji imaju predominantni artritis, entezitis ili daktilitis (19). Iako je nedavno objavljeno istraživanje pokazalo da najveću osjetljivost za otkrivanje spondiloartritisa u djece imaju G-P kriteriji (20), većina pedijatrijskih reumatologa za postavljanje dijagnoze jSpA danas koristi ILAR-ove klasifikacijske kriterije (7). Prema njima se može klasificirati većina artritisa koji traju dulje od 6 tjedana i javljaju se u djece mlađe od 16 godina (tablica 1) (13). Bolesti koje spadaju u skupinu jSpA prema ILAR-ovim kriterijima raspoređene su u nekoliko podskupina. Najveći broj bolesnika s nediferenciranim oblikom jSpA-a i jAS-om tako je svrstan u ErA podskupinu, dok se svi ostali oblici jSpA-a, osim PsA-a mogu svrstati u skupinu nediferenciranih artritisa.

Tablica 1. ILAR-ovi klasifikacijski kriteriji za JIA.

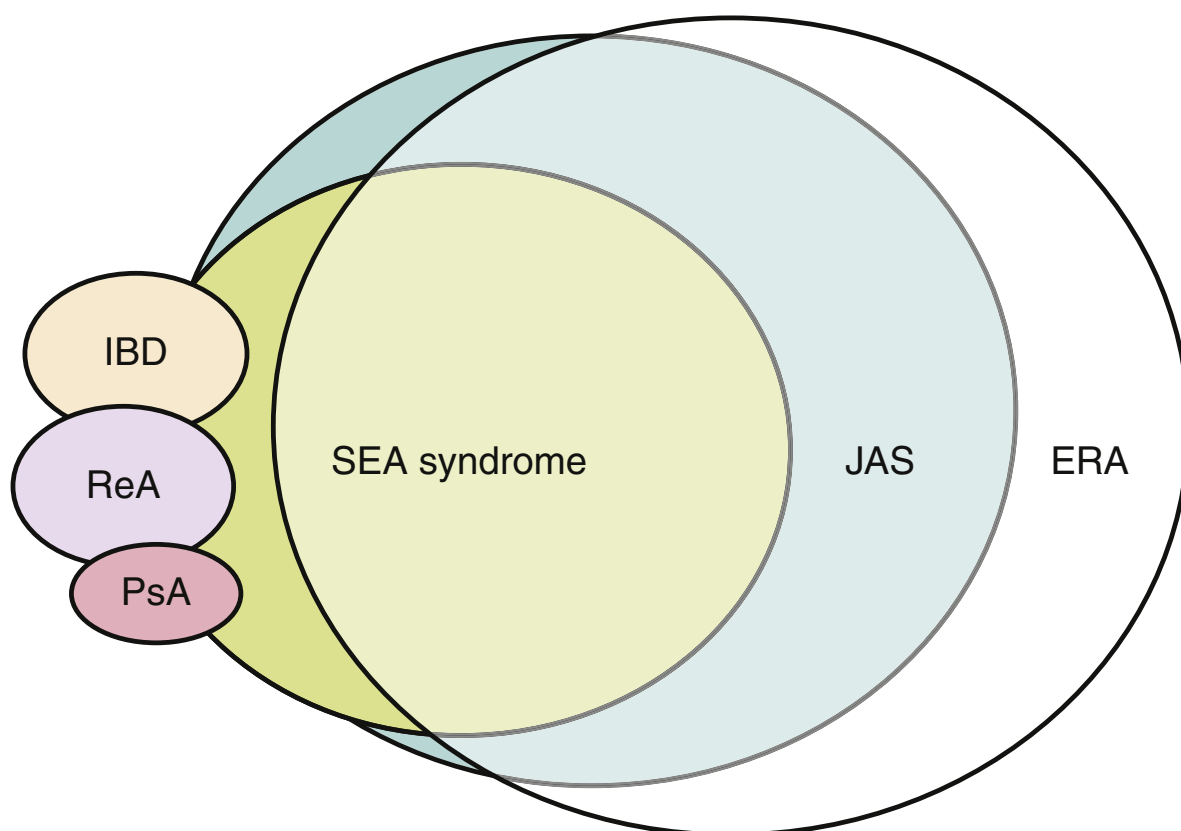
JIA PODSKUPINA	KRITERIJI ZA UKLJUČIVANJE	KRITERIJI ZA ODBACIVANJE
Sistemiški artritis	Artritis u ≥ 1 zglobova koji je praćen ili kojem prethodi povišena tjelesna temperatura koja traje ≥ 2 tjedna i javlja se svakodnevno ≥ 3 dana, uz ≥ 1 od navedenog: prolazni eritematozni osip; limfadenopatija; hepatomegalija ili splenomegalija ili oboje; serozitis;	Psorijaza u bolesnika ili u ≥ 1 rođaka u prvom koljenu; artritis u dječaka s HLA-B27 genotipom i ≥ 6 godina; AS, ErA, sakroiliitis s IBD, RA, upala prednjeg očnog segmenta ili prisutnost nekog od ovih poremećaja u rođaka u prvom koljenu; IgM RF pozitivan u ≥ 2 navrata s razmakom među mjerenjima ≥ 3 mjeseca;
Oligoartritis	Artritis u ≤ 4 zgloba tijekom ≤ 6 mjeseci bolesti; Perzistentni oligoartritis: nikad nije zahvaćeno >4 zgloba; Prošireni oligoartritis: >4 zgloba je zahvaćeno ≥ 6 mjeseci bolesti;	Psorijaza u bolesnika ili u ≥ 1 rođaka u prvom koljenu; artritis u dječaka s HLA-B27 genotipom i ≥ 6 godina; AS, ErA, sakroiliitis s IBD, RA, upala prednjeg očnog segmenta ili prisutnost nekog od ovih poremećaja u rođaka u prvom koljenu; sistemski oblik bolesti;
RF negativni poliartritis	Artritis koji zahvaća ≥ 5 zglobova tijekom ≤ 6 mjeseci bolesti; RF test je negativan;	Psorijaza u bolesnika ili u ≥ 1 rođaka u prvom koljenu; artritis u dječaka s HLA-B27 genotipom i ≥ 6 godina; AS, ErA, sakroiliitis s IBD, RA, upala prednjeg očnog segmenta ili prisutnost nekog od ovih poremećaja u rođaka u prvom koljenu; IgM RF pozitivan u ≥ 2 navrata s razmakom među mjerenjima ≥ 3 mjeseca; sistemski oblik bolesti;

RF pozitivni poliartritis	Artritis koji zahvaća ≥ 5 zglobova tijekom ≤ 6 mjeseci bolesti; Pozitivan RF u ≥ 2 navrata s razmakom među mjerenjima ≥ 3 mjeseca	Psorijaza u bolesnika ili u ≥ 1 rođaka u prvom koljenu; artritis u dječaka s HLA-B27 genotipom i ≥ 6 godina; AS, ErA, sakroiliitis s IBD-om, RA, upala prednjeg očnog segmenta ili prisutnost nekog od ovih poremećaja u rođaka u prvom koljenu; sistemski oblik bolesti;
Entezitis povezan s artritisom	Artritis i entezitis ili artritis ili entezitis i ≥ 2 od ponuđenih karakteristika: osjetljivost sakroilijakalnih zglobova na dodir* i/ili bolnost kralježnice zbog upalnog procesa; prisustvo HLA-B27 genotipa; pojavnost bolesti u ≥ 1 rođaka u prvom ili drugom koljenu sa potvrđenom dijagnozom bolesti povezane sa HLA-B27 genotipom; upala prednjeg očnog segmenta koja je obično povezana sa bolnošću, crvenilom ili fotofobijom; nastup bolesti u dječaka s ≥ 8 godina;	Dijagnoza psorijaze koju je postavio dermatolog u ≥ 1 rođaka u prvom ili drugom koljenu; prisutnost sistemskog artritisa;
Psorijatični artritis	Artritis i psorijaza ili artritis i najmanje jedno od navedenog: daktilitis, ljuštenje noktiju ili oniholiza, psorijaza u rođaka u prvom koljenu;	Artritis u dječaka s HLA-B27 genotipom i ≥ 6 godina; AS, ErA, sakroiliitis s IBD, RA, upala prednjeg očnog segmenta ili prisutnost nekog od ovih poremećaja u rođaka u prvom koljenu; IgM RF pozitivan u ≥ 2 navrata s razmakom među mjerenjima ≥ 3 mjeseca; sistemski oblik bolesti;
Nediferencirani artritis	Artritis koji ne ispunjava kriterije ni u jednoj ili u više od dvije podskupine;	/

Usprkos činjenici što se pojedine bolesti iz skupine jSpA-a međusobno razlikuju, one imaju neka važna zajednička obilježja koja ih diferenciraju od drugih oblika JIA-a te od ostalih sistemskih poremećaja imunološkog sustava. Mnogi stoga smatraju kako su glavni nedostaci ILAR-ovih kriterija svrstavanje PsA-a i artritisa povezanog s IBD-om u posebne kategorije, ne spominjanje ReA-a i ne obuhvaćanje svih bolesnika s jAS-om (7, 21, 22). Međutim, s obzirom na spomenutu heterogenost u fenotipu bolesti koje spadaju u skupinu jSpA, jasno je

* engl. *Tenderness*, bol koja se javlja prilikom pritiska na krajeve zglobova.

da postoji i heterogenost u klasifikacijskim kriterijima. Na kraju možemo zaključiti da na podskupinu ErA treba gledati kao na kišobran pod kojim se nalaze djeca s jAS-om koja ispunjavaju New York kriterije za AS te većina bolesnika sa SEA sindromom (slika 1) (22). Upravo zbog toga ILAR-ovi klasifikacijski kriteriji u ovom trenutku predstavljaju najbolji izbor za postavljanje dijagnoze nediferenciranog SpA-a kod djece.



Slika 1. Prikaz veze između artritisa povezanog s entezitisom (ErA), juvenilnog ankilozantnog spondilitisa (jAS), sindroma seronegativne entezopatije i artropatije (SEA syndrome), artritisa povezanog s upalnom bolesti crijeva (IBD), reaktivnog artritisa (ReA) i psorijatičnog artritisa (PsA). Preuzeto iz Cassidy JT. *Textbook of pediatric rheumatology*. 6. izd. Philadelphia: Saunders; 2010, str. 274.

1.1.4. Epidemiologija

Procjena prevalencije jSpA-a, a osobito ErA-a, temelji se na podacima za JIA, zbog čega je vrlo ovisna o zemljopisnoj lokaciji i kriterijima korištenim prilikom postavljanja dijagnoze (2). Procjenjuje se da od JIA-a boluje 7 do 400 od 100 000 djece (0,007% do 0,4%), mada se čini kako je navedena gornja granica pretjerana (23). Smatra se da od toga 2 – 11% djece zadovoljava kriterije za ErA i PsA. Istraživanje provedeno u Hrvatskoj, u kojem su korišteni ESSG kriteriji za postavljanje dijagnoze, pokazalo je da je učestalost jSpA-a među djecom s

reumatskim bolestima 8,2% (24). To je u skladu s rezultatima američkih, kanadskih i britanskih istraživanja u kojima otprilike 7,9 – 9,8% djece koja su upućena dječjem reumatologu ima jSpA (25-27). Prosječna dob prilikom postavljanja dijagnoze ErA-a u jednom istraživanju u kojem je sudjelovalo 115 djece, bila je 11,7 godina (u rasponu od 2,8 do 17,6 godina), a odnos dječaka prema djevojčicama bio je 3,4:1 (28). U ranije spomenutom istraživanju provedenom u Hrvatskoj prosječna dob prilikom postavljanja dijagnoze jSpA-a bila je 13,1 godina (u rasponu od 4,4 do 17,8 godina), dok je odnos dječaka prema djevojčicama bio 1,19:1 (24). Nadalje, važno je spomenuti da oko 20% rođaka u prvom koljenu djece s postavljenom dijagnozom jSpA-a ima SpA (8). Navedeni podaci pokazuju da SpA nije rijedak u dječjoj dobi, a s obzirom da u odrasloj dobi često prelazi u teže oblike, pravodobno otkrivanje i liječenje predstavljaju važan korak u smanjenju tereta koji bolesti iz ove skupine mogu predstavljati za pojedinca i društvo u cjelini.

1.1.5. Klinička slika

ErA je bolest podmuklog nastupa, karakteriziranog intermitentnim bolovima u muskuloskeletnom sustavu te ukočenošću ili upalom perifernih zglobova, uglavnom donjih udova, s entezitisom na jednom ili više mjesta u blizini koljena ili stopala. Entezitis predstavlja upalu enteza, odnosno mjesta na kojima se ligament, tetiva, mišićna ovojnica ili kapsula zgloba spajaju s kosti i vrlo je karakterističan za ovu bolest. Sama bolest povremeno nastupa naglo. Opći simptomi nisu izraženi, ali mogu se javiti malaksalost, poremećaji spavanja i trajno niska temperatura. Simptomi zahvaćenosti aksijalnog skeleta nisu česti na početku bolesti, no mogu postati manifestni kako bolest napreduje (8). Kliničke manifestacije ErA-a mogu se u grubo podjeliti na zglobne i izvanzglobne.

1.1.5.1. Zglobne manifestacije

Artritis i entezitis su glavne značajke ove bolesti. Simptomi povezani s perifernim zglobovima prisutni su u više od 80% bolesnika, dok je bolnost kralježnice uslijed upalnog procesa prisutna samo u 20-25% bolesnika. To je jedna od od glavnih razlika između SpA-a u djece i odraslih (22). U većine bolesnika na početku bolesti javlja se unilateralni ili asimetrični oligoartritis. Distalni zglobovi donjih ekstremiteta (koljeno, gležanj, zglobovi zastoplja) zahvaćeni su češće nego proksimalni zglobovi. Rijetko može doći i do zahvaćenosti gornjih ekstremiteta, najčešće ramena, dok su mali zglobovi šake najrjeđe zahvaćeni (7). Poliartritis nije čest na početku bolesti, a kada se javlja, pretežno je asimetrične distribucije. U

ovoj fazi teško je razlikovati ErA-a od drugih oblika JIA-a (29). Unutar 5 – 10 godina od nastupa, bolest može zahvatiti zglobove kralježnice i/ili sakroilijakalne zglobove te dolazi do razvoja jAS-a (9, 30-33). Osim toga, postoji manje učestali oblik bolesti u kojem je kralježnica zahvaćena i ranije, a naziva se izvorni jAS (engl. *genuine jAS*) (34). Simptomi zahvaćenosti kralježnice iskazuju se kao bolnost ili ukočenost u lumbalnom području ili u stražnjici i često se pogoršavaju s nedostatkom fizičke aktivnosti, npr. prilikom dužeg sjedenja. Smanjena pokretljivost kralježnice može se otkriti modificiranim Schoberovim testom koji se izvodi tako da se na kralježnici označe točke 10 cm iznad i 5 cm ispod lumbo-sakralnog spoja te se zatim pri inklinaciji (fleksiji) i reklinaciji (ekstenziji) mjeri razmak među njima, čime se dobiva inklinacijski i reklinacijski indeks čiji zbroj daje indeks sagitalne gibljivosti koji uobičajeno iznosi 6 cm (35).

Najčešća mjesta na kojima se javlja entezitis su donja polovina patele, mjesto na kojem se plantarna mišićna ovojnica spaja sa petnom kosti ili glavom kosti donožja te mjesto na kojem se Ahilova tetiva spaja s petnom kosti (36). Entezitis je često povezan s upalom tetivnih ovojnica (tenosinovitisom) i sinovijalnih vreća (bursitisom), osobito na stopalu, gdje dolazi i do artritisa. Entezitis stopala, uključujući upalu enteza zastoplja i petne kosti (Ahilova tetiva, plantarna mišićna ovojnica), najčešći je simptom ErA-a i stanje koje najviše utječe na onesposobljenost u djece koja boluju od ove bolesti. Upala enteza, tetivnih ovojnica, sinovije, te sinovijalnih vreća, koje se nalaze u srednjem dijelu stopala od skočnog do metatarzofalangealnih zglobova, naziva se ankilozantni tarzitis (engl. *ankylosing tarsitis*, AT) i može biti jedan od prvih simptoma jSpA-a (37, 38). Zahvaćenost stopala klinički se manifestira bolnošću koja se javlja prilikom stajanja i hodanja, otokom stopala te bolnošću prilikom pritiska na mjesta na kojima se tetive i ligamenti spajaju s kosti. U kasnijem tijeku bolesti, entezitis varira od rijetkih epizoda aktivne upale jedne ili više enteza do čestih vraćanja upale na mnogim mjestima, osobito na stopalu. Perzistentni entezitis povezan je s edemom i pretjeranim rastom kosti, proliferacijom hrskavice, prerastanjem zone rasta hrskavice (engl. *bone bridging*) i ankilozom. Važno je napomenuti da težina, trajanje i posljedice artritisa i entezitisa u tijeku bolesti nisu međusobno proporcionalni.

1.1.5.2. Izvanzglobne manifestacije

Najčešća izvanzglobna manifestacija ErA-a je uveitis, dok se zahvaćenost srca, krvnih žila, pluća, središnjeg živčanog sustava i bubrega u djece javlja tek sporadično.

Uveitis je upala srednje očne ovojnice. Srednja očna ovojnica sastoji se od tri dijela: šarenice i cilijarnog tijela, koji se nalaze ispred leće i čine prednji segment, te žilnice, koja se nalazi iza leće i čini stražnji segment. Upala šarenice naziva se prednji uveitis ili iritis, a u slučaju da je upalom zahvaćeno i cilijarno tijelo, proces se tada naziva iridociklitis. Za opisivanje vrsta uveitisa koji zahvaća područje iza leće koriste se pojmovi vitritis, intermedijarni uveitis, pars planitis, choroiditis, retinitis, chorioretinitis i retinochoroiditis (39). U slučaju zahvaćenosti cijele srednje očne ovojnice proces se zove panuveitis. Suprotno drugim oblicima JIA-a, uveitis je u ErA-u karakteriziran suženjem, crvenilom i bolnošću očiju uz fotofobiju. Obično je unilateralan, često rekurentan i rijetko ostavlja tragove upale (engl. *ocular residua*). Rijetko prethodi nastupu muskuloskeletnih tegoba (40). Učestalost uveitisa u djece s ErA-om manja je od 20%, što je niža učestalost nego u odraslih, no dužim praćenjem djece taj postotak se povećava (41, 42).

Usprkos tome što kardiovaskularne manifestacije ErA-a nisu česte, one povremeno mogu biti ozbiljne, pa je do sada opisano više slučajeva značajne aortne insuficijencije bolesnika s ErA-om (43-50). Smatra se kako je jSpA s HLA-B27 genotipom čimbenik rizika za oštećenje endokarda i miokarda, a u svih bolesnika u kojih je postavljena ova dijagnoza trebao bi se učiniti i pregled dječjeg kardiologa kako bi se isključilo postojanje aortne regurgitacije (43). Naizgled niska učestalost ovih komplikacija u djece može biti posljedica kraćeg perioda praćenja nego kod odraslih, kod kojih se bolesti srca (aortna insuficijencija, srčani blok) razviju u otprilike 5% bolesnika, u prosjeku 15 godina nakon postavljanja dijagnoze spondiloartritisa (51). Rijetko kada je srce zahvaćeno prije no što se jave promjene na sakroilijačnim zglobovima (52).

Malo podataka postoji o zahvaćenosti pluća i pleure u djece s postavljenom dijagnozom SpA-a: u jednom istraživanju pokazalo se da je u 33% bolesnika bez kliničkih znakova plućne bolesti i s normalnim nalazima RTG snimke srca i pluća bio prisutan poremećaj plućne funkcije (53). U uznapredovalom spondilitisu dolazi do smanjenog opsega pokreta prsnog koša i razvoja kifoskolioze, zbog čega se sekundarno može razviti i *cor pulmonale*, no takav tijek bolesti još nije opisan u djece ili adolescenata (22).

Zahvaćenost središnjeg živčanog sustava u djece s ErA-om je rijetka. Opisano je nekoliko slučajeva atlantoaksijalne subluksacije koja je dovela do jake cervikookcipitalne boli (54, 55). Bubrežne komplikacije bolesti također su rijetke. U djece su opisani slučajevi papilarne nekroze, koja se možda razvila i zbog upotrebe nesteroidnih protuupalnih lijekova (NSAIL) te amiloidoze (56, 57).

Prošle godine objavljeno je istraživanje u kojemu je učestalost izvanzglobnih kliničkih manifestacija spondiloartritisa analizirana pregledom brazilskog registra oboljelih, među kojima su bili zastupljeni i bolesnici s jSpA-om (58). Od ukupno 43 bolesnika s jSpA-om, po jedan bolesnik razvio je kardijalnu, pulmonalnu i neurološku, dok su tri bolesnika razvila renalnu manifestaciju bolesti. S obzirom na to da se dijagnoza ErA-a obično postavi na samom početku bolesti, moguće je da će se dužim praćenjem bolesnika sve više otkrivati i ove rijetke, no važne komplikacije (22).

1.1.6. Dijagnostička obrada

Ne postoji patognomonična laboratorijska pretraga krvi na temelju koje bi se mogla postaviti dijagnoza SpA-a. Sedimentacija eritrocita može biti ubrzana, ali taj test nije specifičan. Negativni ANA i RF uz prisutnost HLA-B27 genotipa u djeteta s asimetričnim artritismom i entezitisom mogu pomoći pri postavljanju dijagnoze, no treba imati na umu da manje od 5% ljudi sa HLA-B27 genotipom razvije SpA. Konvencionalnim radiografskim pretragama može se otkriti osteopenija u području stopala i kuka na početku bolesti, dok se u kasnijem tijeku bolesti može otkriti sužavanje zglobnog prostora i ankiloza. Za razliku od odraslih, kod djece je teško pouzdano utvrditi gubitak hrskavice i erozije jednostavnim pregledavanjem radiograma jer se anatomija zglobova koji rastu tijekom vremena mijenja (59). Usprkos tome što su konvencionalne radiografske pretrage indicirane u početnoj procjeni zahvaćenosti sakroilijakalnih zglobova, one često nisu dovoljno specifične za prikazivanje ranih promjena koje nastaju u sakroileitisu, tako da je za pojašnjavanje patologije i rano postavljanje dijagnoze SpA-a potrebno primijeniti druge slikovne metode (60). S obzirom na to da je entezitis u većini slučajeva teško prepoznati kliničkim pregledom, ultrazvuk (UZV) predstavlja važan dodatni alat za potvrdu dijagnoze u bolesnika kojima je postavljena sumnja na SpA (61). Mnoga istraživanja koja su koristila UZV pokazala su da je klinički neprepoznati entezitis često prisutan na donjim udovima (62). Nadalje, UZV se pokazao dobar i za praćenje odgovora na terapiju u ovih bolesnika (63). S druge strane, za otkrivanje entezitisa može se koristiti i magnetska rezonancija (MR), koja može poslužiti i za otkrivanje promjena na sakroilijakalnim zglobovima kod djece s bolovima u kralježnici upalne prirode u kojih je RTG nalaz sakroilijakalnih zglobova uredan (64, 65). MR može otkriti upalu sakroilijakalnih zglobova čak i kod djece koja nemaju kliničke simptome (66). Stoga možemo zaključiti da su MR i UZV vrlo korisni u ranom otkrivanju i praćenju aktivnosti ove bolesti.

1.1.7. Liječenje

Kao i u slučaju drugih reumatskih bolesti, temelj liječenja bolesnika s jSpA-om, uz fizikalnu terapiju, čine NSAIL (7). Oni omogućuju olakšanje simptoma kod većine bolesnika, a ispitivanja u kojima su sudjelovali odrasli bolesnici s AS-om pokazala su da iznimno mogu dovesti i do remisije bolesti. Nadalje, intraartikularne injekcije steroida mogu pomoći u kontroli lokalnog perzistentnog artritisa, a sistemski kortikosteroidi (oralni ili intravenozni) mogu se primijeniti za kratkotrajnu kontrolu teških oblika bolesti. Međutim, zbog utjecaja na zdravlje kostiju i rast, važno je da upotreba sistemskih kortikosteroida u dječjoj dobi bude vremenski ograničena. I antireumatski lijekovi koji utječu na tijek bolesti (engl. *disease-modifying antirheumatic drugs*, DMARD) imaju svoje mjesto u liječenju bolesnika u kojih su zahvaćeni uglavnom periferni zglobovi. U raznim ispitivanjima pokazalo se da upotreba sulfasalazina u većine bolesnika s jSpA-om dovodi do poboljšanja kliničke slike, dok se metotreksat koristi isključivo na temelju iskustava stečenih u liječenju drugih oblika JIA-a, s obzirom na to da do sada nije provedeno istraživanje koje bi ispitalo učinkovitost metotreksata u liječenju ovih bolesnika. Osim toga, nije poznato ni da li ovakav oblik liječenja ima utjecaja na bolesnike s aksijalnim oblikom bolesti, zbog čega se kod njih preporučuje primjena biološke terapije. Provedeno je nekoliko ispitivanja u kojima su bolesnici s jSpA-om liječeni infliximabom ili etanerceptom, a sva su pokazala da je u većine došlo do poboljšanja kliničke slike, bez neželjenih reakcija. Naša iskustva također pokazuju da su biološki lijekovi doveli do kliničke remisije bez lijekova u dva od tri bolesnika s postavljenom dijagnozom ErA-a (67). Naposljetku, Američko reumatološko društvo (engl. *American College of Rheumatology*, ACR) nedavno je izdalo smjernice za liječenje JIA-a koje se mogu primijeniti i na liječenje ErA-a (68).

1.2. Klasifikacija imunoloških bolesti

Grubo gledano, imunološki sustav sastoji se od dva dijela: primitivnijeg, koji se naziva prirođeni, odnosno nespecifični, te vrlo sofisticiranog, koji se naziva stečeni, odnosno specifični imunološki sustav. Oba dijela zajedno čine integrirani sustav obrane domaćina. Uz znatna preklapanja, prirođeni imunološki sustav čini prvu liniju obrane i ima ključnu ulogu u ranom prepoznavanju i započinjanju proupalnog odgovora, dok je stečeni sustav uglavnom odgovoran za eliminaciju patogena i stvaranje imunološke memorije. Tradicionalno, na autoimunost se gleda kao na grešku u odgovoru stanica stečenog imunološkog sustava na vlastite antigene (69). Međutim, bolje razumijevanje genetske podloge različitih bolesti

povezanih s mutacijama koje uzrokuju promjene u imunološkom sustavu narušilo je postojeću paradigmu o autoimunskim bolestima, pa stoga danas razlikujemo autoimunosne i autoinflamatorne bolesti (70). Autoimunosne bolesti shvaćaju se kao upalne bolesti u kojima odgovor aberantnih dendritičkih stanica te limfocita B i T vodi do prekida tolerancije i razvoja reakcije imunološkog sustava na vlastite antigene. Glavnu ulogu u mogućem kliničkom izražaju autoimunskih bolesti ima stečena imunost, a antitijela specifična za organe mogu se pojaviti godinama prije nego što bolest postane klinički prepoznatljiva. S druge strane, smatra se da u autoinflamatornim bolestima lokalni čimbenici na predodređenim mjestima aktiviraju stanice prirodene imunosti, uključujući makrofage i neutrofile, što vodi do oštećenja ciljnih tkiva neovisno o stečenoj imunosti. Mehanizme koje leže u podlozi svake imunološke bolesti stoga možemo gledati kao autoimunosne, autoinflamatorne ili kao kombinaciju autoimunskih i autoinflamatornih (71). Ipak, paradigma o autoimunskim bolestima toliko je dugo dominirala imunologijom da su poimanja mnogih poremećaja prilagođena kako bi odgovarala prevladavajućoj dogmi. Stoga prihvaćanje “kontinuiranog modela” imunologije, u kojem bolesti leže u spektru od autoimunskih do autoinflamatornih, omogućuje klasificiranje svih neinfektivnih upalnih bolesti te definiranje relativnog doprinosa prirodnog i stečenog imunološkog odgovora određenoj bolesti (tablica 2).

Tablica 2. Kontinuum imunoloških bolesti s primjerima.

RIJETKE MONOGENSKE AUTOINFLAMATORNE BOLESTI	FMF, TRAPS, HIDS, PAPA; Blau sindrom (uveitis);
POLIGENSKA AUTOINFLAMATORNE BOLESTI	Crohnova bolest, ulcerativni kolitis; Degenerativne bolesti, npr. osteoartritis; Giht/pesudogiht/druge kristalne artropatije; Neke kategorije reaktivnog artritisa i psorijaze/psorijatičnog artritisa (bez povezanosti s MHC); Samoograničavajući upalni artritis uključujući bolesti koje se klinički prezentiraju kao RA; Bolesti nakupljanja/prirodne bolesti povezane s upalom vezivnog tkiva; Vaskulitisi koji nisu povezani s antitijelima uključujući Takayasu arteritis i Idiopatski uveitis; Akne i povezane bolesti; Neke neurološke bolesti, npr. akutni diseminirani encefalomijelitis; Bolesti povezane s nodoznim eritemom, uključujući sarkoidozu;

KOMBINIRANE BOLESTI (autoinflamatorni i autoimunosni mehanizmi)	Ankilozantni spondilitis; Reaktivni artritis; Psorijaza/Psorijatični artritis; Behcetov sindrom; Uveitis (povezan s HLA-B27);
KLASIČNE POLIGENSKE AUTOIMUNOSNE BOLESTI	Reumatoidni artritis; Autoimunosni uveitis (simpatička oftalmija); Celijakija; Primarna bilijarna ciroza; Autoimunosni gastritis/perniciозна anemija; Autoimunosni tireoiditis; Addisonova bolest; Pemfigus, pemfigoid, vitiligo; Miastenia gravis; Dermatomiozitis, polimiozitis, skleroderma; Goodpastureov sindrom; ANCA povezani vaskulitisi; Dijabetes tipa I; Sjorgenov sindrom; Sistemska eritematska bolest;
RIJETKE MONOGENSKE AUTOIMUNOSNE BOLESTI	ALPS, IPEX, APECED;

Objašnjenje: monogenske autoinflamatorne bolesti određene su isključivo lokalnim tkivno-specifičnim čimbenicima, dok je u rijetkim monogenim autoimunim bolestima lokalizacija određena stečenim imunološkim odgovorom. Klinička heterogenost imunoloških bolesti, kako među bolesnicima a tako i među populacijama, može biti posljedica različitog izražaja autoinflamatornih i autoimunih čimbenika koji uzrokuju bolest. Skraćenice: FMF, engl. *familial mediterranean fever*; TRAPS, engl. *tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome*; HIDS, engl. *hyperimmunoglobulin D syndrome*; PAPA, engl. *pyogenic arthritis, pyoderma gangrenosum, acne*; ALPS, engl. *autoimmune lymphoproliferative syndrome*; IPEX, engl. *immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked*; APECED, engl. *autoimmune polyendocrine syndrome*. Preuzeto iz McGonagle D, McDermott MF. *A proposed classification of the immunological diseases. PLoS Med* 2006;3:e297.

1.3. Patogeneza upale u spondiloartritisu

SpA je multifaktorijalna bolest u kojoj dolazi do poremećenog međudjelovanja imunološkog sustava i čimbenika okoliša u ljudi s predisponirajućim genotipom, što dovodi do upale i strukturnih oštećenja ciljnog tkiva (72). Jedan od predisponirajućih čimbenika okoliša mogla bi biti bakterijska infekcija, obzirom da je ustanovljena veza adultnih oblika SpA s različitim enteričnim patogenima, *Chlamydom* i *Clostridiumom* (73-75). Osim toga, kod juvenilnih oblika ustanovljena je i veza s *Mycoplasma pneumoniae* (76). Nadalje, različiti oblici akutnih i kroničnih artritisa povezuju se s virusima poput parvovirusa B19, Epstein Barr virusa, citomegalovirusa i virusa iz roda alfavirusa (77). S druge strane, na poremećaj u

međudjelovanju imunološkog sustava može utjecati i HLA genotip (78). Međutim, još uvijek nije jasno ima li ključnu ulogu u imunopatogenezi spondiloartritisa prirođeni imunološki sustav, stečeni imunološki sustav ili možda oba.

1.3.1. Uloga stečenog imunološkog sustava

Stečena imunost posredovana je limfocitima koji imaju sposobnost specifičnog prepoznavanja različitih antigena (22). Limfociti koji još nisu susreli antigen nazivaju se naivnim limfocitima, a nakon što prepoznaju specifični antigen, dolazi do njihove aktivacije. Aktivirani limfociti diferenciraju se u memorijske limfocite i izvršne limfocite. Izvršni limfociti pokreću složeni odgovor koji rezultira odstranjenjem antigena, pri čemu im pomažu molekule i stanice prirođenog imunološkog sustava, dok memorijski limfociti pamte određeni antigen, te u slučaju ponovnog susreta s istim antigenom pokreću odgovor koji rezultira njegovim bržim odstranjenjem. Važna sposobnost limfocita je da prepoznaju i odstranjuju samo strane antigene, a u normalnim okolnostima ne štete vlastitim antigenima. Svi limfociti imaju neka zajednička morfološka obilježja, no razlikuju se po mjestu nastanka, načinu na koji prepoznaju antigen te ulogama koje imaju u stečenoj imunosti. Općenito se dijele na limfocite B, koji stvaraju antitijela odgovorna za uklanjanje stranih antigena iz krvi i izvanstaničnih prostora (humoralna imunost), te limfocite T, koji su važni za regulaciju limfocita B i uklanjanje stanica u kojima se nalazi strani antigen (stanična imunost).

Limfociti T razvijaju se u prsnoj žlijezdi (timusu), a ovisno o molekulama izraženim na površini razlikuju se citotoksični limfociti T (engl. *cytotoxic T cells*, CTL), koji izražavaju molekule CD8, te pomoćnički limfociti T (engl. *T helper cells*, TH), koji izražavaju CD4 molekule. Svi limfociti T na svojoj površini imaju izraženi receptor (engl. *T-cell Receptor*, TCR) u sklopu kojeg se nalazi CD3 kompleks, zadužen za prijenos signala nastalog prepoznavanjem specifičnog antigena u unutrašnjost stanice. Kako bi ga TCR prepoznao, specifični antigen mora biti prikazan u kompleksu s MHC molekulom. Sve stanice s jezgrom na svojoj površini imaju izražene MHC molekule razreda I, u sklopu kojih antigen prepoznaju CD8 limfociti T. S druge strane, samo neke stanice poput dendritičkih stanica, makrofaga i limfocita B na svojoj površini imaju izražene i MHC molekule razreda II, u sklopu kojih antigen prepoznaju CD4 limfociti T, pa te stanice nazivamo stanicama koje predočavaju antigen (engl. *antigen presenting cell*, APC). Inicijalna interakcija naivnih limfocita T i APC-a posredovana je adhezijskim molekulama. U slučaju da naivni limfociti T prepoznaju specifični antigen predočen u kompleksu s MHC molekulom, dolazi do konformacijskih

promjena adhezijskih molekula koje pojačavaju adheziju između stanica. Ako ne dođe do prepoznavanja specifičnog antigena, limfociti T odlaze do druge APC. Vezanjem TCR-a i koreceptora (CD4 ili CD8) prenosi se prvi signal koji pokazuje da je prepoznat specifični antigen. Međutim, za aktivaciju limfocita T, potreban je i drugi, kostimulacijski signal, koji najsnažnije prenose kostimulatorne molekule. Takve specijalizirane molekule nalaze se uglavnom na površini APC-a, a najpoznatije su B7.1 (CD80) i B7.2 (CD86). Njihovi receptori su molekule koje nose naziv CD28 i CTLA-4 (engl. *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*), a osim njih na površini limfocita T otkrivene su i mnoge druge kostimulatorne molekule kao što je ICOS (engl. *inducible costimulator*), koji je vrlo sličan molekuli CD28, te PD-1 (engl. *programmed death-1*), koji je sličan CTLA-4 molekuli. Nakon što je dobiven prvi signal, ligacija B7 molekula na CD28 receptor pokreće aktivaciju limfocita te izražaj CTLA-4 molekula na površini stanice. CTLA-4 molekule imaju veći afinitet za B7 molekule i stanici daju negativni signal, čime ograničavaju proliferaciju aktiviranih limfocita T. Stoga možemo reći da interakcija CD28 i CTLA-4 molekula s B7.1 i B7.2 molekulama čini regulatorni sustav koji osigurava da se imunološki sustav uključi kada je potreban te isključi kada nije. Ako izostane kostimulacijski signal, stanica postaje anergična, tj. ne reagira na daljnja podraživanja antigenom, a jednom aktivirani limfociti T (uključujući i memorijske stanice) ne zahtijevaju ponovnu kostimulaciju. Sama aktivacija limfocita pokreće se preko različitih signalnih puteva u kojima fosforilacijom proteinskih tirozin kinaza nastaje kaskada koja pojačava početni signal i dovodi do pojačane sinteze transkripcijskih čimbenika. Dva takva važna signalna puta su kalcineurinski ili fosfoinozitolski put, koji aktivira transkripcijske čimbenike NFAT (engl. *nuclear factor that activate T-cells*) i NF- κ B (engl. *nuclear factor kappa B*), važne za sintezu IL-2 potrebnog za proliferaciju i aktivaciju limfocita T, te put MAPK (engl. *mitogen-activated protein kinases*), u kojem se aktiviraju transkripcijski čimbenici *jun* i *fos*, važni za poticanje staničnog ciklusa i proliferaciju. Zbog vrlo destruktivnih učinaka na stanice, naivni CD8 limfociti T pod strogom su kontrolom i potrebna im je visoka razina kostimulatorne aktivnosti kako bi ih APC mogle aktivirati. S druge strane, jednom aktivirani CD4 limfociti T pod utjecajem citokina stvorenih odgovorom prirođenog ili stečenog imunološkog sustava, mogu se diferencirati u TH1, TH2 ili TH17 stanice preko različitih signalnih puteva (79, 80) (tablica 3).

Tablica 3. Razvoj i uloga TH1, TH2 i TH17 odgovora.

ODGOVOR	TH1	TH2	TH17
POKRETAČI	IL-12, IFN- γ	IL-4	IL-1, IL-6, IL-23
SIGNALNI PUTEVI	STAT1, STAT4	STAT6	STAT3
ČIMBENICI TRANSKRIPCije	T-bet	GATA-3	RoR- γ t
STVORENI CITOKINI	IL-2, IFN- γ , TNF- α	IL-4, IL-5, IL-10, IL-13	IL-17, IL-22
UKLJUČENE STANICE	Makrofazi, CD8 limfociti T	Limfociti B	Neutrofili, Makrofazi
ULOGA ODGOVORA	Zaštita od unutarstaničnih bakterija	Zaštita od izvanstaničnih parazita	Zaštita od izvanstaničnih bakterija
POREMEĆAJI I BOLESTI	Autoimunosni poremećaji	Atopijske bolesti	Kronične upalne i/ili autoimunosne bolesti

Skraćenice: STAT, engl. *signal transducer and activator of transcription*.

Aktivirani CD4 limfociti T imaju važnu ulogu u stečenom imunološkom odgovoru i mogu aktivirati ostale stanice poput limfocita B, makrofaga te CD8 limfocita T, zbog čega je i njihova aktivacija precizno kontrolirana. Na taj način izbjegava se reakcija na vlastite antigene ili prekomjerna reakcija na ostale antigene. Disregulacija TH1 odgovora potiče autoimunosne poremećaje posredovane staničnom imunošću, pretjerana aktivnost TH2 odgovora povezana je sa atopijskim bolestima, a TH17 stanice vjerojatno su odgovorne za kronične upalne i/ili autoimunosne bolesti.

Limfociti B razvijaju se u koštanoj srži i slezeni, a glavno im je obilježje stvaranje antitijela, odnosno imunoglobulina, specifičnih za različite topive antigene. Imunoglobulini se sastoje od dva teška i dva laka lanca, a ovisno o građi može se razlikovati pet različitih razreda (IgM, IgD, IgG, IgA i IgE). U naivnim limfocitima B imunoglobulini se nalaze na površini stanica i služe kao receptori za specifične antigene. Pomoću njih se dobiva prvi signal za aktivaciju limfocita B. U većini slučajeva drugi je signal potreban i za aktivaciju limfocita B. Njega mogu isporučiti TH limfociti, koji su se već susreli s istim antigenom, te ga mogu prepoznati na površini limfocita B, u sklopu MHC molekula razreda II. Nakon prepoznavanja specifičnog antigena i dobivanja drugog signala, TH limfociti na svojoj površini izražavaju CD40L molekulu, koja se veže na CD40 molekulu, izraženu na površini limfocita B. Molekula CD40 pripada obitelji TNF receptora (engl. *tumor necrosis factor receptor*, TNFR), a nakon vezanja molekule CD40L, na njen unutarstanični dio vežu se proteini TRAF (engl. *TNF receptor-associated factors*), odgovorni za aktivaciju enzimske kaskade koja dovodi do aktivacije čimbenika transkripcije (NF- κ B, AP-1) te do lučenja različitih razreda

imunoglobulina. Osim toga, aktivirani TH limfociti, zajedno s makrofazima, utječu na limfocite B i preko citokina (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6) koji, osim lučenja različitih razreda proteina, potiču i proliferaciju limfocita B. S druge strane, postoje antigeni koji mogu aktivirati limfocite B bez pomoći limfocita T. Takvi antigeni obično su polimeri polisaharida ili glikolipidi prisutni u staničnoj stijenci bakterija, a mnogi od njih aktiviraju i sustav komplementa koji daje drugi signal za aktivaciju limfocita B. Spomenuti antigeni aktiviraju signalnu kaskadu preko ITAM-a (engl. *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*), a značajnu ulogu u aktivaciji ima i kompleks koreceptora CR2-CD19-CD81, izražen na površini limfocita B. Jednom aktivirani limfociti B diferenciraju se u plazma stanice, koje luče različite razrede imunoglobulina, a mnogi od njih povezani su s različitim autoimunskim bolestima.

Kako bi se održala homeostaza, vrlo je važno da se nakon odstranjenja tuđih antigena imunološki sustav vrati u stanje mirovanja te da se spriječi aktivacija limfocita koji prepoznaju vlastite antigene, zbog čega postoji nekoliko mehanizama kojima se regulira imunološki odgovor. Jedan od njih je negativna kostimulacija molekulama kao što su CTLA-4, koje u fiziološkim uvjetima zaustavljaju aktivaciju limfocita T. Budući da različiti citokini mogu istovremeno suprimirati aktivaciju jednih, a poticati aktivaciju drugih stanica koje sudjeluju u imunološkom odgovoru, važan mehanizam regulacije je i kontraregulacija citokinima. Osim toga, prije dvadesetak godina opaženo je da se izdvajanjem CD4 limfocita T, koji izražavaju molekulu CD25, iz populacije ostalih CD4 limfocita T, stvara populacija stanica koja uzrokuje različite autoimunosne bolesti ako se prenese u imunokompromitiranog domaćina. Ubrzo su te stanice nazvane regulatornim limfocitima T (Treg). Glavni čimbenik transkripcije ovih stanica je Foxp3. Pokazalo se da se te stanice stvaraju u prsnoj žlijezdi (prirodni Treg, prirodni Treg, nTreg), a nedavno je postalo jasno da se mogu stvoriti i izvan prsne žlijezde (adaptirani Treg, inducirani Treg, iTreg). Različita istraživanja pokazala su mnogobrojne uloge koje Treg limfociti imaju u oblikovanju imunološkog sustava i upalnog odgovora. Nadalje, vrlo važan mehanizam kontrole imunološkog odgovora je i uklanjanje limfocita programiranom smrću stanice, odnosno apoptozom. Apoptoza se može pokrenuti zbog slabljenja ili izostanka pozitivnih signala za preživljavanje stanice, ili zbog primanja negativnih signala, a završava aktivacijom kaskadnog proteolitičkog sistema, u kojem glavnu ulogu imaju proteaze koje se nazivaju kaspaze, što na kraju dovodi do razgradnje stanice. Limfociti kojima su uskraćeni signali za preživljavanje, koje im pružaju kostimulatorne molekule i citokini, više ne izražavaju antiapoptotske proteine, koji uglavnom pripadaju Bel

obitelji, zbog čega se razgrađuju putem apoptoze. Nasuprot tome, primanje negativnih signala u limfocitima povezano je s molekulom Fas (CD95) i molekulom koja služi kao odgovarajući ligand (Fas ligand ili CD95L). Fas, zajedno s molekulom CD40, pripada TNFR obitelji, koja ima važnu ulogu u regulaciji preživljavanja i proliferacije stanice te apoptoze. Aktivirani limfociti T na svojoj površini izražavaju Fas molekule, ali i Fas ligand molekule, a interakcija ovih molekula u konačnici također rezultira apoptotičkom razgradnjom stanice. Naposljetku, važan mehanizam kontrole stečenog imunološkog odgovora predstavlja i razgradnja citoplazmatskog materijala autofagijom. Ovaj mehanizam ima ulogu u preživljavanju i smrti limfocita T te u predočavanju citoplazmatskih antigena u sklopu MHC molekula razreda II stanicama stečenog imunološkog sustava. Poremećaj u bilo kojem od opisanih regulatornih mehanizama može dovesti do nesklada u imunološkom sustavu te do razvoja autoimunosne bolesti.

S obzirom na opisanu složenost stečenog imunološkog odgovora, jasno je da postoji mnogo mjesta na kojima stvari mogu krenuti u krivom smjeru, što naposljetku dovodi do razvoja bolesti. Mnoga istraživanja pokazala su da stečeni imunološki sustav ima važnu ulogu i u razvoju SpA-a. Neka od njih ukazuju na općenitu ulogu limfocita T, neka na ulogu TH1 i TH17 limfocita, a neka i na ulogu Treg limfocita. Tako su imunohistokemijska istraživanja pokazala da važnu ulogu u razvoju akutnih upalnih lezija u aksijalnom dijelu kostura i u zglobu kuka imaju limfociti T, što je potvrđeno predominacijom CD3, CD4 i CD8 limfocita T u upalnim infiltratima u subhondralnoj kosti i koštanoj srži (81). Istovremena prisutnost CD20 limfocita B u upalnim infiltratima ukazala je na moguću ulogu limfocita B u razvoju inflamatornih lezija u bolesnika s AS-om, no činjenica da se ErA može razviti i kod bolesnika s Brutonom bolešću pokazuje da za razvoj bolesti nisu potrebni funkcionalni limfociti B i/ili imunoglobulini (82). Ipak, u nekoliko istraživanja pokazalo se da bolesnici s AS-om imaju povišenu koncentraciju IgA-a u krvi (83-85). Smatra se kako je povišena koncentracija IgA-a prisutna uglavnom za vrijeme aktivne upalne faze bolesti, a budući da su crijeva najveći organ koji ima sposobnost lučenja IgA-a prilikom susreta s različitim infektivnim uzročnicima, povišena koncentracija IgA-a kod bolesnika s AS-om govori u prilog mogućnosti da su infektivni uzročnici u crijevima pokretači upalnog procesa. O ulozi TH17 limfocita u razvoju SpA-a govore istraživanja u kojima je otkriven polimorfizam gena za IL-23R u bolesnika s AS-om (86-88). Nadalje, pokazalo se da je u perifernoj krvi bolesnika sa SpA-om prisutan veći broj TH17 limfocita nego kod bolesnika s reumatoidnim artritismom (RA) ili kod zdravih kontrola (89). Osim toga, bolesnici s ReA-om i nediferenciranim SpA-

om u sinovijalnoj tekućini imaju veću koncentraciju IL-17, IL-6 i IFN- γ , u usporedbi s bolesnicima kojima je postavljena dijagnoza RA-a, što također ukazuje na ulogu TH1 i TH17 limfocita u SpA-u (90). Istraživanje u kojem su sudjelovali bolesnici s postavljenom dijagnozom ErA-a pokazalo je da u perifernoj krvi tih bolesnika nema promjene u koncentraciji TH1, TH2, TH17 i Treg stanica, no koncentracija TH1 i TH17 stanica bila je povišena, a TH2 snižena kada su se usporedile koncentracije u sinovijalnoj tekućini s koncentracijama u krvi. Istraživači su zaključili da bi za povećanu koncentraciju TH17 stanica mogle biti odgovorne povišene koncentracije IL-1 i IL-6 u sinovijalnoj tekućini (91). Na kraju, u nekoliko bolesti imunološkog sustava, uključujući RA i JIA, opisane su greške u funkciji Treg limfocita ili njihov smanjen broj (92, 93). Međutim, nedavno provedeno istraživanje pokazalo je da postoji odnos reciprociteta između TH17 i Treg limfocita pa tako stanja koja obično pogoduju razvoju Treg limfocita i stvaranju imunološke tolerancije mogu biti narušena upalnim signalima koji potiču stvaranje TH17 na uštrb Treg limfocita (94). Niti jedno od ovih istraživanja nije dalo sveobuhvatni odgovor o upletenosti stečenog imunološkog sustava u razvoj SpA-a, no svako od njih predstavlja elemente slagalice koja nam pomaže u stvaranju široke slike o mehanizmima koji leže u podlozi ove složene bolesti.

1.3.2. Uloga prirođenog imunološkog sustava

Temeljni dijelovi prirođenog imunološkog sustava su fizičke i kemijske zapreke (epitel i antimikrobni sastojci), cirkulirajući proteini (sustav komplementa i citokini) te stanice s fagocitnom aktivnošću (neutrofili, makrofazi i prirodno ubilačke (engl. *natural killer*, NK) stanice). Stanice prirođenog imunološkog sustava potječu iz koštane srži, cirkuliraju krvlju u inaktivnom obliku te se mobiliziraju i aktiviraju u perifernim tkivima u slučaju infekcije, ozljede ili prisustva proupalnog stimulansa. Receptori koji se nalaze na tim stanicama (engl. *pattern recognition receptors*, PRR) prepoznaju strukture na patogenima (engl. *pathogen-associated molecular patterns*, PAMP) te potiču stanicu na “gutanje” patogena i izlučivanje proteina koji aktiviraju specifičnu imunost. Osim neutrofila, makrofaga i NK stanica, u prirođenom imunološkom sustavu sudjeluju i dendritičke stanice koje predočavaju antigene te utječu na diferencijaciju TH i Treg limfocita, zbog čega imaju važnu ulogu u posredovanju između prirodene i stečene imunosti. Ujedno, prirodni imunološki sustav utječe na stečeni posredstvom mnogih citokina, stoga je jasno da su prirodna i stečena imunost međusobno usko povezane te da se poremećaj prirodene imunosti lako može reflektirati na stečenu imunost.

Mnoga istraživanja pokazala su da, osim stečene, i prirođena imunost ima važnu ulogu u razvoju SpA-a. Tako je imunohistokemijska analiza sinovijalnog tkiva zahvaćenog kroničnim upalnim artritisom pokazala predominantnu infiltraciju stanica prirođenog imunološkog sustava, među kojima su se najviše isticali makrofazi (95). Poznato je da se tijekom procesa sazrijevanja makrofazi mogu polarizirati lokalnim čimbenicima u funkcionalno različite podvrste, ovisno o tome djeluju li ti čimbenici proupalno ili protuupalno. Klasično aktivirani makrofazi (M1) specijalizirani su za čišćenje unutarstaničnih patogena, dok alternativno aktivirani makrofazi (M2) imaju imunoregulatorna svojstva te su uključeni u čišćenje ostataka upale, angiogenezu i popravak tkiva. IFN- γ je glavni induktor M1 makrofaga, dok se indukcija M2 makrofaga postiže različitim posrednicima poput IL-4 i IL-10 te kostimulacijom s imunim kompleksima (engl. *immune complex*, IC) i TLR ligandima (96). Pokazalo se da broj makrofaga u upaljenoj zglobojnoj ovojnici kolerira s aktivnošću bolesti te da se smanjuje nakon učinkovitog liječenja bolesnika s RA-om, ali i sa SpA-om (97-102). Usprkos tome što je u jednih i drugih bolesnika broj makrofaga u zglobojnoj ovojnici bio otprilike isti, u bolesnika sa SpA-om otkriven je znatno veći broj makrofaga koji na svojoj površini izražavaju molekulu CD163, prisutnu samo na M2 makrofazima (98, 103, 104). Povećana koncentracija spomenutih makrofaga otkrivena je i u mukozi crijeva bolesnika s postavljenom dijagnozom SpA-a (105). Funkcionalne posljedice ovakve polarizacije u smjeru M2 makrofaga još nisu sasvim jasne, no pokazalo se da povećan broj makrofaga s izraženom CD163 molekulom u sinoviji bolesnika sa SpA-om te lokalno stvaranje topivog CD163 (sCD163) propagiraju upalni proces i dovode do poremećene aktivacije limfocita T, što ukazuje na dvostruku ulogu ovih makrofaga (103). Analiza zglobojne tekućine također je pokazala nesrazmjer između M1 i M2 makrofaga u bolesnika sa SpA-om (106). Analiza genskoga izražaja makrofaga dobivenih iz periferne krvi bolesnika s AS-om, pokazala je da u tih bolesnika možda postoji defekt u genu za IFN- γ , što bi zasigurno moglo utjecati na patogenezu bolesti (107). Makrofazi u bolesnika sa SpA-om stvaraju TNF, IL-1 i IL-23, glavne proupalne citokine važne u patofiziologiji ove bolesti, ali i IL-10 koji ima ključnu ulogu u održavanju imunološke tolerancije (95). Uloga TNF- α poprilično je jasna, s obzirom na to da blokada TNF- α dovodi do značajnog smanjenja aktivnosti bolesti te smanjenja broja sinovijalnih makrofaga, neutrofila i limfocita T (108, 109). Nadalje, istraživanja su pokazala da je polimorfizam gena za IL-1 i IL-23 povezan s povećanom predispozicijom za ovu bolest (86, 110). Ranije je spomenuto da IL-23, preko STAT-3 ovisnog puta, potiče transkripciju IL-17, za koji se smatra da ima važnu ulogu u povezivanju stečenog i prirođenog imunološkog

odgovora (tablica 3). Analiza perifernih zglobova i zglobova kralježnice u bolesnika sa SpA-om pokazala je da IL-17 ne izlučuju samo TH17 limfociti T, nego i stanice prirodnog imunološkog sustava, uključujući bazofile i neutrofile (111-113). Klinička ispitivanja pokazala su pak odličan učinak neutralizirajućeg antitijela na IL-17 u liječenju mnogih autoimunskih bolesti, uključujući i spondiloarthritis (114). Još uvijek nije sasvim jasno je li poremećena regulacija protuupalnog citokina IL-10 povezana sa SpA-om, no već sada postoje istraživanja koja podupiru ovu hipotezu (115, 116). Na kraju možemo zaključiti da su navedena istraživanja pokazala kako makrofazi, ali i ostale stanice prirodnog imunološkog sustava, zajedno s citokinima koje izlučuju, imaju važnu ulogu u SpA-u te da ne smiju biti izostavljeni prilikom opisivanja patogenetskog mehanizma koji leži u podlozi ove bolesti.

1.4. Patogeneza oštećenja u spondiloarthritisu

Osim upale, važna karakteristika spondiloarthritisu je prominentno remodeliranje koštanog tkiva koje vodi k osteoproliferaciji i ankilozi. Remodeliranje kosti je osnovni metabolički proces koji regulira strukturu i funkciju kosti tijekom života (117). Kako bi se održao strukturni integritet i homeostaza minerala u tijelu, kost se neprestano remodelira. U tom procesu glavnu ulogu imaju dvije vrste stanica: osteoblasti i osteoklasti. Osteoblasti potječu od mezenhimskih matičnih stanica koje se mogu diferencirati u zrele osteoblaste. To su jedine stanice odgovorne za stvaranje koštanog tkiva koje je regulirano preko nekoliko signalnih puteva, od kojih je najvažniji Wnt. Osim njega, u diferencijaciju osteoblasta i stvaranje kosti uključeni su signalni putevi u kojima sudjeluju transformirajući čimbenik rasta β (engl. *transforming growth factor beta*, TGF- β) i koštani morfogenetski protein (engl. *bone morphogenic protein*, BMP). S druge strane, osteoklasti su zaduženi za resorpciju kosti, zbog čega otpuštaju hidrolitičke enzime iz obitelji katepsina (engl. *cathepsin*) i metaloproteinaze matriksa (engl. *matrix metalloproteinases*, MMP). To su velike multinuklearne stanice koje pripadaju mononuklearnom fagocitnom sustavu i nastaju spajanjem zrelih monocita i makrofaga u procesu zvanom osteoklastogeneza. Kako bi se taj proces mogao odvijati, potrebni su čimbenici koje stvaraju stromalne stanice koštane srži, osteoblasti ili limfociti T. Dva takva čimbenika neophodna za odvijanje procesa osteoklastogeneze su čimbenik stvaranja monocitnih kolonija (engl. *macrophage colony-stimulating factor*, M-CSF) i ligand receptora za pobudu jezgrinog čimbenika kappa-B (engl. *receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*, RANKL). M-CSF stvaraju osteoblasti i stanice koštane srži, neophodan je za maturaciju makrofaga, a veže se na receptor čimbenika stvaranja monocitnih kolonija (engl.

macrophage colony-stimulating factor receptor, c-fms), koji je izražen na prekursorima osteoklasta gdje potiče njihovo preživljavanje i proliferaciju. RANKL izražavaju osteoblasti, limfociti T i endotelne stanice, veže se na RANK koji je prisutan na osteoklastima i prekursorima osteoklasta i neophodan je za stvaranje osteoklasta. Aktivnost RANKL-a može antagonizirati prisutnost topljivog lažnog receptora (engl. *decoy receptor*) osteoprotegerina (OPG). S obzirom na to da osteoblasti stvaraju i RANKL i OPG, oni imaju ključnu ulogu u kontroli odnosa između formacije i resorpcije koštanog tkiva. Pokazalo se da povišena koncentracija topljivog RANKL-a (engl. *soluble RANKL*, sRANKL), smanjena koncentracija OPG-a i povišen omjer sRANKL/OPG u sinovijalnoj tekućini djece s JIA-om dovodi do gubitka kosti (118).

Kako bi se objasnio nastanak strukturnih oštećenja u SpA-u, razvijeno je nekoliko hipoteza (119). Prva od njih polazi od toga da su promjene na kostima, slično kao u RA-u, erozivne prirode te da se tipične strukturne karakteristike bolesti ne mogu objasniti ako se pretpostavi drugačije. Tome u prilog govore slikovne i histološke metode koje jasno pokazuju da su razaranje kosti i erozija vrlo karakteristične kako za aksijalni, tako i za periferni spondiloarthritis. Sukladno tome, smatra se da su na mjestima upale aktivirani signalni putevi koji dovode do razaranja hrskavice i kosti te, kao i u RA-u, uvelike ovise o TNF- α (120). U skladu je s navedenim spoznajama i druga hipoteza koja tvrdi da su strukturne karakteristike SpA-a povezane s važnim putevima koji sudjeluju u stvaranju kosti. Na modelu spontanog AS pokazalo se da BMP sudjeluje u glavnom signalnom putu koji vodi do strukturnih promjena, a dodatne analize pokazale su da je isti put aktivan i u ciljnom tkivu bolesnika sa SpA-om. Nadalje, u TNF- α transgeničnom mišu aktivacijom Wnt signalnog puta inhibicijom inhibitora DKK1 (engl. *Dickkopf-related protein 1*) smanjilo se razaranje kosti i potaknula se fuzija sakroilijačnih zglobova. Osim toga, pokazalo se da je u bolesnika sa SpA-om nekoliko inhibitora Wnt signalnog puta nefunkcionalno, zbog čega dolazi do stvaranja novog koštanog tkiva. S obzirom na sve navedeno, smatra se da bi se signalni putevi koji sudjeluju u remodeliranju koštanog tkiva, poput puteva u kojima sudjeluju BMP i Wnt, mogli iskoristiti za liječenje ove bolesti. Naposljetku, u trećoj hipotezi navodi se da je osteoprolifercija u SpA-u barem djelomično odijeljena od upale, za što su predložene dvije dodatne hipoteze prema kojima neki okidač pokreće upalni proces u tkivu ili aktivira stromalne stanice. Tako se prema prvoj dodatnoj hipotezi osteoprolifercija može objasniti intermitentnom prirodom upalnog procesa potaknutog nekim okidačem. U ranoj fazi bolesti, TNF- α uzrokuje razaranje tkiva, a djelovanjem na DKK1 inhibira Wnt signalni put i sprječava remodeliranje tkiva. U kasnijoj

fazi bolesti, kada se smanji koncentracija TNF- α , dolazi do oslobađanja Wnt signalnog puta koji, zajedno s erozijama stvorenima u ranoj fazi bolesti, potiče reaktivnu osteoproliferaciju. Međutim, veza između rane faze upale i naknadnog stvaranja nove kosti u bolesnika s AS-om još je uvijek vrlo upitna, s obzirom na to da se sindesmofiti nalaze na mjestima na kojima nema jasnih znakova upale. Nadalje, ova hipoteza ne objašnjava zašto u različitim modelima do novog stvaranja kosti dolazi neovisno o osteoklastima, odnosno, zašto blokada TNF- α ne sprječava progresiju AS. Prema drugoj dodatnoj hipotezi okidač direktno aktivira stromalne stanice, što djeluje na aktivaciju puteva za stvaranje kosti, među kojima BMP signalni put ima glavnu ulogu, te dovodi do stvaranja novog tkiva neovisno o upalnom procesu ili erozivnim promjenama koje se događaju u ranoj fazi bolesti. Spomenuti okidač najvjerojatnije je mehanički pritisak u sinovijo-enteznom kompleksu. Ove dvije dodatne hipoteze međusobno se ne isključuju, a relativni doprinos oba opisana mehanizma te točan odnos upalnog procesa i aktivacije puteva za stvaranje kosti može imati važne kliničke implikacije. Dok prva hipoteza pokazuje da rano protuupalno liječenje može spriječiti strukturna oštećenja, druga hipoteza pokazuje da je upalu i strukturna oštećenja potrebno promatrati i liječiti odvojeno.

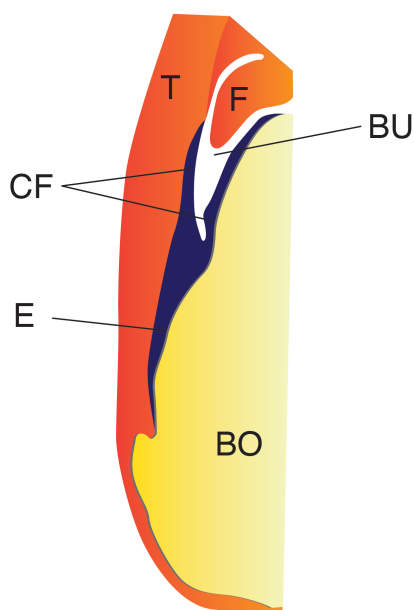
1.5. Histopatologija spondiloartritisa

Opsežna histopatološka analiza oboljelih tkiva i organa ključni je korak u povezivanju određenih molekula ili stanica, čija je uloga opisana u *in vitro* i *in vivo* istraživanjima na životinjskim modelima, s kliničkom prezentacijom različitih bolesti kod ljudi. Usprkos tome što je u bolesnika s postavljenom dijagnozom SpA-a takav pristup ograničen teškom dostupnošću nekih tkiva za biopsiju, brojna histološka istraživanja doprinijela su boljem razumjevanju mehanizama koji leže u podlozi SpA-a te određivanju primarnog sijela upale. Već ranije navedeni su različiti mehanizmi koji leže u podlozi upale, a kao moguća sijela upale danas se najčešće spominju enteze, sinovija i crijevo (121).

1.5.1. Enteze

Entezitis je pojam koji se koristi za opisivanje upale na mjestima na kojima se tetive, ligamenti ili kapsule zglobova spajaju s kostima. Postoje dvije vrste enteza: fibrozne i fobroartilaginozne. Na prvim se fibrozno tkivo tetive ili ligamenta proteže sve do kostiju, a na drugima postoje mali fibroartilaginozni čepići na samom mjestu spajanja (122). Fibroartilaginozne enteze su raširenije i osobito su važne za razvoj entezitisa. Zajedno s priležećom trabekularnom kosti koja podupire kortikalnu ljusku, sinovijalnim vrećama i

masnim tkivom tvore tzv. “entezalni organ”, koji služi za prijenos pritiska na veći dio kosti (123). Pokazalo se da je upravo na ovim mjestima često prisutno oštećenje i stvaranje nove kosti što bi moglo biti vrlo važno za nastanak oštećenja u bolesnika sa SpA-om (124). Histološka analiza mjesta na kojima se u bolesnika sa SpA-om razvija entezitis pokazala je pojačanu vaskularizaciju te infiltraciju makrofaga, uz nešto manji broj limfocita (125). Važno je napomenuti da između enteza i sinovije postoji bliska anatomska povezanost koja je nazvana “sinovijo-entezalnim kompleksom” (126). Budući da je fibrokartilaginozno tkivo avaskularno, ovisno je o sinoviji radi podmazivanja, oksigenacije i čišćenja, te se može očekivati da bilo kakav poremećaj enteza potakne upalni odgovor u priležećoj sinoviji (slika 2) (127).



Slika 2. Shematski prikaz “entezalnog organa” koji se sastoji od enteze (E) fibrokartilaginoznih čepića (FC), sinovijalnih vreća (BU), masnog tkiva (F), tetive (T) i priležeće kosti (BO). Preuzeto iz Harjacek M, Lamot L, Bukovac L, Vidovic M, Joss R. *Juvenile Spondyloarthritis*. U: Harjaček M, ur. *Challenges in Rheumatology: InTech*; 2011, str. 95.

1.5.2. Sinovija

Svi diartrodialni zglobovi obavijeni su zglobnom čahurom koja se sastoji od dva sloja: vanjskog (vlaknasti sloj) i unutarašnjeg (sinovijski sloj, sinovija) (128). Sinovijski sloj je nabran, a nabori se katkada izbočuju duboko u zglobnu šupljinu. Unutrašnja površina sinovije (engl. *lining layer*) obložena je slojem pločastih ili kubičnih stanica koje se zovu sinovociti, a međusobno su odvojene malom količinom osnovne tvari vezivnog tkiva. Razlikuju se dvije vrste spomenutih stanica: sinoviociti A koji su po građi slične stanicama mononuklearnog fagocitnog sustava, nastaju u u koštanoj srži i imaju sposobnost fagocitoze i predočavanja antigena te sinoviociti B koji su slični fibroblastima i nastaju iz mezenhima. Ispod sloja sinoviocita nalazi se sloj rahlog ili gustog vezivnog tkiva (engl. *sublining layer*) u kojem se nalaze krvne žile, fibroblasti, makrofazi i masne stanice (129). Unutar sinovije nalazi se sinovijalna tekućina koja je u normalnim sinovijalnim zglobovima prisutna u vrlo malim količinama i ima dvije funkcije: podmazivanje i prehranu (130). Sinovijalna tekućina kombinacija je filtrata plazme i hijaluronske kiseline koju luče sinoviociti. Koncentracija malih molekula (npr. elektrolita, glukoze) slična je onoj u plazmi, no veće molekule (npr. komponente sustava komplemenata) prisutne su u manjoj koncentraciji u odnosu na plazmu, osim ako nije aktivan upalni proces koji mijenja propusnost krvnih žila.

U upalnim artritisa, kao što su SpA i RA, dolazi do brojnih promjena u sinoviji. Međutim, postoji nekoliko bitnih histoloških razlika između upalno promijenjene sinovije bolesnika kojima je postavljena dijagnoza SpA te bolesnika s postavljenom dijagnozom RA (131). Isto je pokazala usporedba upalno promijenjene sinovije djece s postavljenom dijagnozom jSpA-a i djece s postavljenom dijagnozom drugih oblika JIA-a (132). Zbog toga se smatra da su histološke promjene u sinoviji bolesnika sa SpA-om vrlo specifične. Glavna je karakteristika tih promjena pojačana makro i mikrovaskularizacija u sloju vezivnog tkiva ispod sinovicita te infiltracija upalnih stanica među kojima su najzastupljeniji makrofazi i različite skupine limfocita T (133). Smatra se da makrofazi, zajedno s citokinima koje luče poput proupalnog citokina TNF- α i protuupalnog IL-10, imaju ključnu ulogu u razvoju upale u tkivima. Budući da su iste stanice otkrivene i u sluznici crijeva, čak i prije no što se mogu uočiti histološki znakovi upale u sinoviji, možemo zaključiti da važnu ulogu u razvoju ove bolesti imaju i zbivanja u crijevima.

1.5.3. Crijevo

Stijenka probavne cijevi ima četiri glavna sloja: sluznicu (*mukozu*), podsluznicu (*submukozu*), mišićni sloj (*muskularis*) i serozu (128). Sluznica se sastoji od pokrovnog epitela, lamine proprije građene od rahlog vezivnog tkiva bogatog krvnim i limfnim žilama u kojem se katkad nalaze žlijezde i limfno tkivo te muskularisa mukoze građenog od tankog unutrašnjeg (kružnog) i vanjskog (uzdužnog) sloja glatkih mišićnih stanica. Podsluznica se pak sastoji od gušćeg vezivnog tkiva s mnogo krvnih i limfnih žila u kojem se nalazi živčani splet (*plexus submucosus Meissneri*). Ovdje se također katkad mogu naći žlijezde i limfno tkivo. Mišićni sloj građen je od glatkih mišićnih stanica koje teku spiralno, a u vezivnom tkivu između mišićnih stanica također se nalazi živčani splet (*plexus myentericus Auerbachii*) te krvne i limfne žile. Seroza se sastoji od jednoslojnog pločastog pokrovnog epitela (*mezotela*) i tankog sloja rahlog vezivnog tkiva bogatog krvnim i limfnim žilama te masnim stanicama. Brojni limfni čvorići u lamini propriji i podsluznici zajedno s epitelom štite organizam od bakterija. Neposredno ispod epitela nalazi se područje bogato makrofazima i limfocitima od kojih neki intenzivno proizvode antitijela, uglavnom IgA razreda.

Već dugo se zna da u bolesnika s postavljenom dijagnozom SpA-a postoji bliska povezanost upale sluznice crijeva i upale zglobova. Zanimljivo je da otprilike dvije trećine bolesnika koji boluju od SpA-a ima mikroskopske znakove upale crijeva bez kliničkih simptoma od strane probavnog sustava (134). Tako su upalne promjene crijeva u kolonu i terminalnom ileumu potvrđene u 65% bolesnika s nediferenciranim oblikom SpA-a, 90% bolesnika s ReA-om potaknutim infekcijom u gastrointestinalnom sustavu te u 60% bolesnika s AS-om (135). Iste promjene potvrđene su i u 16% bolesnika s PsA-om (136). Ileokolonoskopija provedena u grupi od 32 odrasla bolesnika sa SpA-om, kojima je bolest nastupila u dječjoj dobi, pokazala je da 81% bolesnika ima histološke znakove upale crijeva (137, 138). Upalne promjene crijeva viđene su i u 9 od 12 bolesnika mlađih od 16 godina s postavljenom dijagnozom SpA-a. U bolesnika kojima je učinjena i druga ileokolonoskopija, remisija upale u zglobovima uvijek je bila povezana s nestankom znakova upale u crijevima, dok je perzistencija upale u zglobovima uglavnom bila praćena i perzistencijom upale u crijevima (139). Nadalje, pokazalo se da oko 6% bolesnika sa SpA-om, kojima je isključen IBD, nakon 5 do 9 godina razvije Crohnovu bolest (140). Osim toga, nedavno provedeno istraživanje pokazalo je da se koncentracija fekalnog kalprotektina, koja se inače koristi za otkrivanje IBD-a ili drugih bolesti crijeva, može koristiti za procjenu subkliničke upale crijeva (engl. *low-grade IBD*) djece s postavljenom dijagnozom ErA-a (141).

Razvijene su mnoge teorije kojima se pokušava objasniti veza između upale sluznice crijeva i upale zglobova u bolesnika sa SpA-om, a najpopularnije među njima ukazuju na poremećaje u cirkulaciji crijevnih limfocita ili mononuklearnih stanica, osobito makrofaga (142). Migracija i navođenje limfocita k specifičnom ciljnom tkivu posredovano je kemokinskim receptorima te raznim adhezijskim molekulama poput integrina i selektina. Navođenje crijevnih limfocita određeno je specifičnom skupinom adhezijskih molekula koje spadaju u $\beta 7$ podobitelji integrina, a među njima su osobito važna dva člana: $\alpha 4\beta 7$ i $\alpha E\beta 7$. Integrin $\alpha 4\beta 7$ služi kao ligand za MadCAM-1 (engl. *mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1*) koji je selektivno izražen na epitelnim stanicama sluznice, dok je $\alpha E\beta 7$ konstitutivno izražen na intraepitelnim limfocitima T u sluznici crijeva, a veže se na E-cadherin izražen na epitelnim stanicama crijeva (143). Spomenuti integrini otkriveni su na većem broju aktiviranih limfocita T iz upalno promijenjene sinovije bolesnika sa SpA-om, što upućuje na zaključak da su te stanice pristigle iz sluznice crijeva (144). Postoji i teorija koja govori o mogućoj ulozi bakterija iz crijeva u upali zglobova. Prema toj teoriji, u prijenosu bakterija i njihovih komponenti iz crijeva u zglobove sudjeluju makrofazi (134). U prilog tome govori ranije spomenuta činjenica kako se u sinoviji bolesnika sa SpA-om nalazi povećan broj makrofaga s CD163 receptorom. Isti makrofazi u većem broju prisutni su u debelom crijevu bolesnika sa SpA-om te s Crohnovom bolešću, čak i u dijelovima koji nisu upalno promijenjeni (145). Na kraju, važno je spomenuti i nedavno predloženo alternativno objašnjenje za opaženu vezu između upale crijeva i zglobova koje se temelji na istraživanjima provedenim na mišu kod kojeg je brisanje određenih dijelova regulatornih sljedova uzrokovalo prekomjerno stvaranje TNF- α , što je dovelo do pojave simptoma inače karakterističnih za SpA i Crohnovu bolest (146). Prema toj teoriji, trajna prekomjerna izloženost spomenutom citokinu posredstvom TNFR1-a (engl. *TNF receptor 1*) u sinovijalnim fibroblastima i intestinalnim miofibroblastima dovodi do razvoja upale u crijevu i zglobovima, što je glavno obilježje SpA-a (147).

1.6. Genetika spondiloartritisa

Istraživanje genetske podloge različitih bolesti pod velikim je utjecajem dostupne tehnologije (148). S obzirom da se AS, PsA i IBD često otkrivaju u istog bolesnika ili u članova iste obitelji, već dugo se zna da geni sudjeluju u razvoju SpA-a. Provedena istraživanja pokazala su da najvažniju ulogu pri tome imaju geni HLA sustava, no tek je nedavni razvoj metoda

visoke propusnosti omogućio otkrivanje uloge gena izvan tog sustava, poput gena uključenih u unutarstanično procesiranje antigena te gena koji kodiraju različite citokine.

1.6.1. Uloga HLA genotipa

HLA sustav (engl. *human leukocyte antigen system*) je glavni kompleks tkivne srodnosti (engl. *major histocompatibility complex*, MHC) kod ljudi (149). Ovaj sustav sadrži velik broj međusobno povezanih gena koji se nalaze na kratkom kraku kromosoma 6 (6p21), nasljeđuju se kao HLA haplotip mendelskim nasljeđivanjem od svakog roditelja, a dijele se u tri razreda. Geni HLA razreda I i II odgovorni su za sintezu antigena HLA, dok su geni HLA razreda III odgovorni za sintezu komponenti komplementa, citokina kao što je TNF- α i HSP (engl. *heat shock protein*) te nekih drugih proteina uključenih u imunološki odgovor. Molekule razreda I građene su od glikoziliranog teškog lanaca kojeg kodiraju HLA geni razreda I (A, B i C) te kovalentno vezanog β 2 mikroglobulina (engl. *β 2-microglobulin*, *β 2m*) kojeg kodira gen smješten na kromosomu 15. Teški lanac ima tri izvanstanične domene (α 1, α 2 i α 3), transmembransku regiju i unutarstanične domene. Izvanstanične domene α 1 i α 2 tvore dio na koji se veže peptid i sadrže varijabilni slijed aminokiselina koje određuju antigensku specifičnost, dok α 3 domena zajedno sa β 2m tvori konstantni dio koji sličí imunoglobulinu. Molekule razreda II su heterodimeri koje kodiraju HLA geni razreda II (DR, DP i DQ), a sastoje se od dva nekovalentno povezana glikolizirana polipeptidna lanca, α i β . Oba lanca imaju izvanstanični dio sastavljen od dvije domene (α 1 i α 2 ili β 1 i β 2), kratku transmembransku regiju i unutarstaničnu domenu. Domene α 1 i β 1 imaju varijabilni slijed aminokiselina i tvore dio na koji se veže peptid, dok α 2 i β 2 domene tvore konstantni dio koji sličí imunoglobulinu. Molekule razreda I izražene su na površini gotovo svih stanica sa jezgrom, predočavaju endogene antigene sintetizirane unutar same stanice, a kompleks koji nastaje prilikom toga prepoznaju CD8 limfociti T. Nasuprot tome, molekule razreda II izražene su samo na APC-u, a predočavaju egzogene proteine koji endocitozom ulaze u stanicu, gdje se razgrađuju i stvaraju kompleks s molekulama razreda II. Navedeni kompleks zatim se prenosi na površinu stanice gdje ga prepoznaju CD4 limfociti T. Zahvaljujući polimorfizmu u dijelu koji veže peptid, HLA molekule mogu prikazati različite peptide, a ovisno o redoslijedu aminokiselina, serološki se dokazuje antigenska specifičnost za oba razreda. Međutim, istraživanja su pokazala da je HLA polimorfizam mnogo veći nego što se to može dokazati serološkim metodama pa su se razvile molekularne metode kojima se

dokazuje određeni gen i njegov alel. HLA molekule imaju važnu ulogu u presađivanju organa, a povezane su i s mnoštvom različitih bolesti, osobito imunološki uvjetovanih.

Već dugo je poznato da postoji snažna veza između spondiloartritisa i HLA-B27 antigena. HLA-B27 antigen predstavlja obitelj blisko povezanih proteina koji se nalaze na površini stanica i koji su kodirani različitim alelima, a nazivaju se podtipovima HLA-B27. Većina ovih podtipova karakterizirana je zamjenom nukleotida u egzonima 2 i 3 koji kodiraju $\alpha 1$ i $\alpha 2$ domene dijela na koji se veže peptid, a smatra se da ih je velik dio nastao iz vrlo rasprostranjenog HLA-B2705 podtipa (150). Do danas je diljem svijeta zabilježeno stotinjak različitih podtipova HLA-B27 (<http://hla.alleles.org/alleles/class1.html>). HLA-B2704, HLA-B2705, HLA-B2702 i HLA-B2707 pokazuju snažnu povezanost s AS-om, dok je povezanost HLA-B2706 i HLA-B2709 slabija (151). U većini etničkih grupa, HLA-B27 je prisutan u 90 – 95% bolesnika s AS-om, 60% bolesnika s PsA-om i artritisom povezanim s IBD-om, 60 – 80% bolesnika s ReA-om, te 20 – 25% bolesnika s nediferenciranom SpA-om (152).

Povezanost HLA-B27 antigena sa SpA-om u djece slična je kao i u odraslih, tako da je HLA-B27 antigen prisutan u 60 – 80% bolesnika s jSpA-om (7). Istraživanje provedeno u Velikoj Britaniji pokazalo je da čak 74% djece u koje je prema ILAR-ovim kriterijima postavljena dijagnoza ErA-a ima HLA-B27 antigen (153). Istraživanje provedeno u Latviji pokazalo je da u djece sa JIA-om postoji osam različitih podtipova HLA-B27 antigena, da je najčešći HLA-B2705 i da se najčešće javlja u bolesnika s ErA-om (154).

Direktna etiopatogenetska uloga HLA-B27 u razvoju SpA-a demonstrirana je na eksperimentalnom modelu transgeničnih štakora koji su izražavali HLA-B27 s ljudskim $\beta 2m$ (B27/h $\beta 2m$) (155). Još uvijek nisu sasvim jasni mehanizmi kojima HLA-B27 molekula sudjeluje u razvoju bolesti. S obzirom da se antigeni u sklopu HLA-B27 predočavaju CD8 limfocitima T, smatralo se da predočavanje određenih bakterija aktivira CTL koji posljedično pokazuju križnu reaktivnost s vlastitim peptidima (156). Ovakav koncept “artrogenih peptida” na SpA gleda kao na autoimunosnu bolest, no on je ozbiljno ugrožen nakon što su dva istraživanja pokazala da odsutstvo funkcionalnih CD8 limfocita T ne sprječava razvoj bolesti u B27/h $\beta 2m$ štakora (157, 158). Nedavno su predložene dvije alternativne hipoteze prema kojima HLA-B27 ima važnu ulogu u započinjanju odgovora prirodnog imunološkog sustava. Prva hipoteza polazi od zapažanja da je HLA-B27 molekula sklona stvaranju homodimera na površini stanice (159). HLA-B27 dimere prepoznaju receptori NK stanica slični imunoglobulinima (engl. *killer cell immunoglobulin-like receptors*, KIR) te leukocitni receptori slični imunoglobulinima (engl. *leukocyte immunoglobulin-like receptors*, LILR),

koji se osim na NK stanicama nalaze i na limfocitima T, što dovodi do aktivacije stanica i stvaranja proupalnih medijatora (160). Nažalost, ova hipoteza ne može objasniti zašto druge HLA-B molekule ili podtipovi HLA-B27 molekula, koji također stvaraju homodimere, nisu povezani sa SpA-om (161). Prema drugoj hipotezi HLA-B27 molekule sklone su pogrešnom smatanju (engl. *misfolding*), što uzrokuje stres u endoplazmatskom retikulumu stanice i dovodi do tzv. odgovora na nesmotani protein (engl. *unfolded protein response*, UPR) (162). Takav odgovor u endoplazmatskom retikulumu uzrokuje indukciju proteina koji olakšavaju smatanje drugih proteina, tzv. “šaperona”, te aktivaciju NF- κ B signalnog puta, što pak naposljetku dovodi do povećanog stvaranja proupalnih citokina (163). Eksperiment na HLA-B27 transgeničnim miševima, koji služe kao životinjski model za proučavanje SpA-a, pokazao je da krivo smatanje HLA-B27 molekule i posljedični odgovor u makrofazima posredstvom TLR-a dovodi do pojačanog stvaranja IL-23 (164). Slično je pokazano i na ljudskim dendritičkim stanicama u kojima dolazi do pojačanog stvaranja IL-23 nakon stimulacije TLR-a u uvjetima stresa u endoplazmatskom retikulumu (163). No, treba napomenuti da je nedavno provedeno istraživanje pokazalo da pojačano stvaranje IL-23 potaknuto lipopolisaharidima (engl. *lipopolysaccharide*, LPS) u makrofazima bolesnika s AS-om nije bilo povezano s UPR-om, što dovodi u pitanje ulogu UPR-a potaknutog HLA-B27 molekulom u SpA-u (165). Ipak, na temelju svega iznesenoga možemo zaključiti da posredstvom HLA-B27 molekule u SpA-u dolazi do nakupljanja stanica prirodnog imunološkog sustava na mjestima koja su izložena bakterijama ili mehaničkom pritisku (engl. *tissue stress*), zbog čega se na SpA treba gledati više kao na autoinflamatornu nego autoimunosnu bolest (119).

Nekoliko istraživanja pokazalo je da slična veza sa SpA-om postoji i za HLA-B7 antigen (166, 167). Regija aminokiselina na poziciji 63-71 u HLA-B27 molekuli sudjeluje u stvaranju najmanje tri različita epitopa zajednička B27 i B7 molekuli, a koja nose nazive ME1, GSP5.3 i GS145.2 (168). Zastupljenost HLA-B7 antigena u sveukupnom stanovništvu Hrvatske je 9,67%, a HLA-B27 antigena 6% (169). Jedini podtip HLA-B7 antigena zabilježen među stanovništvom Hrvatske je B0702, a najzastupljeniji podtip HLA-B27 je B2705, kojeg ima 3,55% stanovništva Hrvatske (170). U istraživanju provedenom u Hrvatskoj u kojem je sudjelovalo 74 djece sa različitim oblicima jSpA-a, a od kojih je 45 zadovoljilo ILAR-ove kriterije za ErA, HLA-B27 antigen imalo je 31 dijete sa jSpA-om (41,8%), HLA-B7 26 djece (35,1%), dok je oba antigena imalo 6 djece s jSpA-om (8,1%) (171). Molekularnom analizom

otkrivena su tek dva podtipa HLA-B27 među bolesnicima s jSpA-om: B2702 (19,35%) i B2705 (80,65%).

Usprkos tome što se SpA tradicionalno povezuje s HLA genima razreda I, pokazano je da su i HLA geni razreda II uključeni u razvoj i tijek bolesti (30, 172). Nadalje, pokazalo se da HLA geni razreda II, osim središnje uloge u stečenom, imaju i važnu ulogu u prirođenom imunološkom odgovoru, tako što moduliraju odgovor TLR na odgovarajuće ligande (173).

Naposljetku, važno je napomenuti da manje od 5% ljudi s HLA-B27 antigenom razvije SpA (174). S druge strane, 20% ljudi s HLA-B27 antigenom koji su u rodu s nekim kome je postavljena dijagnoza AS-a razviti će SpA (175). Istraživanja u kojima su sudjelovale cijele obitelji bolesnika oboljelih od SpA-a pokazala su da se samo oko 40% ukupnog rizika za razvoj SpA može pripisati HLA-B27 antigenu, dok je cijelokupna MHC regija odgovorna za oko 50% rizika (174). Sve navedeno ukazuje da su osim gena iz MHC sustava i drugi geni odgovorni za razvoj ove bolesti te da se radi o klasičnoj poligenskoj bolesti.

1.6.2. Uloga gena izvan MHC sustava

Proteklih godina provedeno je mnoštvo istraživanja u kojima su korištene metode visoke propusnosti kako bi se otkrila genetska podloga spondiloartritisa, a većina njih bila je usmjerena na AS. Tako se pokazalo da u razvoju AS-a, osim gena unutar MHC regije, određenu ulogu imaju i geni povezani s unutarstaničnom pregradnjom antigena poput gena ERAP1, geni koji utječu na diferencijaciju TH17 limfocita poput gena IL23R, IL12B, STAT3 i PTGER4 te geni povezani s NF- κ B putem poput gena CARD9 (176). Uloga tih gena opažena je i u istraživanjima u kojima su sudjelovali bolesnici s postavljenom dijagnozom PsA-a te IBD-a (tablica 4). Nadalje, pokazalo se da su u razvoj IBD-a uključeni i geni koji imaju određenu funkciju u autofagiji, kao što je gen IRGM. Od svih navedenih gena na razvoj SpA-a najviše bi mogao utjecati ERAP1 gen. Produkt tog gena je aminopeptidaza koja se nalazi u endoplazmatskom retikulumu, a ima važnu ulogu u pripremi peptida koji se predočavaju u sklopu MHC molekula razreda I. Polimorfizmi navedenog gena stoga bi mogli biti odgovorni za pogrešno predočavanje peptida u sklopu MHC molekule razreda I. Osim toga, pokazalo se da ERAP1 gen ima povećan izražaj u dendritičkim stanicama bolesnika s postavljenom dijagnozom AS-a, što također potvrđuje ulogu ovog gena u razvoju AS-a. Ipak, prema našim saznanjima, uloga ERAP1 te ostalih spomenutih gena za sada nije potvrđena u bolesnika s postavljenom dijagnozom ErA-a.

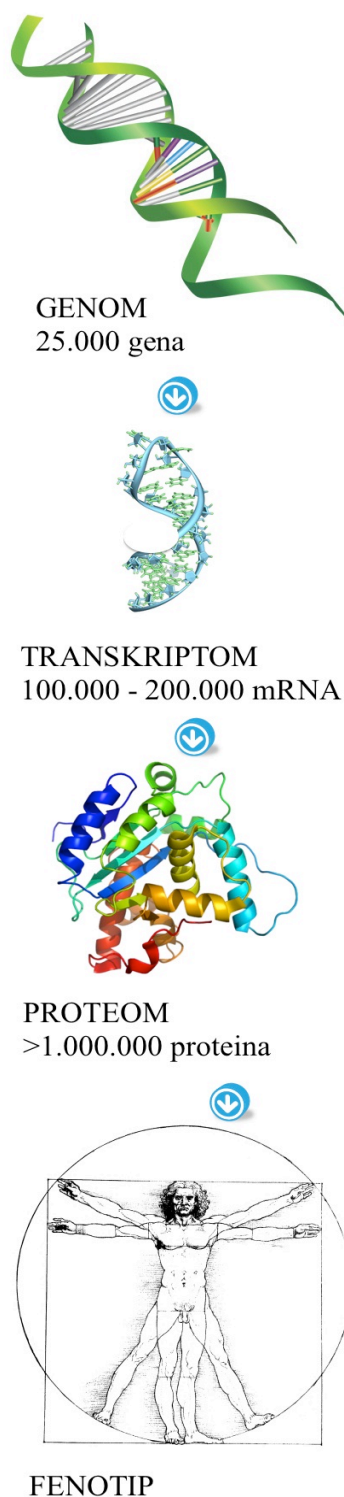
Tablica 4. Povezanost različitih gena i puteva u kojima sudjeluju s AS, PsA i IBD.

GENI, FUNKCIONALNI PUTEVI I BOLESTI	AS	PsA	IBD	
			Crohnova bolest	Ulcerativni kolitis
Unutarstanično procesuiranje antigena	HLA-B27 ERAP1	HLA-Cw6 ERAP1	ERAP2	HLA-DRA
Autofagija	-	-	IRGM	IRGM
TH17 odgovor	IL23R IL12B STAT3 PTGER4	IL23R IL12B	IL23R IL12B STAT3 JAK2 PTGER4 PUS10 IL18RAP	IL23R IL12B, STAT3 JAK2 IL18RAP PUS10
NF-κB put	CARD9	REL	REL CARD9	REL CARD9
Imunološki odgovor	IL1R2 ORMDL3	DEFB4 IL2/IL21 PTPN22 TYK2	DEFB4 IL2/IL21 NKX2-3 ORMDL3 PTPN22 TNFRSF6B TYK2	IL2/IL21 IL1R2 NKX2-3 ORMDL3 TNFRSF6B
Geni nejasne povezanosti s imunološkim sustavom	CDKAL1 KIF21B	CDKAL1	CDKAL1 KIF21B MST1 PSMG1	MST1 PSMG1

Preuzeto iz Reveille JD. *Genetics of spondyloarthritis--beyond the MHC. Nat Rev Rheumatol* 2012;8:296-304.

1.7. Funkcionalna genomika

Skup svih vidljivih i mjerljivih osobina nekog organizma, odnosno fenotip, određen je nasljednim čimbenicima, odnosno genotipom, te vanjskim utjecajima (slika 3). Nakon što su 2003. godine objavljeni rezultati sekvencioniranja ljudskog genoma, mnogi su smatrali da će napokon biti moguće razumjeti zašto nastaju bolesti i koji su geni za njih odgovorni. No, ubrzo je postalo jasno da na pojavu bolesti ne utječe samo redoslijed nukleotida u genima. Upravo zbog toga, u proteklom desetljeću sve se više počela koristiti funkcionalna genomika čija je temeljna zadaća povezivanje fenotipa i genotipa. Funkcionalna genomika proučava genom, transkriptom i proteom koristeći metode molekularne biologije koje imaju veliku propusnu moć (eng. *high throughput screens*) po čemu se razlikuje od tradicionalnih metoda kojima se detaljno proučavao jedan gen ili protein.



Slika 3. Protok informacija u ljudskom organizmu. Sukladno središnjoj dogmi molekularne biologije, transkripcijom informacija s molekula DNA nastaje mRNA, a translacijom informacija s mRNA nastaju proteini. Procjenjuje se da u ljudskom genomu ima oko 25 000 gena koji kodiraju 100 000 do 200 000 molekula mRNA, na temelju kojih se zatim stvara više od 1 000 000 različitih proteina. Na svaki od navedenih koraka utječe mnoštvo čimbenika, zbog čega je razumljivo da fenotip ne ovisi samo o redoslijedu nukleotida u genomu.

1.7.1. Genom

Ljudski genom se sastoji od otprilike $3,1 \times 10^9$ parova baza koji čine mitohondrijsku DNA te linearne molekule DNA namotane oko histona u kromatin, od kojeg su građena 22 para autosomnih kromosoma i 2 para spolnih kromosoma. Usprkos tome što je otprilike 99,9% genoma identično među ljudima i što postoji puno sličnosti među različitim vrstama, razlike u genomu su velike i mogu biti povezane s mnogim bolestima (177). Do početka ovog stoljeća, primarna metoda za otkrivanje nasljednih bolesti bila je analiza povezanosti nekog gena s nekom bolesti unutar iste obitelji (engl. *genetic linkage studies*), što je bilo vrlo korisno za otkrivanje poremećaja povezanih sa samo jednim genom (178, 179). Međutim, kako bi se otkrili poremećaji povezani s više gena, razvijen je pristup koji polazi iz suprotnog smjera, kojim se neka osobina ili bolest povezuju s jednim ili više gena (engl. *genetic association studies*) (180). Zahvaljujući razvoju takvog pristupa, ali i molekularne biologije, danas postoje metode kojima se može pretražiti cijeli genom kako bi se otkrile razlike povezane s određenom bolesti (engl. *genome-wide association study*, GWAS) (181). Najčešće se traga za razlikama u pojedinačnim parovima baza koje se u ljudskom genomu pojavljuju s velikom učestalošću, a nazivaju se polimorfizmima pojedinačnog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP). Smatra se da je SNP moderna jedinica genske raznolikosti (182). SNP uglavnom ima dva alela, što znači da u populaciji postoje dva para baza koja se često pojavljuju na nekoj lokaciji. Određena kombinacija alela obližnjih SNP-a čini haplotip. Učestalost SNP-a izražava se u obliku učestalosti manje uobičajenog alela (engl. *minor allele frequency*, MAF), a u slučaju da je određeni SNP vrlo rijedak govorimo o mutaciji. Većina SNP-a ima minimalan utjecaj na biološke sustave, no neki mogu utjecati na odabir aminokiselina za sintezu proteina, stabilnost prepisane mRNA te na afinitet vezanja čimbenika transkripcije, što može imati šire posljedice (183). Nakon što je dovršeno mapiranje ljudskog genoma, otkriveno je 1,42 milijuna SNP-a u ljudskom genomu, zbog čega je bilo potrebno ispitati njihovu učestalost u različitim populacijama (184). To je učinjeno u velikom međunarodnom istraživanju započetom 2003. godine pod imenom *HapMap project*. U prvom i drugom dijelu spomenutog istraživanja otkriveno je više od tri milijuna novih SNP-a u četiri različite populacije, a razvijene su i nove metode za brže i preciznije otkrivanje SNP-a, kao što je čip za genotipizaciju (engl. *genotyping array*) (185, 186). U trećem dijelu istraživanja ispitana je učestalost 1,6 milijuna SNP-a kod 1,184 osoba iz 11 različitih populacija (187). Krajem 2008. započeto je još jedno veliko međunarodno istraživanje, *The 1000 genome project*. U tom je istraživanju učinjeno sekvencioniranje cijelog genoma i

egzoma (engl. *low-coverage whole-genome and exome sequencing*) kod 1 092 osobe iz 14 populacija, čime je otkriveno 38 milijuna SNP-a, 1,4 milijuna kratkih insercija i delecija te više od 14 000 većih delecija (188). Istraživanja poput ovih uvelike su poboljšala razumijevanje raznolikosti ljudskog genoma, genetske podloge različitih bolesti te funkcionalne genomike, što nas je odvelo korak dalje u razvoju “personalizirane medicine” (189). Ipak, postalo je jasno da sam redoslijed nukleotida daje malo informacija o funkciji gena (190).

1.7.2. Transkriptom

Središnja je dogma molekularne biologije da transkripcijom DNA nastaje mRNA (engl. *messenger RNA*), a translacijom mRNA nastaju proteini (191). Smatra se da samo oko 1,5% ukupnog genoma čovjeka čini egzom, odnosno dio koji kodira proteine (192). Procjenjuje se da se u tom dijelu nalazi od 20 000 do 30 000 gena koji kodiraju proteine (193). Regulom, koji se nalazi u ostatku genoma, utječe na izražaj gena koji se nalaze u egzomu i dugo se smatralo da čini tek manji dio genoma. Međutim, nedavno objavljeni rezultati velikog međunarodnog projekta imena ENCODE (engl. *Encyclopedia of DNA Elements*), pokazali su kako čak 80% genoma ipak ima određenu funkciju u regulaciji izražaja gena koji kodiraju proteine (194). Informacije dobivene ovim projektom nadilaze one dobivene sekvencioniranjem zato što opisuju regulatorne elemente u genomu koji upravljaju razvojem i funkcijama ljudskog bića (195). Regulatorni elementi koji utječu na izražaj gena mogu se podijeliti na trans*-regulatorne elemente u koje spadaju čimbenici transkripcije te cis[†]-regulatorne elemente u koje spadaju promotori i pojačivači. Čimbenici transkripcije su proteini određeni genom koji se može nalaziti na bilo kojem kromosomu u stanici, dok su promotori i pojačivači slijedovi nukleotida koji se nalaze na istom kromosomu kao i gen na koji djeluju. Osim navedenim regulatornim elementima, aktivnost gena u stanici određena je i različitim mehanizama koje proučava epigenetika. U spomenute mehanizme spadaju modifikacije histona poput metilacije i acetilacije, zatim metilacija DNA, RNA interferencija (engl. *RNA interference*, RNAi) pomoću malih interferirajućih molekula RNA (engl. *small interfering RNA*, siRNA) i mikro RNA (engl. *microRNA*, miRNA), itd. (196). “Uključivanje” odnosno aktivacija gena podrazumijeva započinjanje transkripcije složenom koordinacijom različitih procesa poput remodeliranja kromatina, modifikacije histona te vezanja čimbenika

* lat. na drugoj strani

† lat. na istoj strani

transkripcije na promotore i pojačivače. Glavnu ulogu u tom procesu u stanicama eukariota ima RNA polimeraza II. Sveukupna RNA nastala transkripcijom unutar jedne stanice ili populacije stanica naziva se transkriptom. Za razliku od genoma, koji je uglavnom identičan u svakoj stanici nekog višestaničnog organizma, transkriptom se razlikuje od stanice do stanice i ovisi o nizu fizičkih, biokemijskih i razvojnih čimbenika. Proučavanjem transkriptoma može se otkriti kada i gdje su geni u različitim tkivima i stanicama “uključeni” ili “isključeni”. Procjenjuje se da se u RNA prepisuje manje od 5% ljudskog genoma (192). No, svaki gen može stvoriti više od jedne mRNA zbog različitih procesa koji uključuju alternativno izrezivanje RNA (engl. *alternative splicing*), uređivanje RNA (engl. *RNA editing*) ili postojanje alternativnih mjesta u genu na kojima transkripcija započinje ili završava (engl. *alternative transcription initiation and termination sites*). Broj transkripata može se kvantificirati kako bi se dobila neka predodžba o aktivnosti gena u stanici, što uz ostale informacije o transkriptomu omogućuje bolji uvid u zbivanja u stanici. Zbog svega navedenog, postoji velik interes za prostorne i vremenske obrasce izražaja gena, kao i individualne posljedice smanjenog ili povećanog izražaja gena.

1.7.3. Proteom

Nakon što je otkriveno da genom sadrži sve potrebne informacije za izgradnju organizma, formulirana je središnja dogma molekularne biologije koja opisuje jednosmjerni protok informacija iz DNA transkripcijom u RNA te translacijom u proteine. Međutim, nedavna otkrića dovela su do preispitivanja ove dogme. Jedno od njih pokazalo je da većina ljudskih gena stvara mnogo različitih mRNA koje na kraju stvaraju različite proteine (197). Modifikacije DNA na genomskoj razini nisu moguće, ali prepisivanjem DNA nastaje jedna molekula pre-mRNA koja se može modificirati procesom nazvanim alternativno izrezivanje, a kojim nastaje mnoštvo različitih molekula zrele mRNA, iz kojih pak nastaju različiti proteini. Regulacija alternativnog izrezivanja pod direktnim je utjecajem različitih signalnih puteva te staničnog ciklusa. Prema nekim procjenama, kod ljudi se 15 – 60% genetskih bolesti povezuje s mutacijama koje utječu na proces alternativnog izrezivanja (198). Osim navedenog mehanizma, na proces translacije utječu male molekule RNA koje se nazivaju microRNA (miRNA), a koje mogu inhibirati translaciju i/ili potaknuti raspadanje mRNA (199). S druge strane, jednom kada se proces translacije završi, novonastali polipeptidni lanci prolaze kroz proces posttranslacijske modifikacije. Ovaj proces uključuje brojne kemijske modifikacije, poput fosforilacije i glikozilacije, koje prilagođavaju proteine za različite

funkcije u stanici (200). Navedeni procesi samo su neki od mnogih koji omogućuju da 25 000 do 30 000 gena kodira više od 1 000 000 proteina. Ako kažemo da je DNA “nacrt života”, onda su proteini ono što omogućuje život, odnosno glavni funkcionalni elementi u stanici uključeni u sve procese potrebne za održavanje stanice na životu. Svi proteini koje kodira ljudski genom čine proteom. Proteom nije niti jednoličan, niti statičan kao genom. Proteini koje stanica proizvodi razlikuju se ovisno o vrsti, obliku, funkciji i razvojnem stadiju stanice, ostalim stanicama koje se nalaze u okolini te o signalima koje stanica prima iz okoline. Unutar stanice malo se toga događa bez “dodirivanja” proteina, zbog čega proteini tvore složene mreže međusobne interakcije (eng. *protein-protein interaction networks*, PIN) (201). Analiza proteina stoga daje osnovne informacije potrebne za razumijevanje funkcioniranja stanice, a takvim analizama bavi se proteomika (202). U uspoređi s analizom genoma i transkriptoma, analiza proteoma puno je kompliciranija, no zahvaljujući napretku molekularne biologije, osobito identifikaciji proteina pomoću masene spektrometrije, danas je moguće odrediti gotovo sve proteine u proteomu (203).

1.8. Analiza genskoga izražaja

Kako bi se načinili obrasci genskoga izražaja (engl. *gene expression profiles*), danas se koriste metode molekularne biologije kojima se na različite načine sekvencionira mRNA (SAGE, SuperSAGE, RNA-seq) ili kojima se mRNA nakon transkripcije u komplementarnu DNA (engl. *complementary DNA*, cDNA) hibridizira na male pločice na kojima se nalaze tisuće oligonukleotida ili molekula cDNA specifičnih za gene koji kodiraju proteine (DNA čip). Usprkos tome što se u posljednje vrijeme sve češće koristi RNA-seq, DNA čip je i dalje najpopularnija od navedenih metoda te se spominje u više od 66.000 objavljenih članaka u MEDLINE®/PubMed® bazi podataka (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed).

1.8.1. Razvoj i vrste čipova

Prije više od 30 godina, britanski biolog Edwin Southern opisao je metodu kojom se u molekuli DNA može otkriti određeni slijed nukleotida, a njemu u čast tehnika je nazvana *Southern-blot* hibridizacija (204). Nedugo nakon toga opisana je metoda kojom se može dokazati prisutnost određenih slijedova RNA, a zbog svojih sličnosti sa *Southern-blot* hibridizacijom nazvana je *northern-blot* (205). Tom se metodom ukupna RNA ili mRNA izolirana iz ispitivanih stanica ili tkiva može elektroforezom na agaroznom gelu razdvojiti prema veličini, upijanjem (engl. *blotting*) prenijeti na nitrocelulozne membrane te hibridizirati

s odgovarajućim označenim slijedovima DNA kako bi se odredila prisutnost tražene RNA. Slična metoda razvijena je i za otkrivanje proteina, a nazvana je *western-blot* (206). Osim toga, razvijena je i *dot blot* metoda u kojoj nije potrebno razdvajanje molekula elektroforezom, već se molekule na membranu nanose direktno u obliku točkastih mrlja (engl. *dot blot*) (207). Navedene metode omogućile su razvoj visokopropusne metode u kojoj je mnoštvo različitih molekula pod nazivom probe (engl. *probes*) pričvršćeno za čvrstu podlogu u točno određenim točkama (engl. *spots* ili *feauters*) i pomoću njih se otkriva prisutnost odgovarajućih označenih molekula koje se nazivaju ciljne molekule (engl. *targets*) (208). Probe imaju veliki afinitet i specifičnost za ciljne molekule koje se u otopini nanose na podlogu. Sve točke poredane su u nizove (engl. *array*) smještene na pločicu (engl. *chip*) koja može biti od stakla, polimernih materijala ili silikona, a nije veća od normalnog stakalca za mikroskopiranje. Upravo zbog toga navedena se pločica na engleskom jeziku naziva *microarray*, što bi u prijevodu na hrvatski jezik značilo sitnoniz ili sitnopolje* (209). Slično kao kod ranije spomenutih metoda, i ovdje dolazi do reakcije ciljnih molekula i proba u procesu koji se naziva hibridizacija. Ciljne molekule prije ili poslije hibridizacije označavaju se fluorescentnim molekulama ili drugim bojama, kako bi se mogla otkriti reakcija ciljne molekule i probe. Budući da se na jednoj pločici obično nalazi nekoliko tisuća do nekoliko milijuna proba, glavnu prednost ove metode predstavlja mogućnost paralelnog odvijanja brojnih analiza pomoću kojih se može analizirati ukupni genom, transkriptom ili proteom. Nadalje, postoje i pločice koje sadrže desetke ili stotine proba, a koriste se za jeftino genotipiziranje virusa ili bakterija. Probe koje se koriste na pločicama mogu biti molekule cDNA umnožene PCR-om, oligonukleotidi, plazmidi ili bakterijski umjetni kromosomi (engl. *bacterial artificial chromosome*, BAC), proteini, antitijela, DNA ili RNA aptameri koji se koriste za otkrivanje određenih molekula, male molekule te ugljikohidrati. Velik broj različitih proba koje se mogu koristiti na pločici stoga omogućuje široku primjenu ove metode. Pločice ili čipovi najčešće se koriste za analizu genskoga izražaja, odnosno za procjenu relativane razlike u izražaju gena između dvije različite populacije stanica (npr. stanice oboljelih i stanice zdravih ili stanice liječenih i stanice neliječenih bolesnika). Pomoću ove metode može se procijeniti omjer smanjenog ili povećanog izražaja za svaki gen, no ne i

* S obzirom na to da se riječi sitnoniz i sitnopolje još uvijek nisu udomaćile u hrvatskom jeziku, u ovom radu će se za prijevod engleske riječi *microarray* koristiti riječi čip ili pločica, no važno je napomenuti kako se u nedavno izašloj knjizi “Pedijatrijska reumatologija” prvi puta u stručnoj literaturi na hrvatskom jeziku koristi riječ sitnopolje.

količina (apsolutni broj molekula) mRNA u stanicama. Prve pločice sadržavale su probe za sve gene u kvascu (nešto više od 6 000 transkripata) i upotrijebljene su u nekoliko važnih istraživanja koja su pokazala mogućnosti ove tehnologije. Nakon sekvencioniranja ljudskog genoma, čipovi su se počeli uvelike koristiti za istraživanje fiziologije stanice te za otkrivanje mehanizama različitih bolesti i mogućih dijagnostičkih biljega (engl. *markers*). Ujedno, ova je metoda našla svoju primjenu u ispitivanju zagađenosti vode analiziranjem genskoga izražaja školjki, zatim u određivanju biokompatibilnosti površina i mikročipova sa staničnim kulturama te pri analizi odgovora na zračenje. Ovisno o probama koje se koriste, za analizu genskoga izražaja može se koristiti DNA čip, exon čip, te siRNA čip.

Osim za analizu genskoga izražaja, čipovi se koriste za otkrivanje SNP-a u genomu te za otkrivanje mutacija u genima. Nadalje, koriste se za otkrivanje velikih delecija i amplifikacija u genomu pomoću komparativne genomske hibridizacije (engl. *comparative genomic hybridization*, CGH) te za određivanje slijedova DNA na koje se vežu određeni proteini pomoću kromatinske imunoprecipitacije (engl. *chromatin immunoprecipitation*, ChIP). Čipovi se mogu koristiti za otkrivanje patogena, za analizu mutacija u mitohondriju te za analizu razlika u određenom slijedu genoma pomoću resekvencioniranja. Naposljetku, na čipu se mogu provoditi i reakcije složenije od hibridizacije, kao što je npr. reakcija transfekcije kojom strana DNA ulazi u eukariotsku stanicu pomoću plazmida poredanih na staklenoj površini u točno određenom nizu. Plazmidi se mogu upotrijebiti i kao predložak za “pravovremeno” (engl. *just in time*) *in situ* stvaranje proteinskog čipa, pri čemu se plazmidi koji nose različite gene nanose na površinu zajedno s antitijelom koje učvršćuje nastale proteine u određenoj točki, a tako dobiveni čip koristi se za proučavanje proteinskih interakcija.

1.8.2. Ispitivanje genskoga izražaja pomoću DNA čipa

Analiza genskoga izražaja danas se najčešće provodi pomoću DNA čipa koji je prvi put upotrijebljen 1995. godine za analizu izražaja 45 gena biljke *Arabidopsis thaliana* (210). Probe na DNA čipu mogu biti molekule cDNA dužine 400 do 1 000 parova baza (engl. *base pairs*, bp) ili oligonukleotidi dužine manje od 200bp (211). Temeljni princip na kojem počiva DNA čip je sparivanje komplementarnih nukleotida (A-T i C-G) što dovodi do stvaranja nukleinskih kiselina s dvostrukom uzvojnicom.

1.8.2.1. Građa DNA čipa

Na površinu DNA čipa probe dolaze tiskanjem ili direktnom sintetizom. Tiskanjem nastaju duže probe veće specifičnosti za ciljne molekule, dok direktnom sintezom nastaju kraće probe manje specifičnosti ali veće gustoće, zbog čega svaki gen može biti predstavljen s više proba. Probe se tiskaju pomoću kontaktnog ili nekontaktnog stroja za tiskanje koji na površini pločica ostavlja kapljice volumena nekoliko pL do nekoliko mL u kojima se nalaze probe (212). Kontaktni strojevi za tiskanje kapljice ostavljaju pomoću igla koje dolaze u kontakt s površinom pločice. Jedan stroj može imati stotine igli, a važno je da sve budu jednake dužine kako bi stvarale točke jednake veličine. Nekonaktni strojevi za tiskanje koriste *bubble jet* ili *ink jet* tehnologiju, koja je analogna onoj u pisačima za kompjuter, te kapljice izbacuju na površinu pločice iz kapilara s piezoelektričnim pumpama. Za tiskanje se koriste staklene pločice, najlonske membrane ili pločice s udubljenjima (engl. *beads, tubes*), a kao probe se koristi cDNA ili oligonukleotidi (213). Nakon tiskanja, oligonukleotidi se za površinu vežu kovalentnim vezama, a cDNA elektrostatskim silama. Otisnute pločice mogu se napraviti u laboratoriju, a s obzirom na to da se probe sintetiziraju na temelju predložaka iz knjižnica u kojima su pohranjeni sljedovi DNA različitih organizama, pločice se mogu koristiti čak i za analizu organizama čiji genom još nije sekvencioniran. Međutim, otisnute točke uglavnom imaju promjer 100 – 200 μ , a razmak među njihovim središtima je 200 – 300 μ , tako da na jednu pločicu može stati tek 244 000 točaka.

Zbog male gustoće točaka koja se postiže tiskanjem, razvijena je tehnologija koja omogućava sintezu oligonukleotida direktno na površini pločice, a tako dobivene pločice nazivaju se oligonukleotidni nizovi visoke gustoće (engl. *high-density oligonucleotide arrays*) (214). Jedan od takvih čipova je i GeneChip®, kojeg je razvila američka tvrtka Affymetrix (Santa Clara, CA, SAD). Spomenuti čip proizvodi se jedinstvenom fotolitografskom tehnikom, sličnoj onoj koja se koristi za proizvodnju mikroelektroničkih čipova, u kombinaciji s kemijskim reakcijama razvijenim za kombinatornu kemiju pomoću kojih se stvara velik broj spojeva u samo jednoj reakciji (215). U proizvodnji se koriste kvarcne pločice obložene tankim slojem reagensa osjetljivog na svjetlo, koji sprečava kovalentno vezivanje aktiviranih nukleotida. Izlaganje svjetlu uzrokuje odstranjivanje zaštite s površine i omogućava vezanje aktiviranih nukleotida. Vezani nukleotidi također imaju zaštitu osjetljivu na svjetlo koja se odstranjuje ponovnim izlaganjem svjetlu. Kako bi se svjetlo propuštalo samo na određene točke, koriste se litografske maske pomoću kojih se određuje poredak nukleotida u rastućim oligonukleotidima. U ciklusima u kojima se izmjenjuje stavljanje maski, izlaganje svjetlu i

vezivanje nukleotida na površini pločice, sintetiziraju se oligonukleotidi koji naposljetku sadrže 25 nukleotida. S obzirom da tako kratki oligonukleotidi ponekad nisu dovoljno specifični, svaka odgovarajuća proba (engl. *match*) ima svoju negativnu kontrolu koja se razlikuje u samo jednom nukleotidu smještenom u sredini probe i naziva se neodgovarajuća proba (engl. *mismatch*). Odgovarajuća i neodgovarajuća proba čine par proba (engl. *probe pair*), a korištenje parova proba omogućuje otkrivanje grešaka u hibridizaciji (engl. *cross-hybridization*). Jedan gen obično predstavlja 11 – 15 parova proba koji se zajednički nazivaju skupom proba (engl. *probe set*). Sljedovi koji se koriste u parovima proba odabiru se iz regije mRNA koju čini 600 baza proksimalno od poliadenilacijskog mjesta (3' kraj), dok se odgovarajuća mRNA odabire složenim bioinformatičkim tehnikama iz različitih javno dostupnih izvora poput GeneBank-a, dbEST-a i RefSeq-a. Osim skupova proba koji predstavljaju odabrane gene, na svakom GeneChipu se nalaze i skupovi proba koji predstavljaju gene izražene u svim stanicama (engl. *housekeeping gene*), tako da je svaki od tih gena zastupljen s tri skupa proba, od kojih jedan predstavlja 5' kraj, jedan sredinu, a jedan 3' kraj. Spomenute probe služe za kontrolu kvalitete hibridizirane RNA. Nadalje, na GeneChipu se nalaze i kontrolni skupovi proba (engl. *spike-in control probe*) koji se hibridiziraju s kontrolnom RNA (engl. *spike-in RNA*) te se koriste za kalibraciju prilikom očitavanja. Vrlo velika gustoća točaka na GeneChipu dopušta i velik broj kontrola, a automatizirani procesi provođenja eksperimenta jamče vrlo visok stupanj ponovljivosti (engl. *reproducibility*). Upravo zbog toga na GeneChipu je moguće provoditi eksperimente u kojima se probe hibridiziraju s ciljnim molekulama iz samo jedne populacije stanica (eng. *one-channel experiments*), za razliku od većine ostalih čipova na kojima se zbog razlika koje nastaju prilikom proizvodnje čipa, a koje utječu na omjer izražaja (engl. *expression ratio*), probe istovremeno hibridiziraju s različito označenim ciljnim molekulama izoliranim iz dvije različite populacije stanica (engl. *two-channel experiments*). Osim toga, GeneChip dopušta korištenje mnogih tehnika označavanja ciljnih molekula, što olakšava dizajniranje eksperimenta i statističku analizu. S druge strane, u glavne nedostatke Affymetrixovih čipova ubraja se visoka cijena proizvodnje uslijed korištenja velikog broja litografskih maski te visoka cijena korištenja, jer je za provođenje eksperimenta osim samih čipova potrebna i ostala oprema istog proizvođača. Nadalje, ovakav čip može se napraviti samo u laboratoriju proizvođača, zbog čega je dostupan za ograničeni broj organizama, a probe koje se koriste nisu podložne nikakvim promjenama.

1.8.2.2. Plan ispitivanja

Dobro isplanirano ispitivanje omogućuje nam dobivanje pouzdanih rezultata uz minimalne troškove i tehničke poteškoće. Za otkrivanje gena koji sudjeluju u razvoju bolesti pomoću ispitivanja genskoga izražaja osobito je važan odabir bolesnika i kontrola. Izražaj gena pod velikim je utjecajem bioloških i vanjskih čimbenika, zbog čega je potrebno odabrati slične bolesnike te kontrole odgovarajuće dobi i spola. Nadalje, do razlika u izražaju može doći i zbog samog provođenja eksperimenta. Zbog svega navedenog potrebno je provesti više eksperimenata (engl. *replication*) koristeći RNA izoliranu iz jedne osobe (engl. *technical replication*) ili iz više osoba (engl. *biological replication*). Ako koristimo RNA izoliranu iz jedne osobe za više eksperimenata, isključuju se bilo kakve razlike nastale u provođenju samog eksperimenta, a u slučaju da se više eksperimenata provode s RNA izoliranom iz više osoba, osim razlika u provođenju eksperimenata smanjuju se i razlike među osobama koje sudjeluju u istraživanju. Postoje brojne metode kojima se može izračunati odgovarajući broj sudionika istraživanja i potrebnih eksperimenata, ovisno o tome je li cilj istraživanja otkriti unaprijed definiranu grupu gena koja pokazuje razliku u izražaju (engl. *gene classification*) ili stvoriti novu grupu gena (engl. *gene clustering*) na temelju razlika u izražaju pojedinačnih gena. Kako bi se smanjio broj potrebnih eksperimenata, koristi se potvrda dobivenih rezultata PRC metodom na istoj ili novoj skupini bolesnika, čime se znatno smanjuju troškovi i povećava vjerodostojnost ispitivanja.

1.8.2.3. Izolacija RNA

Ispitivanje genskoga izražaja temelji se na pretpostavci da ispitivani uzorak RNA odražava trenutnu aktivnost gena u stanici, zbog čega točnost podataka dobivenih provođenjem eksperimenta na DNA čipu uvelike ovisi o kvaliteti korištene RNA (216). Molekula RNA nakon izoliranja iz stanice vrlo je nestabilna i ima kratko vrijeme poluživota. Glavni razlog tome su RNaze, potentni i široko rasprostranjeni katalitički enzimi prisutni u krvi i tkivu te u većini bakterija i gljiva u okolini. Stoga se za očuvanje RNA u tkivima, stanicama i krvi koriste sredstva za stabilizaciju RNA, kao što je *RNAlater*, koja omogućavaju skupljanje uzoraka u bolničkim uvjetima te transport uzoraka na sobnoj temperaturi.

RNA se može izolirati iz različitih bioloških uzoraka, poput pune krvi (engl. *whole blood*, WB) te mononuklearnih stanica periferne krvi (engl. *peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) ili sinovijalne tekućine (engl. *synovial fluid mononuclear cells*, SFMC). Prednost korištenja krvi za izolaciju RNA leži u lakoj dostupnosti i relativno jednostavnom načinu

sakupljanja, a budući da cirkulira kroz cijelo tijelo, krv sadržava mnoge biološke informacije potrebne za razumijevanje fizioloških i patofizioloških mehanizama. Od svih stanica u krvi, samo 0,1% otpada na leukocyte koji jedini imaju staničnu jezgru u kojoj dolazi do prepisivanja gena, dok oko 95% otpada na zrele eritrocite koji nemaju jezgru i u kojima do prepisivanja ne dolazi. Ipak, oko 1% stanica u krvi su retikulociti koji predstavljaju razvojni stadij eritrocita, pa je stoga većina njihove transkripcijske aktivnosti vezana uz stvaranje α i β -globinskih lanaca za izgradnju hemoglobina. Takva globinska RNA može utjecati na rezultate ispitivanja genskoga izražaja u stanicama krvi, zbog čega se prilikom izoliranja RNA iz pune krvi koriste različiti protokoli za njezino odstranjenje. Najčešće se koriste komercijalno dostupne epruvete (npr. PAXgene™ Blood RNA tubes) u kojima se nalaze sredstva za uklanjanje globinskih transkripata i za stabilizaciju RNA (217). Tako sakupljena krv na sobnoj temperaturi može stajati 24 sata, a na -80°C i duže, što ostavlja dovoljno vremena za transport uzorka u laboratorij u kojem se pristupa izolaciji RNA. S druge strane, pri izolaciji RNA iz mononuklearnih stanica ne izoliraju se globinski transkripti, ali ni transkripti iz granulocita, koji mogu biti korisni u ispitivanju genskoga izražaja. Osim toga, prije izolacije RNA iz mononuklearnih stanica potrebno je provesti razdvajanje stanica, zbog čega je skupljenu krv potrebno što prije dostaviti u laboratorij u kojem se pristupa izolaciji RNA.

I za samu izolaciju RNA danas se najčešće koriste komercijalno dostupni setovi (npr. PAXgene™ Blood RNA kit, RNeasy® kit). Male količine DNA koje zaostaju nakon postupka izolacije mogu se odstraniti upotrebom DNaza. S obzirom na to da nukleinske kiseline apsorbiraju zrake svjetlosti pri određenim valnim duljinama, moguće je odrediti koncentraciju izolirane RNA mjerenjem apsorbancije razrijeđenog uzorka u spektrofotometru pri valnoj duljini od 260nm (A_{260}), a čistoću RNA omjerom apsorbancija pri valnoj duljini od 260nm i 280nm (A_{260}/A_{280}). Zbog djelovanja ranije spomenutih RNaza, tijekom postupka izolacije može doći do degradacije molekula RNA i kompromitiranja rezultata analize genskoga izražaja (218). Kako bi se to izbjeglo, prije provođenja eksperimenta na skupim DNA čipovima provodi se relativno jednostavan postupak provjere integriteta RNA molekula, za što se koriste različiti sistemi poput Agilent 2100 Bioanalyzera koji daju brojčanu vrijednost integriteta RNA (engl. *RNA Integrity Number*, RIN). Jednom izolirana RNA može se pohraniti na temperaturi od -20°C do -70°C do provođenja eksperimenata na DNA čipu.

1.8.2.4. Označavanje ciljnih molekula

Ciljne molekule koje se koriste za ispitivanje genskoga izražaja su izolirane molekule RNA. Kako bi se reakcije među komplementarnim ciljnim molekulama i probama mogle vizualizirati, prije same hibridizacije potrebno je provesti označavanje ciljnih molekula (engl. *target labeling*). Označavanje se provodi obrnutim prepisivanjem (engl. *reverse transcription*) RNA u cDNA, a može biti direktno (engl. *direct labeling*), pri čemu se u ciljnu molekulu unose označeni nukleotidi, ili indirektno (engl. *indirect labeling*), pri čemu se u ciljnu molekulu prvo unosi nosač na koji se zatim vežu oznake (219). Prilikom direktnog označavanja nukleotidi su označeni radioaktivnim izotopima, poput ^{33}P , ili fluorescentnim bojama, a za indirektno označavanje koriste se nosači poput biotina, amino grupa ili micro- i nano- čestica. Indirektno označavanje zahtijeva dodatno bojanje, za što se koriste konjugati streptavidina ili konjugati antitijela na biotin s peroksidazom hrena, zlatom ili s fluorescentnim bojama koje reagiraju s amino grupama. Korištenje fluorescentnih boja omogućuje upotrebu različitih boja za kontrolni i ispitivani uzorak te direktnu usporedbu signala na istoj pločici. Najčešće se koriste cijaninske boje (engl. *cyanine dyes*) Cy-3 i Cy-5.

1.8.2.5. Hibridizacija

Nakon izolacije i označavanja, molekule RNA nanose se na DNA čip te se provodi reakcija hibridizacije, odnosno sparivanja komplementarnih parova baze. Za ovu reakciju važan je međusobni afinitet nukleinskih kiselina koje se koriste kao probe i kao ciljne molekule. Uz to je važna i temperatura pri kojoj se reakcija odvija, s obzirom na to da se povišenjem temperature dvostruke uzvojnice ponovno razdvajaju na jednostruke. Na međusobni afinitet nukleinskih kiselina utječe slijed nukleotida i sadržaj hibridizacijske otopine u kojoj se odvija reakcija hibridizacije. S obzirom na to da G-C par baza sadrži tri vodikove veze, a A-T samo dvije, sljedovi u kojima se nalazi više G-C parova su stabilniji. Nadalje, s obzirom da svaki par baza doprinosi sveukupnoj jačini veze, afinitet je proporcionalan dužini slijeda koji sudjeluje u reakciji. Čak i ako se sljedovi probe i ciljne molekule razlikuju u samo jednoj bazi, kao što je to slučaj u neodgovarajućim probama, dolazi do hibridizacije, ali se smanjuje stabilnost nastalog spoja.

1.8.2.6. Očitavanje čipova i analiza dobivene slike

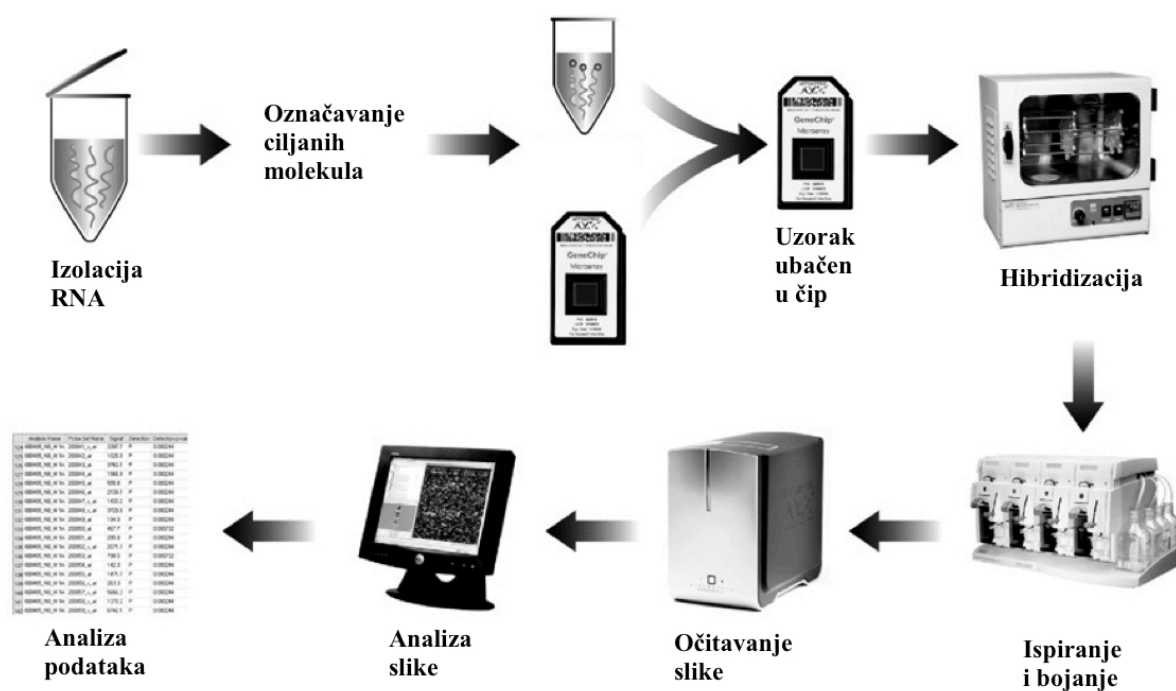
Za očitavanje pločica najčešće se koriste posebni strojevi za očitavanje (engl. *microarray scanners*) i odgovarajući programi za analizu očitanih vrijednosti (engl. *raw values*). Strojevi

za očitavanje u sebi sadrže fluorescentne detektore u kojima je izvor svjetlosti laser odgovarajuće valne duljine koji na pločicama pobuđuje površinu veličine nekoliko mikrometara. Fluorescencija korištenih boja bilježi se i kvantificira CCD (engl. *charge-coupled device*) kamerama ili fotomultiplajerima te na taj način nastaje digitalna slika. Za razliku od analogne slike u kojoj se boje kontinuirano izmjenjuju u prostoru, digitalna slika sastoji se od ograničenog broja točaka koje su raspoređene u koordinatnom sustavu i koje se nazivaju pikseli (engl. *pixels*). Broj piksela koji je moguće smjestiti u spomenuti koordinatni sustav predstavlja razlučivost ili rezoluciju (eng. *resolution*). Svaki piksel određen je položajem u koordinatnom sustavu i intenzitetom, odnosno dubinom boje (engl. *color depth*), a informacije o tome pohranjene su u obliku osnovnih mjernih jedinica za količinu informacije, takozvanim bitovima. Jedan bit tako sadrži informacije o dva različita intenziteta boje, a količina sadržanih informacija eksponencijalno raste ovisno o broju bitova. Strojevi za očitavanje pločica uglavnom imaju dubinu boje od 16 bita, što znači da svaki piksel može predstavljati jedan od 65 535 različitih intenziteta očitanoog signala. Dobivena digitalna slika pohranjuje se u računalu i obrađuje pomoću različitih komercijalno dostupnih programa za obradu slike koji omogućuju da se intenziteti piksela sa slike kvantificiraju u vrijednosti koje odgovaraju izražaju pojedinačnih gena. Prvi korak u analizi slike je stvaranje mreže (engl. *gridding, grid alignment, spot addressing*) pomoću koje se na slici pronalazi okvirni položaj svake točke na pločici. Nakon toga se pristupa odvajanju (engl. *segmentation*) točaka i pozadine (engl. *background*) za što se koriste različiti postupnici (*fixed circle segmentation, adaptive circle segmentation, watershed segmentation*) pomoću kojih se na točke stavlja okrugla maska određenog promjera. Svi pikseli koji se nalaze unutar maske smatraju se prednjim planom (engl. *foreground*), a oni izvan maske pozadinom. Na kraju se za svaku točku na pločici procjenjuje intenzitet signala. Budući da je intenzitet svakog piksela proporcionalan broju označenih molekula hibridiziranih na određenom mjestu na pločici, ukupni intenzitet signala može se procijeniti zbrajanjem prosječne vrijednosti intenziteta svih piksela unutar odvojene točke na slici. Na ukupni intenzitet signala najčešće se gleda kao na kombinaciju stvarnog signala nastalog hibridizacijom označenih molekula i signala iz pozadine koji nastaje zbog nespecifične hibridizacije, kontaminacije ili drugih artefakata. Zbog toga se od ukupnog intenziteta signala oduzima procijenjeni intenzitet signala iz pozadine, čime se dobivaju ispravljeni intenziteti (engl. *background corrected intensities*) koji se koriste za procjenu izražaja svakog pojedinačnog gena.

1.8.3. Affymetrixov GeneChip® sustav

Automatizirani Affymetrixov GeneChip® sustav za analizu genskoga izražaja sastoji se od hibridizacijske peći (engl. *GeneChip® hybridization oven*), automatizirane stanice za ispiranje i bojanje GeneChipa (engl. *GeneChip® Fluidics station*), stroja za očitavanje GeneChipa visoke rezolucije (engl. *GeneChip® scanner*) i računala s odgovarajućom programskom podrškom (engl. *GeneChip® Operating software*, GCOS) (slika 4). Provođenje eksperimenta standardizirano je i provodi se prema Affymetrixovom tehničkom priručniku (engl. *GeneChip® Expression Analysis Technical Manual*). Sam protokol započinje označavanjem ciljnih molekula. Ovisno o količini izolirane RNA provodi se označavanje u jednom ciklusu (engl. *one cycle target labeling*) kada je na raspolaganju 1µg - 15µg ukupne RNA, ili u dva ciklusa (engl. *two cycle target labeling*) za 10ng – 100ng ukupne RNA. Kada se radi o označavanju u jednom ciklusu, u prvom koraku se sintetizira cDNA s jednostrukom uzvojnicom obrnutim prepisivanjem poliadenilirane RNA (engl. *poly-A RNA*), pomoću oligo(dT) početnica vezanih na početnicu za T7 RNA polimerazu (engl. *T7-oligo(dT) promoter primer*) te T7 RNA polimeraze koja katalizira prepisivanje RNA u obrnutom smjeru (5' -> 3'). Posredstvom RNaze H, koja služi za čišćenje predloška RNA koji je poslužio za sintezu prvog lanca cDNA, sintetizira se drugi lanac cDNA. Označavanje u dva ciklusa sadrži još jedan korak u kojem se cDNA prije označavanja umnožava. Dobivena cDNA s dvostrukom uzvojnicom tada se pročišćava kako bi poslužila kao predložak u *in vitro* prepisivanju (engl. *in vitro transcription*, IVT). IVT se provodi u prisustvu T7 RNA polimeraze i mješavine biotiniziranih ribonukleotidnih analoga (UTP i CTP) za umnažanje i označavanje komplementarne RNA (cRNA). Nastala biotinizirana cRNA tada se čisti i cijepa na sljedove veličine 35 – 200 nukleotida (engl. *fragmentation*), a nakon provjere kvalitete na bioanalizatoru može se pohraniti na -20°C do -70°C dok se ne pristupi hibridizaciji. Prije same hibridizacije, iscijepana cRNA miješa se s kontrolnim oligonukleotidima (engl. *control oligo B2*) koji služe za kalibraciju programa za očitavanje slike, poliA kontrolama (engl. *polyA controls: lys, phe, thr, dap*) koje služe za kontrolu cjelokupnog procesa označavanja molekula, biotiniziranim hibridizacijskim kontrolama (engl. *biotinylated hybridization controls: bioB, bioC, bioD and cre*) koje pokazuju uspješnost hibridizacije, pranja i bojanja, te ostalim sredstvima potrebnim za odvijanje hibridizacije. Tako dobiveni hibridizacijski koktel stavlja se u GeneChip pločicu koja se ostavlja u hibridizacijskoj peći 16 sati na temperaturi od 45°C. Nakon vađenja iz hibridizacijske peći pločice se ispiru i boje streptavidin fikoeritrimom (engl. *streptavidin*

phycoerythryn, SAPE) u automatiziranoj stanici te su zatim spremne za očitavnje. Stroj za očitavanje slika sastoji se od konfokalnog, epifluorescentnog mikroskopa širokog polja koji koristi laser za pobuđivanje fluorofora vezanih za cRNA. Najnovija verzija ovakvog stroja ima rezoluciju točke na ekranu (engl. *pixel*) od $0,7\mu\text{m}$ i može skenirati točke na pločici sa preciznošću od $5\mu\text{m}$. U stroju se nalazi i cijev fotomultiplikatora koja sakuplja i pretvara vrijednosti intenziteta fluorescencije točaka na pločici u odgovarajuće razine intenziteta fluorescencije točka na ekranu koje se pohranjuju u računalu u obliku slikovne datoteke (.dat datoteka). Za analizu slike uglavnom se koristi Affymetrixov program s vlastitim postupnicima kojima se računa vrijednost intenziteta pojedinačno za svaku probu. Pomoću kontrolnih oligonukleotida, na slici se prvo stvara mreža koja odvaja pojedinačne probe, nakon čega se računa intenzitet signala za svaku probu. Dobivene vrijednosti pohranjuju se za daljnju analizu (.CEL datoteka).



Slika 4. Affymetrixov GeneChip® sustav. Preuzeto iz Dalma-Weiszhausz DD, Warrington J, Tanimoto EY, Miyada CG. *The affymetrix GeneChip platform: an overview. Methods Enzymol* 2006;410:3-28.

1.8.4. Obrada podataka dobivenih očitanjem čipova

Analiza GeneChip pločica provodi se korištenjem Affymetrixovog programa GCOS koji sadrži niz složenih postupnika. Osnovni kvantitativni podatak koji nam pruža analiza je vrijednost intenziteta signala koja je proporcionalna količini transkripata u ispitivanom uzorku. Razlike u genskom izražaju između dva uzorka otkrivaju se i kvantificiraju usporedbom vrijednosti intenziteta signala skupova proba na skupinama pločica na kojima se ispitivani uzorci hibridiziraju. Jedna skupina pločica pritom se označava kao eksperimentalna (engl. *experiment*), a druga kao osnovna (engl. *baseline*). Prije nego što se pristupi usporedbi, potrebno je ispraviti razlike u provođenju eksperimenata nastale zbog tehničkih i bioloških čimbenika. To se postiže provođenjem normalizacije (engl. *normalization*). Glavni tehnički čimbenici koji utječu na razlike su kvaliteta i kvantiteta označene RNA hibridizirane na probe te razlike u reagensima, bojenju i rukovanju pločicom, dok biološki čimbenici koji mogu utjecati na razlike proizlaze iz razlika u genetskoj pozadini, uvjetima rasta, vremenu uzimanja uzorka, spolu, dobi itd. Pažljivim planiranjem ispitivanja, standardiziranjem postupnika za označavanje i hibridizaciju te provođenjem normalizacije spomenute razlike mogu se značajno smanjiti. U Affymetrixovim postupnicima, kao što je MAS5 (engl. *MicroArray Suite*), normalizacija se provodi preračunavanjem (engl. *scaling*), pri čemu se koriste skupovi proba koji predstavljaju gene s već poznatim izražajem jednakim u svim stanicama (engl. *housekeeping genes*). Prilikom provođenja preračunavanja vrijednosti intenziteta skupova proba s eksperimentalne i osnovne skupine pločica postavljaju se na istu ciljnu vrijednost intenziteta (engl. *target intensity*) koja najčešće iznosi 100. Usporedba izražaja provodi se pomoću postupnika kojim se računa omjer vrijednosti intenziteta signala skupova proba na dvije različite skupine pločica, a može se prikazati kao omjer izražaja (engl. *expression ratio*), omjer promjene (engl. *fold change*) te kao logaritamska vrijednost omjera izražaja (engl. *log₂ expression ratio*), pri čemu se koristi logaritam po bazi 2. Tako, na primjer, dvostruko povećanje izražaja odgovara omjeru izražaja od 2, omjeru promjene od 2 te logaritamskoj vrijednosti omjera izražaja od 1. S druge strane, dvostruko smanjenje izražaja odgovara omjeru izražaja od 0,5, omjeru promjene od -2 te logaritamskoj vrijednosti omjera izražaja od -1. Naposljetku, ako nema promjene izražaja, omjer izražaja i omjer promjene iznose 1, a logaritamska vrijednost omjera izražaja 0.

Nakon što se ranije opisanim postupnicima utvrdi da je došlo do razlike u izražaju nekog gena, provode se statistički testovi kojima se utvrđuje je li ta razlika statistički značajna. Prije toga je važno odrediti koji je statistički test za to najprikladniji. Većina statističkih testova

može se svrstati u parametrijske i neparametrijske, a njihova upotreba ovisi o tome da li je raspodjela podataka normalna. U slučaju normalne raspodjele podataka, za analizu se koriste parametrijski testovi poput t-testa, a u slučaju da raspodjela nije normalna koriste se neparametrijski testovi poput Mann-Whitney testa i testa sume rangova (Wilcoxonov t-test). U slučaju da se izražaj gena uspoređuje na više skupina pločica, a ne samo na eksperimentalnim i osnovnim, koristi se parametrijski test analize varijance (ANOVA) ili neparametrijski Kruskal-Wallisov test. Pri analizi izražaja određenog gena najčešće se koristi t-test kojim se procjenjuje je li razlika prosječne vrijednosti intenziteta skupova proba na eksperimentalnim i na osnovnim pločicama statistički značajna. S obzirom na to da prosječna vrijednost na eksperimentalnim pločicama može biti i veća i manja od prosječne vrijednosti na osnovnim pločicama, koristi se dvosmjerni t-test (engl. *two-tailed test*). Nadalje, ako se na osnovnim pločicama koristi RNA prikupljena od zdravih kontrola, koristi se neovisni t-test (engl. *unpaired t-test*), a ako se koristi nanovo prikupljena RNA istih bolesnika, koristi se zavisni t-test (engl. *paired t-test*). Provođenjem t-testa dobiva se p-vrijednost (engl. *p-value*). Ako je p-vrijednost manja od odabrane razine značajnosti (α), koja najčešće iznosi 0,05, tada možemo ustvrditi da je ispitivana razlika statistički značajna, odnosno da je slučajna u samo jednom od dvadeset provođenja ovog testa. Međutim, ako se t-test provodi mnogo puta, kao što je to slučaj u analizi genskoga izražaja, tada bi to značilo da od 10 000 gena čak njih 500 pokazuje razliku u izražaju sasvim slučajno. Stoga se pri analizi genskoga izražaja koriste još i kontrolne metode, kao što je Benjamini-Hochberg metoda, pomoću kojih se smanjuje broj gena koji pokazuju lažnu razliku u izražaju, odnosno postotak lažnih otkrića (engl. *false discovery rate, FDR*) (220).

1.8.5. Pohrana podataka

Ispitivanje u kojem se provodi analiza genskoga izražaja na čipu nije jednostavno i obično zahtijeva znatna financijska sredstva. Stoga je važno da se velika količina podataka koja se dobije u takvom ispitivanju dobro organizira i pohrani u neku od javno dostupnih baza podataka. Pohranjivanje podataka u takvim bazama ujedno je i uvjet za objavu istraživanja u većini znanstvenih časopisa. Postoji nekoliko javno dostupnih baza podataka u kojima je moguće pohraniti rezultate istraživanja, a najpoznatije su *Gene Expression Omnibus (GEO)* u sklopu američkog Nacionalnog centra za biotehnološke informacije (engl. *National Center for Biotechnology Information, NCBI*) i *ArrayExpress* u sklopu Europskog bioinformatičkog instituta (engl. *European Bioinformatics Institute, EBI*). Kako bi se pohranjeni rezultati

moгли usporediti s rezultatima drugih istraživanja te kako bi se mogla provesti neovisna provjera dobivenih rezultata, potrebno je držati se određenog standarda prilikom objave rezultata. Stoga je međunarodno društvo biologa, bioinformatičara i statističara (engl. *Functional GEnomics data (FGED) Society*) stvorilo grupu koja je razvila smjernice MIAME (engl. *Minimum Information About a Microarray Experiments*), u kojima je naveden minimum potrebnih informacija o eksperimentu na čipu (221). U navedeni minimum spadaju informacije o dizajnu istraživanja, o korištenim pločicama, o korištenim uzorcima, o izoliranju i označavanju molekula RNA, o uvjetima u kojima je provedena hibridizacija, o očitavanju pločica te naposljetku o načinu provođenja normalizacije. Kako bi se prikupljene informacije mogle pohranjivati u strukturiranom obliku, spomenuto društvo stvorilo je i radnu grupu koja je pokrenula projekt MAGE (engl. *Microarray and Gene Expression*), u kojem su definirani standardi za razmjenu rezultata dobivenih istraživanjima genskoga izražaja na čipu (www.mged.org). Ti standardi uključuju model za razmjenu rezultata koji se zove MAGE-OM (engl. *Microarray Gene Expression – Object Model*) i dva različita formata za razmjenu rezultata (222). Prvi takav format razvijen je u jeziku za označavanje podataka (engl. *EXtensible Markup Language, XML*), i zove se MAGE-ML (engl. *Microarray Gene Expression – Markup Language*), a ubrzo nakon toga razvijen je i drugi, jednostavniji, koji se temelji na proračunskim tablicama (engl. *spreadsheets*) te je nazvan MAGE-TAB (engl. *microarray gene expression – Tabular Format*) (223, 224). Ujedno, baze podataka nude različite alate za unos podataka kao što je MIAMExpress za unos podataka u ArrayExpress bazu.

1.8.6. Analiza grupa i obilježja

Za sistematsku analizu rezultata dobivenih mjerenjem genskoga izražaja na DNA čipu koristi se analiza grupa (engl. *cluster analysis*) i analiza obilježja (engl. *annotation analysis*). Analiza grupa temelji se isključivo na podacima dobivenim u eksperimentu, dok se analiza obilježja temelji na prijašnjim saznanjima. Analizom grupa moguće je propustiti neke obrasce koji su odmah uočljivi ako se razmatraju prijašnja saznanja, dok analiza obilježja može biti vrlo ograničavajuća ako se previše usredotočuje na već opisane gene i procese (225).

1.8.6.1. Analiza grupa

Osnovna ideja koja stoji iza grupiranja podataka (engl. *clustering*) dobivenih očitanjem DNA čipa je da geni sa sličnim izražajem imaju i sličnu biološku ulogu (226). Za grupiranje se

koriste metode kojima se dobiveni podaci grupiraju u unaprijed određene grupe (engl. *supervised methods*) ili metode u kojima se podaci grupiraju bez obzira na ranija saznanja (engl. *unsupervised methods*). Grupiranje se provodi na obrađenim podacima prikupljenim u svim eksperimentima, a kako bi se prikazao izražaj gena u svakom eksperimentu, vrijednosti za svaki gen predstavljene su kao točka u n -dimenzionalnom prostoru, pri čemu n predstavlja broj provedenih eksperimenata. Na temelju sličnosti u izražaju moguće je grupirati gene ili eksperimente, a moguće je istovremeno koristiti i oba grupiranja pa tada govorimo o dvostrukom grupiranju (engl. *two-way clustering*; *biclustering*). Neke od često korištenih metoda za grupiranje su K-prosjeci (engl. *K-means*), samoorganizirajuće mape (engl. *self-organizing map*, SOM) i K-najbliži susjed (engl. *K-nearest neighbor*, KNN), no najčešće se koristi hijerarhijsko grupiranje (engl. *hierarchical clustering*) i analiza glavnih komponenti (engl. *principal component analysis*, PCA) (227). Prilikom hijerarhijskog grupiranja, prvo se stvara matrica udaljenosti (engl. *distance matrix*) u kojoj se nalaze uzajamne udaljenosti gena. Nakon toga se dva najbliža gena mogu spojiti u grupu ako se koristi pristup koji počinje od pojedinačnih gena (engl. *agglomerative, bottom-up approach*), ili se grupe radvajaju, u slučaju da se koristi pristup koji počinje od pojedinačne grupe u kojoj su sadržani svi geni (engl. *divisive, top-down approach*). Ovaj postupak ponavlja se $n-1$ puta, a svaki puta stvara se nova matrica udaljenosti. Udaljenosti među grupama računaju se pomoću metode jednostruke povezanosti (engl. *single linkage*; *minimum method*, *nearest neighbor*) kojom se računa najmanja udaljenost između bilo kojeg člana jedne grupe i bilo kojeg člana druge grupe, metode potpune povezanosti (engl. *complete linkage*; *maximum method*, *furthest neighbor*), kojom se računa najveća udaljenost između bilo kojeg člana jedne grupe i bilo kojeg člana druge grupe, ili metode prosječne povezanosti (engl. *average linkage*; *unweighted pair group method with arithmetic mean*, UPGMA), kojom se računa prosječna udaljenost između bilo kojeg člana jedne grupe i bilo kojeg člana druge grupe. Analizom glavnih komponenti, s druge strane, smanjuje se broj dimenzija i broj točaka koje se koriste za prikaz vrijednosti izražaja gena u prostoru te se prikazuju samo razlike vrijednosti izražaja svih gena u provedenim eksperimentima. To se postiže otkrivanjem pravaca u kojima su razlike najveće, a koji se zovu glavne komponente. Najviše razlika pokazuje prva glavna komponenta, a svaka sljedeća pokazuje preostale razlike. Na taj način stvara se dvodimenzionalni ili trodimenzionalni dijagram u kojem je prikazana veza između analiziranih gena i provedenih eksperimenata.

1.8.6.2. Analiza obilježja

Važan korak u analizi rezultata dobivenih očitanjem DNA čipa je obilježavanje gena (engl. *gene annotation*), za što se najčešće koriste pravila definirana projektom genske ontologije (engl. *gene ontology project*) (228). Obilježavanje po pravilima genske ontologije omogućuje standardiziranje prikaza svojstava gena i genskih produkata u različitim biološkim vrstama i bazama podataka, uvid u biološke mehanizme u koje su pojedini geni uključeni te istraživački pristup na razini sustavne biologije. U tu svrhu razvijena su tri rječnika (engl. *vocabularies*), odnosno ontologije (engl. *ontologies*), u kojima su definirani termini koji opisuju kojoj staničnoj komponenti pripada genski produkt (engl. *cellular component*), koja mu je molekularna funkcija (engl. *molecular function*) i u kojem biološkom procesu sudjeluje (engl. *biological process*). Primjeri termina sadržanih u rječniku koji opisuje biološke procese su “rast i održavanje stanice” ili “provođenje signala” u širem smislu, dok su primjeri za procese u užem smislu “translacija”, “metabolizam pirimidina” ili “biosinteza cAMP”. Primjeri termina iz rječnika koji opisuje funkciju molekula u širem smislu su “enzim”, “transporter” ili “ligand”, dok u užem smislu funkciju molekula opisuju termini poput “adenilat ciklaza” ili “ligand Toll receptora”. Termini iz rječnika za opis staničnih komponenti su na primjer “ribosom”, “proteasom”, “stanična membrana” ili “Golgijevo tijelo”. Svi termini koji se koriste u rječnicima mogu se primjeniti na sve biološke organizme i neprestano se nadograđuju, a svaki od termina povezan je s jednim ili više drugih termina u istom ili u drugom rječniku. Zahvaljujući projektu genske ontologije geni se mogu obilježiti jednim ili više terminom iz svakog od spomenutih rječnika, a na temelju termina kojima su obilježeni mogu se svrstati u funkcionalne povezane skupine. Pomoću statističkih metoda može se provesti analiza zastupljenosti (engl. *enrichment analysis*) svakog pojedinčanog termina na listi odabranih gena, kao i analiza zastupljenosti grupa funkcionalno sličnih termina. Za analizu zastupljenosti termina genske ontologije najčešće se koriste programi poput Onto-Express-a, GStat-a, GoMiner-a, EASE-a i DAVID-a (229).

1.8.7. Analiza mreža i puteva

Znanost je prema definiciji ukupnost sređenih i uopćenih znanja koja uključuju promatranja, pokuse, istraživanja i objašnjavanje činjenica i pojava u pojedinim dijelovima čovjekova poznavanja prirode i društva (www.hjp-novi-liber.hr). U mnogim znanostima tijekom proteklih stoljeća dominirao je redukcionizam koji je na složeni sustav gledao kao na zbroj svih njegovih elemenata. Takav pristup pružao nam je mnogo informacija o samim

elementima, no s vremenom je postalo jasno da su funkcija i struktura složenih sustava puno češće rezultat veza među elementima sustava nego zbroja samih elemenata. Stoga se znanost okrenula holističkom pristupu u kojem se na sustav gleda kao na cjelinu. Na temelju holizma razvila se i sistemska biologija, interdisciplinarna grana biologije koje proučava međudjelovanja u složenim biološkim sustavima. Primjer takvog biološkog sustava je stanica koja se sastoji od mnoštva međusobno povezanih elemenata, kao što su proteini, DNA, RNA i male molekule. Saznanja o vezama među pojedinačnim elementima nekog biološkog sustava već dugo vremena dobivaju se biokemijskim eksperimentima, no pravi zamah sistemska biologija doživjela je tek nakon što je bilo moguće provesti istraživanja visoke propusnosti (230). U takvim istraživanjima istovremeno se ispituje mnoštvo elemenata, a na temelju statističke obrade dobivenih rezultata moguće je opisati veze među pojedinačnim elementima (231). Kako bi se zbivanja unutar složenih bioloških sustava objasnila što zornije, elementi i veze unutar sustava prikazuju se u obliku puteva (engl. *pathways*) i mreža (engl. *networks*). Biološki putevi predstavljaju niz aktivnosti koje se odvijaju preko različitih posrednika i imaju neki zajednički cilj (232). Na njih možemo gledati kao na vektore usmjerene k određenoj točki. Razlikujemo molekularne puteve (engl. *molecular pathways*) koji preko različitih molekula djeluju na osnovne biokemijske mehanizme kao što je glukoneogeneza ili MEK (engl. *MAPK ERK kinase*) signalni put, zatim stanične puteve (engl. *cellular pathways*) koji reguliraju sveukupna zbivanja u stanici poput sinteze proteina ili apoptoze te organske odnosno sistemske puteve (engl. *organ/system pathways*) koji izvršavaju više funkcije poput pamćenja i imunološkog odgovora. Za razliku od puteva, veze među elementima u mreži ne moraju pokazivati neku aktivnost, zbog čega mreže nisu vektori usmjereni nekom cilju. Biološke mreže u mnogočemu se podudaraju s mrežama koje se koriste za prikaz drugih složenih sustava kao što su internet, računalo i društvo. Pri radu s mrežama koriste se univerzalna pravila koja definira nova znanost o mrežama (engl. *network science*). Mreže se sastoje od čvorova (engl. *node*) međusobno povezanih rubovima (engl. *edge*) koji predstavljaju definirane veze. U biološkim mrežama čvorovi mogu biti bilo koji biološki elementi, uključujući gene i njihove produkte, nekodirajuće sljedove DNA, puteve, bolesti, terapijske intervencije ili kombinaciju svega navedenog. No, u mreži su puno važnije veze, na temelju kojih možemo razlikovati genske i fizičke mreže (233). U genskim mrežama postoji veza između dva različita gena (engl. *genetic linkage*), dok u fizičkim mrežama postoje fizičke, funkcionalne i regulatorne veze između uključenih elemenata. Primjeri takvih mreža su regulatorna mreža (engl. *regulatory network*), mreža genskoga izražaja (engl. *co-*

expression network), metabolička mreža (engl. *metabolic network*) i mreža proteinskih interakcija (engl. *protein-protein interaction network*, PPI).

Putevi i mreže koriste se u funkcionalnoj genomici za povezivanje genotipa i fenotipa prilikom analize rezultata dobivenih istraživanjima visoke propusnosti u kojima se ispituje cjelokupni genom, transkriptom ili proteom. Analizom genskoga izražaja pomoću puteva mogu se otkriti putevi u kojima su statistički značajno zastupljeni geni koji su pokazali razliku u izražaju. Općenito u analizi puteva možemo razlikovati dva pristupa: analiza konkretnog puta (engl. *candidate pathway analysis*) ili analiza velikog broja puteva (engl. *genome-wide pathway analysis*, GWPA). Prednost analize pomoću puteva je da su posrednici i njihova povezanost u putevima definirani na temelju ranije provedenih istraživanja, zbog čega vrlo dobro prikazuju različite biološke funkcije u zdravlju i bolesti ili nakon liječenja. No, upravo zbog već definiranih odnosa, ne mogu se otkriti neka nepredviđena međudjelovanja gena, što pak predstavlja glavni nedostatak ovakve analize. S druge strane, analiza genskoga izražaja pomoću mreža, za razliku od analize pomoću zastupljenosti funkcionalnih grupa gena i analize pomoću puteva, ne postavlja nikakva ograničenja u smislu prethodnog stvaranja grupa gena ili definiranja veza, zbog čega se smatra da mreže najbolje prikazuju složene sustave kao što su poligenske bolesti. Analizom genskoga izražaja pomoću mreža stvaraju se nove funkcionalne mreže u kojima su prikazani geni koji su pokazali razliku u izražaju i njihove međusobne veze te se na temelju toga mogu donijeti zaključci o biološkim funkcijama u kojima ti geni sudjeluju. S obzirom da se analize puteva i mreža zasnivaju na složenim postupnicima, za njihovo provođenje koriste se računalni programi poput IPA (Ingenuity Systems Inc., <http://www.ingenuity.com>) i Cytoscape (<http://www.cytoscape.org>) (234).

1.8.8. Potvrda rezultata

Potvrda rezultata dobivenih ispitivanjem genskoga izražaja na čipu provodi se pomoću računalnih (engl. *in silico*) i laboratorijskih metoda (235). Računalnim metodama dobiveni rezultati uspoređuju se s podacima dostupnim u literaturi te s podacima iz baza podataka u kojima su sadržani rezultati drugih sličnih istraživanja. S druge strane, laboratorijske metode omogućuju neovisnu, eksperimentalnu potvrdu dobivenih razina izražaja, a najčešće se provode pomoću istih uzoraka koji su se koristili u eksperimentu provedenom na čipu. U ove metode ubraja se *Northern-blot* hibridizacija, test zaštite od ribonukleaza (engl. *ribonuclease protection assay*), *in situ* hibridizacija te kvantitativna lančana reakcija polimerazom u

stvarnom vremenu (engl. *quantitative real time polymerase chain reaction*, qRT-PCR). Za laboratorijsku analizu najčešće se odabiru geni s najvećom promjenom u izražaju, no osim razine izražaja, na odabir utječu i biološke funkcije gena te rezultati ranije provedenih istraživanja. Nakon analize i potvrde, dobiveni rezultati mogu se ispitati i u novoj skupini uzoraka izoliranih iz sustava u kojima je također opažen ispitivani biološki fenomen. U slučaju da se analiziraju razlike u genskomu izražaju između bolesnika i zdravih kontrola, ovakvim pristupom možemo potvrditi da su razlike u genskomu izražaju prisutne i u novoj skupini bolesnika te da su najvjerojatnije univerzalna karakteristika ispitivane bolesti.

Za potvrdu i ispitivanje dobivenih rezultata u novoj skupini bolesnika najčešće se koristi qRT-PCR metoda. Nedavno provedeno istraživanje pokazalo je da razina genskoga izražaja izmjerena ovom metodom dobro kolerira s razinama izražaja izmjerenima na čipu (236). Sama reakcija provodi se u tri glavna koraka koja čine jedan „ciklus“: denaturacija, hibridizacija i produljivanje. Prije početka reakcije, RNA izolirana iz stanica ili tkiva prepisuje se u cDNA kojoj se tada dodaju određeni sljedovi nukleotida, odnosno početnice (engl. *primers*) specifične za ispitivane gene. Tako dobivena smjesa se zagrijava kako bi se razdvojili, odnosno denaturirali lanci DNA, a zatim hladi kako bi se početnice hibridizirale s odgovarajućim ciljnim molekulama DNA. Budući da je koncentracija početnica puno veća od ciljnih molekula, koje se nazivaju i predlošci, većina denaturiranih ciljnih molekula DNA hibridizira se s početnicama umjesto s komplementarnim lancem ciljne molekule DNA. Termostabilni enzim DNA polimeraza, po kojoj je ova reakcija dobila ime, nakon toga produljuje slijed početnica te stvara potpuno novu dvolančanu molekulu DNA predloška. Ovaj ciklus ponavlja se mnogo puta, što dovodi do eksponencijalnog umnažanja ciljnih molekula DNA. Ovisno o načinu provođenja razlikujemo kvalitativnu PCR, semi-kvantitativnu PCR i kvantitativnu PCR. Kvalitativnom PCR možemo ispitati prisutnost određenog gena u uzorku razdvajanjem umnoženih molekula elektroforezom na agaroznom gelu, no ne može se odrediti apsolutni broj umnoženih molekula ili omjer izražaja. Semi-kvantitativna PCR u osnovi je slična kvalitativnoj PCR, osim što se potonjim načinom nakon određenog broja ciklusa analizira nakupljanje ciljnih molekula DNA, pod pretpostavkom da se u uzorcima u kojima se na početku nalazi veći broj ciljnih molekula mogu ranije otkriti umnožene ciljne molekule. Zahvaljujući označavanju umnoženih ciljnih molekula DNA, kvantitativnom PCR u realnom vremenu moguće je u svakom ciklusu odrediti trenutnu koncentraciju umnoženih molekula (237). Za označavanje se najčešće koriste agensi koji se vežu za dvolančanu DNA. Oni se mogu podijeliti na interkalatore (engl. *intercalators*) poput

etidij bromida i agense koji se vežu za male žljebove DNA (engl. *minor groove binders*) poput SYBR Green I. Kako bi se mogli koristiti za PCR, ovi agensi moraju pokazivati povećanu fluorescenciju kada se vežu za dvolančanu DNA i ne smiju inhibirati reakciju. Osim navedenih agensa, za kvantifikaciju umnoženih molekula DNA mogu se koristiti i posebne hibridizacijske probe i/ili početnice označene s dva fluorofora. Kada su fluorofori u neposrednoj blizini, zbog prijenosa rezonantne energije fluorescencije među fluoroforima (engl. *fluorescence resonance energy transfer*, FRET), ne može se otkriti fluorescencija, no svako umnažanje molekule DNA dovodi do otpuštanja fluorofora, zbog čega je moguće izmjeriti fluorescenciju i odrediti količinu umnoženih molekula DNA. U reakciji lančane polimeraze u realnom vremenu vrlo je bitan trenutak ili ciklus u kojem se prvi puta može otkriti umnožena ciljna molekula DNA (engl. *cycle threshold*, C_t), odnosno u kojem je intenzitet fluorescencije veći od pozadinske fluorescencije. Što je veća početna koncentracija ciljane molekule DNA u uzorku, prije će doći do značajnog pojačanja signala fluorescencije i C_t će biti manji. Sama reakcija može se provesti u jednom koraku, pri čemu se odjednom odvijaju sve reakcije od prepisivanja RNA do umnažanja, ili u dva koraka, pri čemu se prvo odvija prepisivanje u cDNA, a zatim umnažanje. Kako bi se različiti uzorci mogli učinkovito uspoređivati, prije kvantifikacije umnoženih molekula DNA potrebno je provesti normalizaciju, zbog čega se u svaki ispitivani uzorak dodaju i početnice specifične za tzv. domaćinske gene (engl. *housekeeping genes*). To su geni poput GADPH, beta aktina i 18S RNK, koji kodiraju proteine za održavanje osnovne strukture i funkcije stanica te imaju sličan izražaj u svim biološkim uzorcima. Kvantifikacija pak može biti apsolutna ili relativna. U apsolutnoj kvantifikaciji određuje se broj kopija određenog gena u ispitivanim uzorcima na temelju usporedbe s uzorcima u kojima je poznat broj kopija, dok se u relativnoj kvantifikaciji određuje omjer izražaja određenog gena u ispitivanom uzorku u odnosu na neki kontrolni uzorak, pri čemu se koriste različite matematičke metode poput metode standardne krivulje (engl. *standard curve method*) i komparativne C_t metode ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). Lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu traje samo 30 – 60 minuta, relativno je jeftina i zahtijeva svega nekoliko ng RNA za analizu.

1.9. Dosadašnja istraživanja genskoga izražaja u bolesnika sa spondiloartritisima

Do danas je proveden tek manji broj istraživanja u kojima je učinjena analiza genskoga izražaja u bolesnika sa SpA-om (tablica 5). Dva takva istraživanja provedena su prije više od deset godina, u njima je sudjelovao mali broj bolesnika i rađena je analiza izražaja malog

broja gena (238, 239). Istraživanja provedena u proteklih nekoliko godina pokazala su da se na temelju analize genskoga izražaja mogu pouzdano razlikovati bolesnici sa SpA-om od zdravih osoba (240-244). Pokazalo se da u bolesnika sa SpA-om povećan izražaj imaju geni koji sudjeluju u prirođenom imunološkom sustavu (SPARC, SLPI, NLRP2), zatim geni za receptore IL-1 te geni koji sudjeluju u pregradnji kostiju (240). Nadalje, pokazalo se da izražaj gena RGS1 može poslužiti kao prediktivni čimbenik za AS, a još bolje za nediferencirani oblik SpA-a (241). Osim toga, pokazalo se da u bolesnika s AS-om postoji smanjen izražaj gena povezanih s imunološkim odgovorom (NR4A2, TNFAIP3, CD69), što može poslužiti kao snažni prediktivni čimbenik za AS (242). K tome se pokazalo da u bolesnika s AS-om povećan izražaj imaju geni za TLR4 i TLR5, što potvrđuje važnost različitih podvrsta TLR i odgovora na gram negativne bakterije u patogenezi SpA-a (243). Naposljetku, nedavno provedeno istraživanje pokazalo je da u bolesnika s AS-om postoji povećan izražaj gena SPOCK2 i EP300 čiji produkti sudjeluju u metabolizmu kosti i hrskavice (244).

Među prvim istraživanjima u kojima je analiziran izražaj gena u bolesnika s juvenilnim spondiloartritisom bilo je istraživanje provedeno 2004. godine (245). U tom istraživanju sudjelovalo je 26 bolesnika s postavljenom dijagnozom kroničnog artritisa prema ACR-ovim dijagnostičkim i klasifikacijskim kriterijima te 15 osoba odgovarajuće dobi i spola koji su poslužili kao zdrave kontrole. Od toga je 5 bolesnika imalo oligoartikularni oblik bolesti, 15 poliarartikularni, a 6 je imalo postavljenu dijagnozu jSpA-a. Svim bolesnicima i zdravim kontrolama učinjenja je analiza izražaja gena mononuklearnih stanica periferne krvi (PBMC), a u 10 bolesnika sa poliarartikularnim oblikom bolesti, 5 sa oligoartikularnim i 5 sa jSpA-om učinjena je i analiza genskoga izražaja mononuklearnih stanica sinovijalne tekućine (SFMC). Za analizu je korišten Affymetixov U95Av2 chip sa 12 651 skupom proba. Dobiveni rezultati pokazali su da u PBMC-u bolesnika s poliarartikularnim oblikom bolesti postoji razlika u izražaju 342 gena u odnosu na zdrave kontrole. Provedena ontološka analiza pokazala je da je većina tih gena povezana s regulacijom stanica imunološkog sustava, signalnim putevima (JAK-STAT), metabolizmom i degradacijom proteina te angiogenezom. Usprkos malom broju bolesnika s jSpA-om, pokazalo se da u PBMC-u ovih bolesnika također postoji statistički značajna razlika u genskomu izražaju ($P \leq 0.05$) za gene CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL8 i STAT1. Produkti CXCL gena su kemokini povezani s angiogenezom i mogu se kategorizirati kao angiogeni ili angiostatski ovisno o prisutnosti ili odsutnosti ELR motiva (glutaminska kiselina, lizin i arginin). Daljnja analiza genskoga izražaja ovih gena u PBMC-u i SFMC-u

svih bolesnika pokazala je značajno povećan izražaj četiri angiogena gena (CXCL1, CXCL2, CXCL3 i CXCL8) u PBMC-u bolesnika s poliartrikularnim oblikom bolesti u usporedbi s izražajem u bolesnika s oligoartrikularnim oblikom bolesti i s izražajem u zdravih osoba. Izražaj spomenutih gena u SFMC-u bio je podjednako povećan u svim oblicima bolesti u usporedbi sa izražajem u PBMC-u zdravih kontrola. S druge strane, izražaj tri angiostatska gena (CXCL9, CXCL10 i CXCL11) u SFMC-u bolesnika s poliartrikularnim oblikom bio je povećan u usporedbi s izražajem u PBMC-u zdravih kontrola, no smanjen u usporedbi s izražajem u SFMC-u oligoartrikularnih bolesnika. CXCL10 je također bio manje izražen u SFMC-u bolesnika s jSpA-om u usporedbi s izražajem u SFMC-u bolesnika s oligoartrikularnim oblikom bolesti. Za gene CXCL3 i CXCL8 učinjena je i RT-PCR analiza u bolesnika s poliartrikularnim oblikom bolesti koja je potvrdila rezultate dobivene na čipu. Među nedostatke ovog istraživanja spada prije svega malen broj bolesnika s jSpA-om koji nisu odabrani prema ILAR-ovim kriterijima, korištenje PBMC-a i SFMC-a za izolaciju mRNA, zatim malen broj skupova proba na korištenoj pločici te neprovođenje potvrde dobivenih rezultata u većeg broja bolesnika i za veći broj gena. Osim toga, za ontološku klasifikaciju gena korištena je zastarjela baza. Ipak, ovo istraživanje ukazalo je na ulogu CXCL kemokina i JAK-STAT signalnog puta u razvoju juvenilnog idiopatskog artritisa, uključujući i jSpA.

U drugom istraživanju, koje je provedeno u pet centara i trajalo je dvije godine, sudjelovalo je 136 djece s postavljenom dijagnozom JIA-a te 59 odgovarajućih zdravih kontrola (246). Svi bolesnici klasificirani su pomoću ILAR-ovih kriterija, tako da je 28 djece imalo ErA, 43 perzistentni oligoartritis, 45 RF negativni poliartritis, a 21 dijete imalo je sistemski oblik JIA-a. Prije skupljanja uzorka, niti jedan od sudionika istraživanja nije bio liječen DMARD-ovima niti biološkim lijekovima. Također, niti jedan od sudionika nije imao postavljenu dijagnozu neke druge upalne bolesti osim JIA-a. Analiza genskoga izražaja obavljena je pomoću Affymetrix HG-U133 Plus 2.0 chipa, a pokazala je da postoji razlika u izražaju 5 671 gena. U bolesnika s ErA-om 148 gena pokazalo je razliku u izražaju, u bolesnika s perzistentnim oligoartritisom 703, u bolesnika s RF negativnim poliartritisom 608, a u bolesnika s sistemskim oblikom bolesti 4 643 gena. Samo 6 gena pokazalo je razliku u izražaju u svim oblicima bolesti (APPBP2, ZNF230, ZND451, C15orf17, C14orf012, MMD). U 14 bolesnika sa sistemskim oblikom bolesti i 15 zdravih kontrola provedena je potvrda dobivenih rezultata pomoću RT-PCR-a. Četiri gena za koja je GeneChip analiza pokazala da imaju veću zastupljenost u bolesnika sa sistemskim oblikom bolesti (haptoglobin, IL-10, MS4A4A i

SOCS-3) i ovom metodom pokazala su sličan izražaj. Analiza svih gena koji su pokazali razliku u izražaju pomoću *Ingenuity Pathway Analysis* programa otkrila je da ti geni sudjeluju u 46 puteva koji su primarno povezani s imunološkim i upalnim odgovorom. Analiza grupa gena pokazala je smanjen izražaj gena za hemoglobin α (HBA1/A2 i HBA2) i β (HBB) u bolesnika s ErA-om. To je otkriće bilo neočekivano, s obzirom na to da su bolesnici s AS i drugim oblicima SpA rijetko anemični (247). Međutim, jedan od uzroka smanjenog izražaja ovih gena mogao bi biti odgovor na TGF- β , za koji se zna da je više izražen u AS-u i da može djelovati preko protein 1 aktivatora koji se veže na mjesto blizu gena za hemoglobin (248). Rezultati ovog istraživanja pokazali su da postoje jasne razlike u izražaju gena povezanih s imunološkim i upalnim odgovorom u PBMC-u bolesnika s JIA-om. Prilikom odabira bolesnika s ErA-om korišteni su ILAR-ovi kriteriji, no i u ovom istraživanju glavni naglasak bio je na analizi gena povezanih s drugim oblicima JIA-a, a ErA skupina bolesnika bila je heterogena.

Naposljetku, krajem 2012. objavljeno je istraživanje u kojem su sudjelovali samo bolesnici s postavljenom dijagnozom ErA-a prema ILAR-ovim kriterijima (249). RNA je izolirana iz PBMC-a 20 bolesnika s ErA-om i 8 odgovarajućih zdravih kontrola te iz SFMC-a 10 bolesnika s ErA-om. Analiza genskoga izražaja učinjena je na Illumina Human WG-6_v3_BeadChip pločicama u 17 bolesnika s ErA-om i 8 zdravih kontrola kojima je RNA izolirana iz PBMC-a, te u 7 bolesnika s ErA-om kod kojih je RNA izolirana iz SFMC-a. RT-PCR učinjen je svim bolesnicima. Uz odabrane značajke (omjer izražaja ≥ 2 , $p < 0,05$) nije opažena razlika u izražaju gena između PBMC-a bolesnika s ErA-om i zdravih kontrola, dok je u usporedbi s SFMC-om bolesnika s ErA-om 216 gena imalo povećan izražaj, a 131 gen imao je smanjen izražaj. Daljnja analiza pomoću GeneSpring GX programa pokazala je da 182 od tih gena sudjeluju u 13 različitih puteva, no niti jedan od puteva nije pokazao statistički značajnu razliku u regulaciji ($p < 0,05$). Iz liste navedenih gena odabrani su geni za potvrdu RT-PCR-om koja je pokazala da geni Granzyme H, KLRF1, NKG7, KIR3DL3, CD244, CCR7, CD248 i FAIM3 imaju smanjen izražaj u PBMC-u u usporedbi s SFMC-om, dok su geni CD1c i CD1d imali povećan izražaj. Za topivi CD163 (sCD163) učinjena je ELISA u plazmi 27 uzoraka prikupljenih od bolesnika s ErA-om i svih zdravih kontrola te nije uočena razlika u koncentraciji. No, u sinovijalnoj tekućini bolesnika s ErA-om koncentracija sCD163 bila je značajno veća nego u plazmi istih bolesnika. Ovo je prvo istraživanje koje je pokazalo da u SFMC-u bolesnika s postavljenom dijagnozom ErA-a postoji različit izražaj gena u odnosu na PBMC istih bolesnika. Većina gena koja je pokazala

razliku u izražaju povezana je s imunološkim sustavom, tako da su u SFMC-u povećan izražaj imali geni povezani s predočavanjem antigena, čišćenjem (engl. *scavenger function*), kemotaksijom i proteazama, dok su geni uključeni u funkciju NK stanica, adheziju stanica i inhibiciju apoptoze pokazali smanjen izražaj. Nadalje, povećan izražaj CD163 gena u SFMC i povećana koncentracija sCD163 u sinovijalnoj tekućini ukazuje da bi ovaj gen i njegov produkt, za koji se ranije pokazalo da ima protuupalni učinak, mogli imati važnu ulogu u razvoju bolesti. Zanimljivo je da u ovom istraživanju nije otkrivena značajna razlika u izražaju gena u PBMC-u bolesnika i zdravih kontrola. To bi djelomično moglo biti uzrokovano metodama korištenim u istraživanju (izolacija RNA, pločice), a djelomično i odabranim graničnim vrijednostima (omjer izražaja ≥ 2). Osim toga, u nedostatke istraživanja može se ubrojiti i heterogenost bolesnika te činjenica da su neki bolesnici bili liječeni DMARD-ovima. Nadalje, izražaj gena u bolesnika s ErA-om nije se usporedio s izražajem u bolesnika sa sličnim upalnim bolestima, poput drugih oblika JIA-e. Ipak, ovo istraživanje pokazuje da se u bolesnika s ErA-om u sinovijalnom odjeljku odvijaju imunološki procesi važni za patogenezu bolesti.

Tablica 5. Do sada provedena istraživanja u kojima je analiziran genski izražaj u bolesnika s postavljenom dijagnozom neke od bolesti iz skupine spondiloartritisa.

Istraživanje	Značajni geni	Izvor mRNA	Dg	P (N)
A 588 gene microarray analysis of the peripheral blood mononuclear cells of spondyloarthropathy patients (238).	MNDA, MRP8, MRP14, JAK3, MAP kinase p38, TNFR2/p75, CCR1, CXCR4, Integrin beta 1, IL1 beta, IL-8	PBMC	RA SpA PsA	6 7 6
Clues to pathogenesis of spondyloarthropathy derived from synovial fluid mononuclear cell gene expression profiles (239).	MCP-1, IL-8, IL-1beta, EMAP-II, IFN-Y, TNF alpha, BiP	SFMC	RA SpA	5 5
Insights in to the pathogenesis of axial spondyloarthropathy based on gene expression profiles (240).	ALOX12, BCL6, CLU, CR1, DEFA4, GRB10, IL1R1, IL1R2, MAPK14, NCR3, NLRP2/NALP2, PTGS1/COX1, SELP, SLPI, SOD2, SPARC/SPOCK2, THBD, THBS1, TREM1, BMP6, CTNNAL1, KREMEN1, PCSK6	WB	SpA	18
Genome-wide expression profiling and Real-time PCR identify RGS1 as a candidate biomarker for undifferentiated SpA (241).	RGS1	PBMC	uSpA AS	28 21

Gene expression profiling reveals a downregulation in immune-associated genes in patients with AS (242).	NR4A2, TNFAIP3, CD69	PBMC	AS	18
Whole-blood Gene Expression Profiling in Ankylosing Spondylitis Shows Upregulation of Toll-like Receptor 4 and 5 (243).	TLR4, TLR5	WB	AS	16
Whole blood transcriptional profiling in ankylosing spondylitis identifies novel candidate genes that might contribute to the inflammatory and tissue-destructive disease aspects (244).	BCL11B, DNMT1, CDC25B, CLSTN1, VAMP5, DOCK10, SPARC/SPOCK2, ITGB7, MCM3, CX3CR1, PTPN1, EP300, PPP2R1A, CLEC4D	WB	AS	18
Gene expression in juvenile arthritis and spondyloarthritis: pro-angiogenic ELR ⁺ chemokine genes relate to course of arthritis (245).	STAT1, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL8	<u>PBMC</u> SFMC	jSpA	<u>6</u> 5
Subtype-specific peripheral blood gene expression profiles in recent onset juvenile idiopathic arthritis (246).	Hb α (HbA1/A2, HBA2) i β (HBB)	PBMC	ErA	28
Synovial fluid mononuclear cell gene expression profiling suggests dysregulation of innate immune genes in enthesitis-related arthritis patients (249).	Granzyme H, KLRF1, NKG7, KIR3DL3, CD1c, CD1d, CD244, CXCR3, CXCR7, CXCR16, CD248, FAIM3, CD163.	<u>PBMC</u> SFMC	ErA	<u>17</u> 7

Prema našim saznanjima, do sada nije provedeno istraživanje u kojem je analiziran genski izražaj u punoj krvi bolesnika s postavljenom dijagnozom jSpA-a prema ILAR-ovim klasifikacijskim kriterijima, koji su uz to imali određen HLA genotip i izračunat omjer vjerojatnosti za razvoj bolesti s obzirom na HLA antigene. Nadalje, zanimljivo je kako niti u jednom istraživanju nisu dobiveni isti rezultati, što bi moglo biti uzrokovano heterogenošću bolesnika koji su sudjelovali u istraživanjima, ali i činjenicom da su rezultati analize genskoga izražaja ovisni o stanicama iz kojih se analizira RNA, o čipovima na kojima se provodi analiza te o bioinformatičkim programima kojima se provodi analiza rezultata dobivenih na čipu. Stoga je vrlo važno da rezultati budu potvrđeni nekom drugom metodom u novoj skupini neličenih i liječenih bolesnika, kao i u skupini bolesnika s drugim oblikom kroničnog upalnog artritisa dječje dobi, što do sada nije učinjeno niti u jednom istraživanju.

2. HIPOTEZA

U djece s tek postavljenom dijagnozom juvenilnog spondiloartritisa postoje promjene genskoga izražaja koje utječu na pojavu bolesti.

3. CILJEVI

3.1. Opći cilj

Opći cilj ovog istraživanja je otkrivanje razlika u genskomu izražaju u punoj krvi neliječnih bolesnika s novopostavljenom dijagnozom juvenilnog spondiloartritisa.

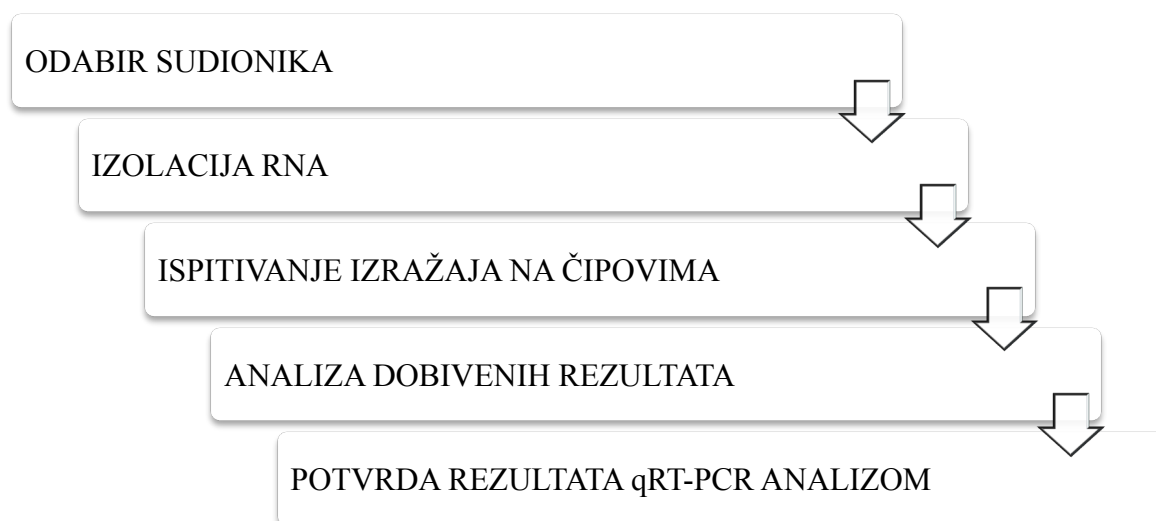
3.2. Specifični ciljevi

U specifične ciljeve istraživanja spada:

1. Potvrda izražaja odabranih gena neovisnom metodom u istoj skupini bolesnika u kojoj je učinjena analiza genskoga izražaja pomoću DNA čipova (neovisna potvrda dobivenih rezultata);
2. Potvrda izražaja odabranih gena neovisnom metodom u novoj skupini bolesnika s postavljenom dijagnozom juvenilnog spondiloartritisa (potvrda univerzalnosti dobivenih rezultata);
3. Potvrda razlika u izražaju odabranih gena neovisnom metodom u novoj skupini bolesnika s postavljenom dijagnozom druge bolesti iz iste skupine (potvrda specifičnosti dobivenih rezultata).

4. SUDIONICI I METODE

Shematski prikaz tijeka istraživanja prikazan je na slici 5.



Slika 5. Shematski prikaz tijeka istraživanja.

4.1. Odabir sudionika

Uzorci periferne krvi za analizu genskoga izražaja prikupljeni su u Ambulanti za reumatologiju Dječje bolnice Srebrnjak tijekom 2010. i 2011. godine od 45 djece s postavljenom dijagnozom nediferenciranog oblika jSpA-a te 11 djece s postavljenom dijagnozom oligoartikularnog ili poliartrikularnog oblika JIA-a. Za postavljanje dijagnoza korišteni su ILAR-ovi klasifikacijski kriteriji (tablica 2). Svim bolesnicima s postavljenom dijagnozom jSpA-a u sklopu standardne obrade učinjene su osnovne imunološke pretrage (ANA, RF) u Imunološkom laboratoriju Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb te HLA tipizacija u Zavodu za tipizaciju tkiva Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Ostale potrebne laboratorijske pretrage (KKS, CRP, SE, C3, C4, feritin) rađene su na Odjelu za kliničko-laboratorijsku dijagnostiku Dječje bolnice Srebrnjak.

Uzorci krvi 21 bolesnika prikupljeni su odmah nakon postavljanja dijagnoze jSpA, što je bilo 12-24 tjedana nakon pojave prvih simptoma bolesti. Spomenuti bolesnici bili su liječeni lijekovima iz skupine NSAIL, no najmanje 24 sata prije uzimanja uzorka nisu primali nikakve lijekove. Kod ostala 24 bolesnika s postavljenom dijagnozom juvenilnog spondiloartritisa

uzorci krvi prikupljeni su 24 ili više tjedana nakon pojave prvih simptoma bolesti. Kod navedenih bolesnika u sklopu standardne obrade učinjena je i MR kralježnice u Kliničkom zavodu za dijagnostičku i intervencijsku radiologiju Kliničkog bolničkog centra Sestre Milosrdnice, kojom je isključen razvoj jAS. Neki od tih bolesnika bili su liječeni lijekovima iz skupine DMARD-a i kortikosteroidima. Kod 11 bolesnika s postavljenom dijagnozom oligoartikularnog ili poliartrikularnog oblika JIA-a, koji su činili kontrolnu skupinu sudionika s postavljenom dijagnozom drugog oblika JIA-a, simptomi bolesti bili su prisutni duže od 24 tjedana u trenutku prikupljanja uzoraka krvi, a neki od navedenih bolesnika također su bili liječeni lijekovima iz skupine DMARD-a i kortikosteroidima.

Uzorci krvi prikupljeni su i od 12 djece koja su tijekom 2011. godine došla na kontrolni pregled nakon preboljele akutne infekcije donjeg dišnog sustava virusne etiologije u Pulmološku ambulantu Dječje bolnice Srebrnjak. Navedena djeca činila su kontrolnu skupinu zdravih sudionika, a prije uzimanja uzoraka krvi prikupljeni su anamnestički podaci kojima je isključena prisutnost kroničnih upalnih bolesti i stanja te su na Odjelu za kliničko-laboratorijsku dijagnostiku Dječje bolnice Srebrnjak učinjene laboratorijske pretrage (KKS, CRP, SE) kojima je isključena prisutnost akutne upalne bolesti.

Ispitivanje genskoga izražaja na DNA čipovima učinjeno je u skupini od 11 neliječanih bolesnika s jSpA-om kojima su uzorci krvi prikupljeni 12 – 24 tjedana nakon pojave prvih simptoma (B1) te u četvero djece iz kontrolne skupine zdravih sudionika (KZ1). Potvrda dobivenih rezultata qRT-PCR metodom učinjena je u istoj skupini od 11 bolesnika s jSpA-om kod kojih je učinjeno ispitivanje genskoga izražaja na DNA čipovima (B1), u novoj skupini od 10 neliječanih bolesnika s jSpA-om kod kojih su uzorci krvi prikupljeni 12 – 24 tjedana nakon pojave prvih simptoma (B2) te u skupini od 24 liječena bolesnika s jSpA-om kod kojih su uzorci krvi prikupljeni 24 ili više tjedna nakon pojave prvih simptoma (B3). Osim toga, qRT-PCR analiza učinjena je i u 11 bolesnika s oligoartikularnim ili poliartrikularnim oblikom JIA-a kojima su uzorci krvi prikupljeni 24 ili više tjedana nakon pojave prvih simptoma, a koji su činili kontrolnu skupinu bolesnika s postavljenom dijagnozom drugog oblika JIA-a (KB). Rezultati qRT-PCR analize svih bolesnika uspoređeni su s rezultatima u skupini od 12 djece koja su činila kontrolnu skupinu zdravih sudionika (KZ2). Demografske karakteristike, dijagnoza, provedene analize i HLA genotip sudionika istraživanja prikazani su u tablici 6.

Tablica 6. Demografske karakteristike, dijagnoza, provedene analize, terapija i HLA genotip sudionika istraživanja.

S	N (m/f)	Dob (g), (raspon)	DG	Analiza	Terapija	B7 (OR 2.61)	B27 (OR 5.69)	B7/B27 (OR 14.82)
B1	11 (6/5)	12,5 (5-17)	jSpA	DNA čip qRT-PCR	NSAIL	1	2	8
B2	10 (4/6)	13,6 (9-17)	jSpA	qRT-PCR	NSAIL	2	6	0
B3	24 (11/13)	13,5 (5-18)	jSpA	qRT-PCR	NSAIL DMARD KS	5	12	1
KB	11 (3/8)	12 (4-18)	JIA (oligo, poli)	qRT-PCR	NSAIL DMARD KS	/	/	/
KZ1	4 (1/3)	11,6 (9-16)	/	DNA čip qRT-PCR	/	/	/	/
KZ2	12 (6/6)	13,5 (5-19)	/	qRT-PCR	/	/	/	/

Skraćenice: S, skupina; N, broj sudionika; DG, dijagnoza; NSAIL, nesteroidni antiinflamatorni lijekovi; DMARD, antireumatski lijekovi koji utječu na tijek bolesti (engl. *disease-modifying antirheumatic drugs*); KS, kortikosteroidi; OR, omjer vjerojatnosti (engl. *odds ratio*).

Provođenje ovog istraživanja odobrilo je Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te Etičko povjerenstvo Dječje bolnice Srebrnjak, a roditelji svih sudionika istraživanja prije uzimanja uzoraka krvi potpisali su unaprijed pripremljeni informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju. Uz roditelje, informirani pristanak potpisala su i sva djeca starija od 12 godina.

4.2. Izolacija RNA

Svim sudionicima istraživanja uzeto je ukupno 7,5ml venske krvi pomoću tri PAXgene™ epruvete za stabilizaciju ukupne RNA iz pune krvi (3x2,5mL=7,5mL). Svi uzorci krvi uzeti su u jutarnjim satima te su u vremenskom razdoblju od 24 sata nakon vađenja dostavljeni na Odjel za funkcionalnu genomiku Centra za translacijska i klinička istraživanja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, gdje su do pristupanja izolaciji RNA bili pohranjene na -80°C. Sve epruvete bile su označene tako da je identitet sudionika istraživanja bio poznat jedino autoru istraživanja.

Ukupna RNA izolirana je iz pune krvi uz primjenu RNA kita za izolaciju RNA (PaxGene, Preanalytix). Svi uzorci tretirani su DNA-zom (RNase-free DNase set, Qiagen). Koncentracija dobivene RNA određena je mjerenjem apsorbancije razrijeđenog uzorka pri valnoj duljini od 260nm na spektrofotometru BioPhotometer (Eppendorf), a kvaliteta izolirane RNA određena je uporabom RNA 6000 Nano LabChip kita na 2100 Bioanalyzeru (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

4.3. Ispitivanje genskoga izražaja na DNA čipovima

Genski izražaj analiziran je pomoću DNA čipa za analizu cjelokupnog ljudskog genoma (Human Genome U133 PLUS 2.0 GeneChip®, Affymetrix) koji sadrži 54 675 25-baznih proba. Analiza izražaja provedena je prema standardiziranom protokolu iz Affymetrixovog tehničkog priručnika, koji je detaljnije opisan u uvodu (poglavlje 1.8.3.). Sam protokol započeo je označavanjem ciljnih molekula u jednom ciklusu, pri čemu je iz visoko kvalitetne RNA sintetizirana cDNA koja je pročišćena i *in vitro* prepisana u biotinom označenu cRNA. Dobivena biotinilirana cRNA, zajedno s hibridizacijskim koktelom, stavljena je u čip koji je nakon toga ostavljen u hibridizacijskoj peći (*GeneChip® hybridization oven*). Čipovi su se nakon vađenja iz peći isprali i obojali streptavidin fikoeritinom u automatiziranoj stanici (*GeneChip® Fluidics station*), a nakon toga su očitani na stroju za očitavanje (*GeneChip® Scanner 3000*). Analiza podataka dobivenih očitanjem čipova provedena je korištenjem programa GCOS te statističkih programa S-plus i R. Normalizacija je provedena preračunavanjem pomoću MAS5 postupnika, prilikom čega je vrijednost intenziteta skupova proba sa svih čipova postavljena na ciljnu vrijednost od 100. Za stvaranje liste gena koji su u skupini bolesnika pokazali statistički značajnu razliku u izražaju u odnosu na kontrolnu skupinu, korišteni su sljedeći paramteri: vrijednost intenziteta odgovarajućeg skupa proba >100 na najmanje jednom čipu, omjer izražaja >1,5 ili <0,66, p-vrijednost manja od odabrane razine značajnosti (α) koja je postavljena na 0,05 ($p < 0.05$). Svi genski čipovi obrađeni su na Odjelu za funkcionalnu genomiku Centra za translacijska i klinička istraživanja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

4.4. Hijerarhijsko grupiranje gena

Hijerarhijsko grupiranje (engl. *hierarchical clustering*) gena koji su pokazali razliku u izražaju provedeno je pomoću programa DChip. Hijerarhijsko grupiranje prikazuje se kao drvo odnosno dendogram, pri čemu dužina grane predstavlja stupanj sličnosti među genima,

a najčešće se koristi za prikaz genskoga izražaja različitih bolesnika i zdravih kontrola. Pritom su na jednoj osi grupirani bolesnici i kontrole, a na drugoj geni, te se tako stvara “toplinska mapa” (engl. *heatmap*) u kojoj su grupe gena s najvećim izražajem predstavljene svjetlocrvenom bojom, a one s najmanjim izražajem svjetlozelenom.

4.5. Analiza zastupljenosti termina genske ontologije

Geni koji su u bolesnika s jSpA-om pokazali statistički značajnu razliku u izražaju obilježeni su u skladu s pravilima definiranim projektom genske ontologije. Samo obilježavanje, kao i statistička analiza termina genske ontologije povezanih s odabranim genima, provedeno je korištenjem bioinformatičkog paketa DAVID (engl. *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) (250). Spomenuti paket sastoji se od alata za imenovanje odabranih gena (engl. *Gene Name Batch Viewer*), alata za svrstavanje odabranih gena u funkcionalno povezane skupine (engl. *Gene Functional Classification*), alata za računanje zastupljenosti termina povezanih s odabranim genima (engl. *Functional Annotation Chart*), alata za grupiranje funkcionalno sličnih termina povezanih s odabranim genima (engl. *Functional Annotation Clustering*) te alata za pretraživanje termina povezanih s odabranim genima (engl. *Functional Annotation Table*). Zastupljenost svakog termina na listi gena koji su pokazali povećan izražaj te na listi gena koji su pokazali smanjen izražaj izračunata je u odnosu na zastupljenost istog termina na listi svih gena koji se nalaze na čipu. Poredak grupa funkcionalno sličnih termina stvoren je na temelju sume zastupljenosti (engl. *enrichment score*) svih termina iz grupe na listi gena koji su pokazali povećan izražaj te na listi gena koji su pokazali smanjen izražaj.

4.6. Analiza zastupljenosti skupina gena

Analiza zastupljenosti skupina gena provedena je pomoću programa GSEA 1.0 (engl. *Gene set enrichment analysis*) i >1 325 predefinirane skupine gena (251). Skupine gena korištene u ovom programu definirane su na temelju biološke funkcije, položaja na kromosomu ili regulacije. U ovoj analizi svi geni s intenzitetom većim od intenziteta pozadine poredani su na listu (L) ovisno o razlikama koje su pokazali u izražaju, tako da su geni s najvećim razlikama u izražaju na vrhu, a oni s najmanjim na dnu liste. Analizom zastupljenosti skupina gena određuje se nalaze li se geni iz određene predefinirane skupine (S) bliže vrhu ili dnu liste, pri čemu se koriste složene statističke metode. Prvo se računa suma zastupljenosti (engl. *enrichment score*, ES), koja odražava zastupljenost gena iz skupine S na vrhu ili dnu liste, a

zatim nominalna p-vrijednost (engl. *nominal p-value*), kojom se procjenjuje statistički značaj stupnja zastupljenosti za svaku pojedinačnu skupinu gena. Nakon toga suma zastupljenosti se normalizira ovisno o veličini skupine i dobiva se normalizirana suma zastupljenosti (engl. *normalized enrichment score*, NES). Naposljetku se računa FDR kojim se procjenjuje vjerojatnost da je normalizirani stupanj zastupljenosti za određenu skupinu gena lažan. Na taj način dobije se lista u kojoj su skupine gena poredane prema njihovoj zastupljenosti među ispitivanim genima.

4.7. Analiza puteva i mreža

Za analizu puteva i mreža korišten je sveobuhvatni programski paket IPA v.7.6 (engl. *Ingenuity Pathway Analysis*). Svi programi u ovom paketu koriste opsežnu bazu podataka (engl. *Ingenuity® Knowledge Base*) koja je repozitorij bioloških međudjelovanja i funkcionalnih obilježja stvorenih na temelju milijuna pojedinačno oblikovanih veza između proteina, gena, kompleksa, stanica, tkiva, lijekova i bolesti. Informacije sadržane u ovoj bazi strukturirane su pomoću *Ingenuity* ontologije, koja prevodi i integrira skupljene informacije tako da se mogu koristiti prilikom stvaranja međusobnih veza i izvođenja zaključaka. Izvori informacija su radovi objavljeni u vodećim časopisima koje su pregledali i prema zadanim postupnicima prilagodili znanstvenici zaposleni u tvrtki (engl. *Ingenuity® Expert Findings*), sažeci radova objavljeni u različitim časopisima koji su ručno pregledani i automatski prilagođeni prema zadanim postupnicima (engl. *Ingenuity® Expert Assist Findings*), zatim putevi i veze koje su stvorili znanstvenici iz tvrtke (engl. *Ingenuity® Expert Knowledge*) te druge baze podataka (engl. *Ingenuity® Supported Third Party Information*). Funkcionalna analiza gena koji su u bolesnika s jSpA-om pokazali razliku u izražaju provedena je pomoću programa IPA Core Analysis. Uneseni geni uspoređeni su s genima iz baze podataka (engl. *Ingenuity Knowledge Base – Genes only*). Sama analiza temelji se na povezanosti gena s 85 funkcionalnih kategorija iz baze podataka koje se mogu podijeliti u tri primarne kategorije: funkcije molekula i stanica, funkcije i razvoj fizioloških sustava te bolesti i poremećaji. Prilikom provođenja analize računa se p-vrijednost koja pokazuje vjerojatnost da je povezanost gena i određene funkcionalne kategorije slučajna. Spomenuta p-vrijednost računa se na temelju broja unesenih gena povezanih s određenom funkcionalnom kategorijom i na temelju ukupnog broja gena koji su u bazi podataka povezani s tom kategorijom. Na temelju negativnog logaritma p-vrijednosti stvara se rang lista funkcionalnih kategorija najznačajnije povezanih s unesenim genima. Osim toga, pomoću ovog programa stvorene su i funkcionalne

mreže u kojima su prikazane međusobne veze unesenih gena. Kao predložak za stvaranje takvih mreža koristi se velika mreža (engl. *Global Molecular Network*), stvorena na temelju informacija o međudjelovanju mnoštva različitih gena i genskih produkata sadržanih u bazi podataka. Svi geni u toj mreži međusobno su povezani, tako da se može otkriti veza između bilo koja dva nasumično odabrana gena. Prilikom stvaranja manjih mreža, koristi se složeni postupnik (engl. *IPA network generation algorithm*), kojim se odabiru uneseni geni s najvećim brojem veza u velikoj mreži, zbog čega se u stvorenim mrežama prikazuje najveći mogući broj veza između unesenih gena. U slučaju da se uneseni geni u stvorenoj mreži ne mogu izravno povezati, povezuju se preko gena koji im se u velikoj mreži nalaze u susjedstvu. Kako bi se mogle lakše interpretirati, u svakoj stvorenoj mreži nalazi se maksimalno 35 gena. Na temelju p-vrijednosti, koja pokazuje vjerojatnost da se geni iz stvorene mreže nađu u nasumično odabranom skupu gena iz velike mreže, računa se p-uspjeh (engl. *p-score*) koji pak služi za rangiranje stvorenih mreža. Na kraju se stvorene mreže na temelju povezanosti gena prikazanih u mreži s različitim funkcionalnim kategorijama i same povezuju s različitim funkcionalnim kategorijama.

4.8. Odabir gena za potvrdu rezultata neovisnom metodom

Geni za potvrdu rezultata dobivenih analizom genskoga izražaja na DNA čipu drugom neovisnom metodom u skupini bolesnika kod kojih je učinjena analiza genskoga izražaja na DNA čipu, u novim skupinama neliječenih i liječenih bolesnika s postavljenom dijagnozom ErA-a te u skupini bolesnika s postavljenom dijagnozom oligoartikularnog ili poliartrikularnog oblika JIA-a, odabrani su prvenstveno na temelju rezultata analize genskoga izražaja na čipu. Pri tome su prvo izdvojeni svi geni koji su zadovoljili odabrane parametre ($p < 0,05$, vrijednost intenziteta > 100 , omjer izražaja $> 1,5$ ili $< 0,66$). Za izdvojene gene, kao i za gene usko povezane s izdvojenim genima, ručno je pretražena PUBMED/MEDLINE baza podataka kako bi se pronašla dosad provedena istraživanja u kojima se navedeni geni spominju. S obzirom na ulogu navedenih gena u kroničnim upalnim bolestima te u različitim signalnim putevima, stvorena je lista gena s potencijalno važnom ulogom u patofiziologiji jSpA-a, s time da su prednost pri odabiru imali geni čiji izražaj kod bolesnika s jSpA-om do sada nije ispitan. Konačnom odabiru gena za potvrdu rezultata analize genskoga izražaja na DNA čipu značajno su pridonijeli i rezultati analize zastupljenosti termina genske ontologije, analize zastupljenosti skupina gena te analize mreža i puteva. Shematski prikaz odabira gena prikazan je na slici 6.



Slika 6. Shematski prikaz postupka odabira gena za potvrdu rezultata.

4.9. Potvrda rezultata qRT-PCR analizom

qRT-PCR analiza deset odabranih gena učinjena je svim sudionicima istraživanja (56 bolesnika i 12 zdravih kontrola). Za analizu je 2 µg ukupne RNA visoke kvalitete dobivene iz pune krvi reverzno prepisano uporabom SuperScript™ First-Strand Synthesis sustava za reverznu transkripciju prema postupniku proizvođača (Invitrogen). Izražaj odabranih gena mjereno je pomoću LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green kita (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) uz uporabu LightCycler instrumenta (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Pri analizi su korištene početnice prikazane u tablici 7. Za relativnu kvantifikaciju genskoga izražaja upotrijebljena je $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metoda, a za normalizaciju rezultata korišten je domaćinski gen β -actin. Analiza je provedena na Odjelu za funkcionalnu genomiku Centra za translacijska i klinička istraživanja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Tablica 7. Početnice korištene za qRT-PCR analizu izražaja odabranih gena.

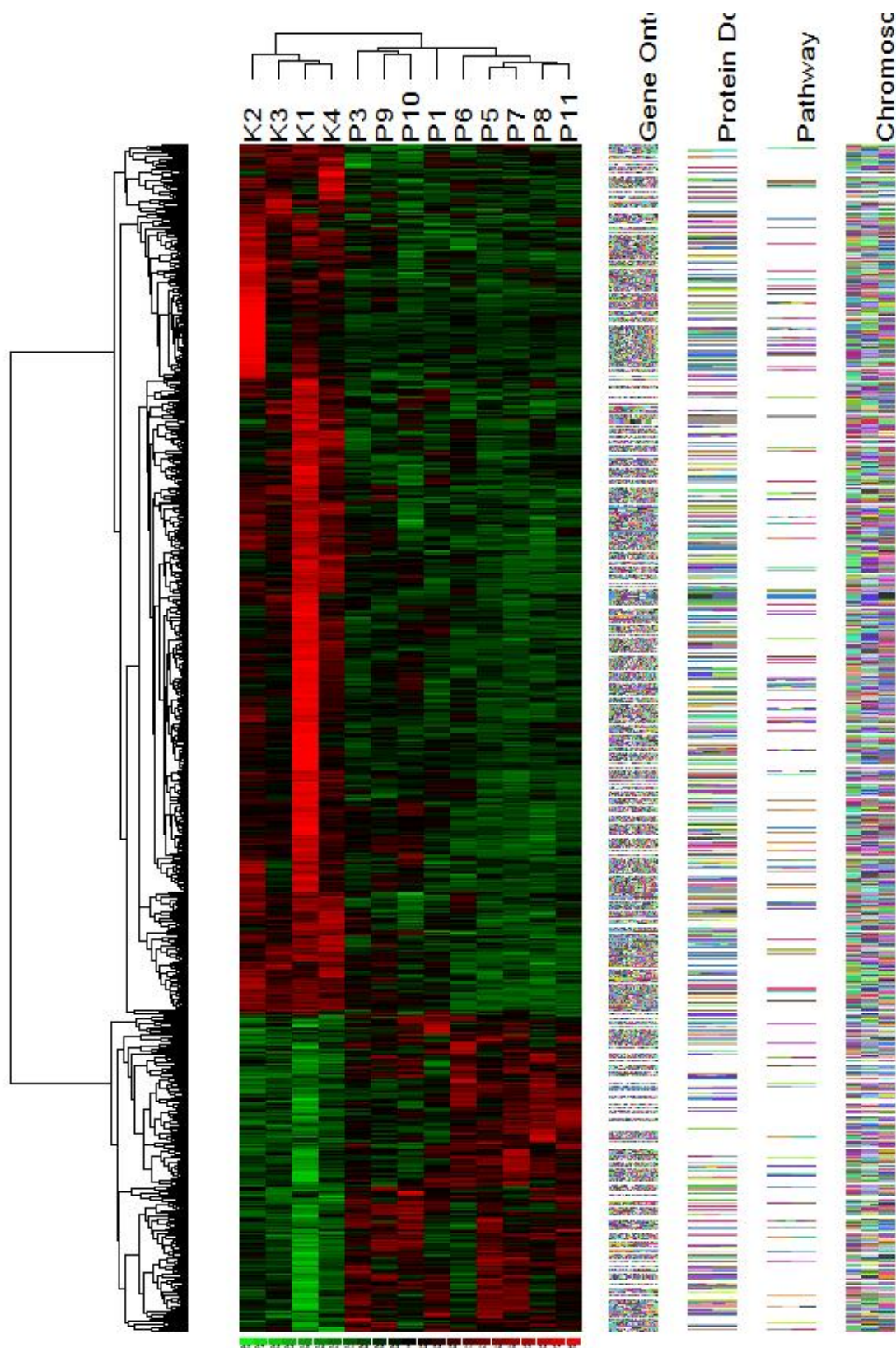
GEN	Prema naprijed (engl. <i>forward</i>)	Prema natrag (engl. <i>reverse</i>)
TLR4	ATGCTGCCGTTTTATCACGGA	CTAAACTCTGGATGGGGTTTCC
NLRP3	GAGGCACAGACAGACCCAGT	AACAGAGCTTGGTGGGTGAG
PTPRN2	GCTCCAAAACCAGATGCCTG	GGTCCGAGAACCTCTCTGTCT
CXCR4	TGCCCACCATCTACTCCATCA	AGGATGACCAATCCATTGCCC
TNFSF4	TGCTCTTCAGGTATCACATCGG	ATGACTGAGTTGTTCTGCACC
DUSP6	AGCTCAATCTGTCTGATGAACG	GCGTCCTCTCGAAGTCCAG
MAP2K2	CCAAGGTCGGCGAACTCAAA	TCTCAAGGTGGATCAGCTTCC
MAPKBP1	AAGGGTTTCTCGTCATAATGGC	CGGTTTCCTGCCTTACTCCTG
MYST3	TCACCAGCAGTTACGATTGGC	CATCCACGTTGGTTGCTTTAGT
PTPN12	CCCAGCGGGAGGTATTCACTATG	GATCTCTTGGTCCTTTGGGTTTTTC
β-ACTIN	TCCCTGGAGAAGAGCTACGA	AGGAAGGAAGGCTGGAAGAG

5. REZULTATI

5.1. Rezultati ispitivanja genskoga izražaja na DNA čipovima

U sklopu istraživanja na DNA čipovima ispitani su uzorci prikupljeni od 11 neliječenih bolesnika u kojih je dijagnoza nediferenciranog oblika jSpA-a postavljena 12 – 24 tjedana nakon pojave prvih simptoma (B1) te uzorci prikupljeni od četvero djece iz kontrolne skupine zdravih sudionika (KZ1). Demografske karakteristike i HLA genotip ispitanika kojima je učinjena analiza genskoga izražaja na DNA čipu prikazani su u tablici 6.

Ispitivanje na Affymetrixovim genskim čipovima, uz odabrane parametre ($p < 0,05$, vrijednost intenziteta > 100 , omjer izražaja $> 1,5$ ili $< 0,66$), pokazalo je da u bolesnika s postavljenom dijagnozom jSpA-a postoji razlika u izražaju 745 gena u odnosu na kontrolnu skupinu. Od toga je 197 gena pokazalo povišenu razinu izražaja, dok je 548 gena imalo smanjenu razinu izražaja. Na slici 7 prikazano je hijerarhijsko grupiranje gena koji su pokazali razliku u izražaju.



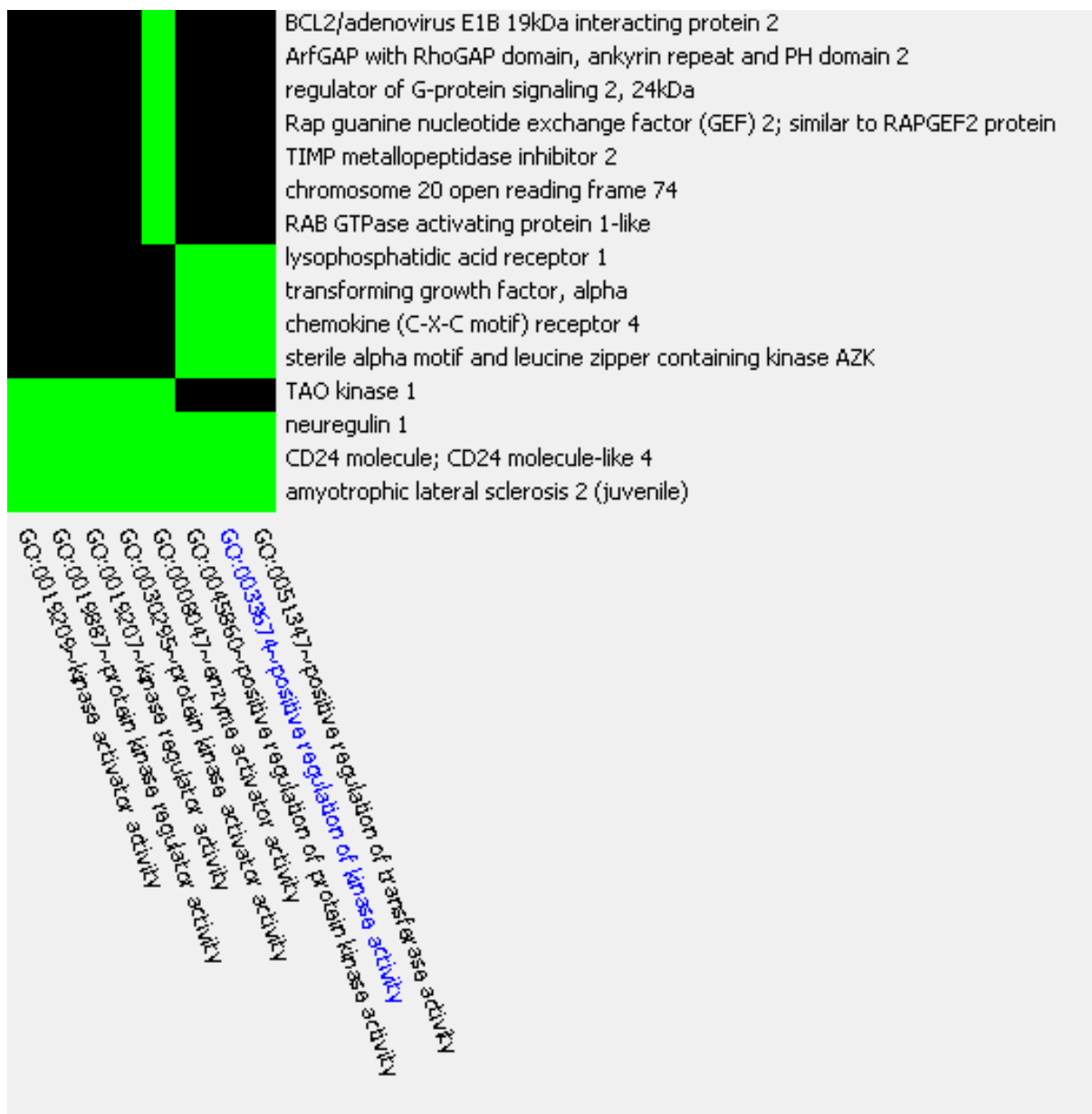
Slika 7. Hijerarhijsko grupiranje gena koji su pokazali razliku u izražaju u skladu s odabranim parametrima ($p < 0,05$, vrijednost intenziteta > 100 , omjer izražaja $> 1,5$ ili $< 0,66$). Svaki stupac predstavlja uzorak (K1 – K4 je kontrolna skupina, a P1 – P11 su odabrani bolesnici s jSpA-om), dok svaki red predstavlja gen. Crvena boja predstavlja povišen izražaj, a zelena snižen.

5.2. Rezultati analize zastupljenosti termina genske ontologije

Analiza zastupljenosti termina genske ontologije u skupni gena koji su u bolesnika s jSpA-om pokazali statistički značajno povećan izražaj pokazala je znatnu zastupljenost termina koji opisuju biološke procese poput alternativnog izrezivanja, aktivacije proteinskih kinaza, apoptoze i stanične smrti te termina koji opisuju stanične komponente poput vakuole i lizosoma. U skupini gena koji su pokazali snižen izražaj analiza je pokazala značajnu zastupljenost termina genske ontologije koji opisuju biološke procese poput acetilacije, staničnog ciklusa i metaboličkih procesa u kojima sudjeluje DNA, termina koji opisuju molekularne funkcije poput vezivanja nukleotida i fosfoproteina te termina koji opisuju *Zinc finger* motiv.

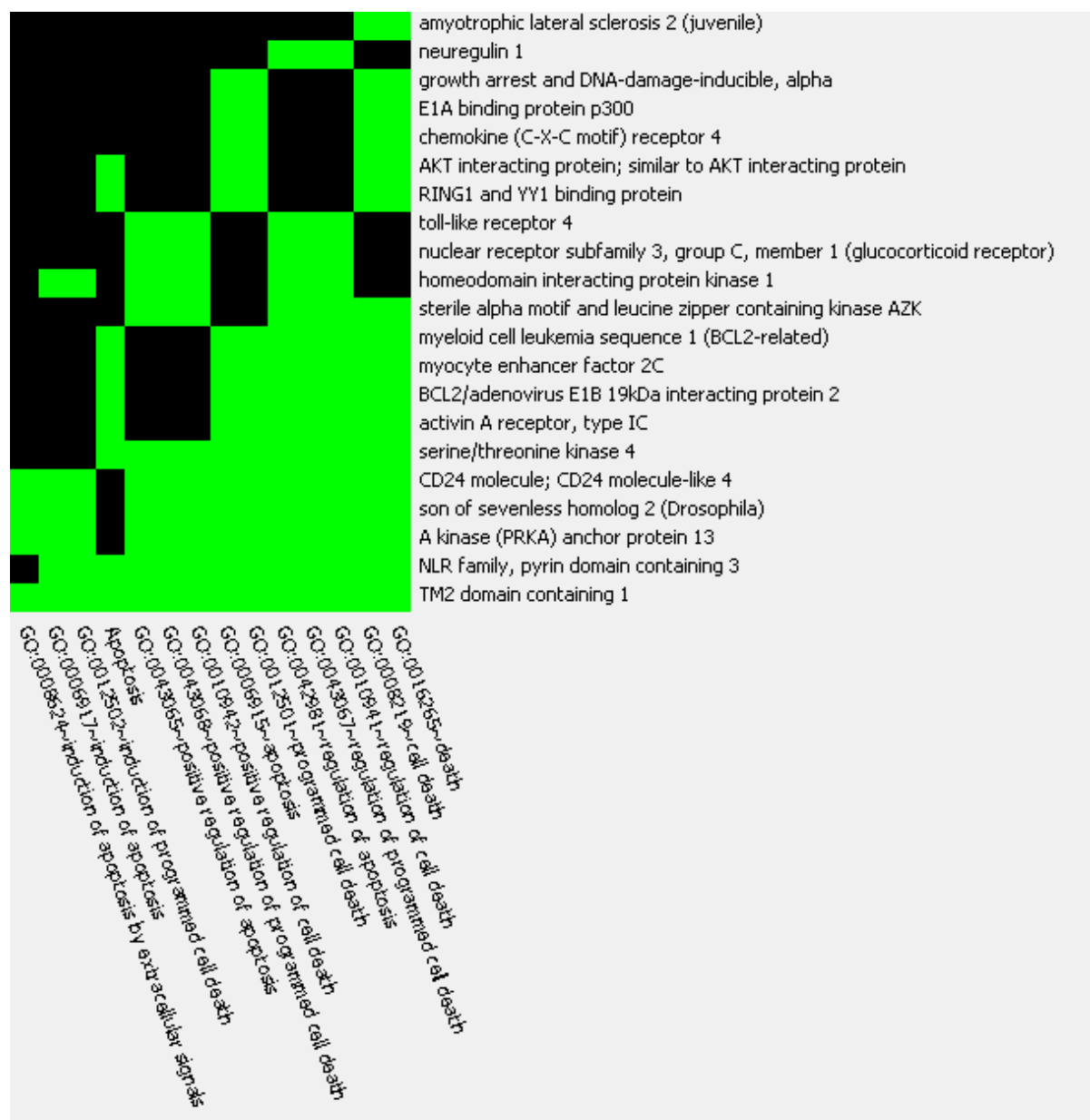
Grupiranjem funkcionalno sličnih termina genske ontologije zastupljenih na listi gena koji su pokazali povećan izražaj stvorene su 4 grupe funkcionalno sličnih termina sa sumom zastupljenosti većom od 1,5, dok je grupiranjem funkcionalno sličnih termina zastupljenih na listi gena koji su pokazali smanjen izražaj stvoreno 10 grupa funkcionalno sličnih termina sa sumom zastupljenosti većom od 3.

U prvoj grupi funkcionalno sličnih termina značajno zastupljenoj na listi gena koji su u bolesnika s jSpA-om pokazali povećan izražaj prevladavali su termini genske ontologije koji opisuju biološke procese povezane s aktivacijom protein kinaze. Na slici 8. prikazani su funkcionalno slični termini i geni koje obilježavaju, među kojima se nalazi i CXCR4 gen, korišten za potvrdu rezultata qRT-PCR metodom.



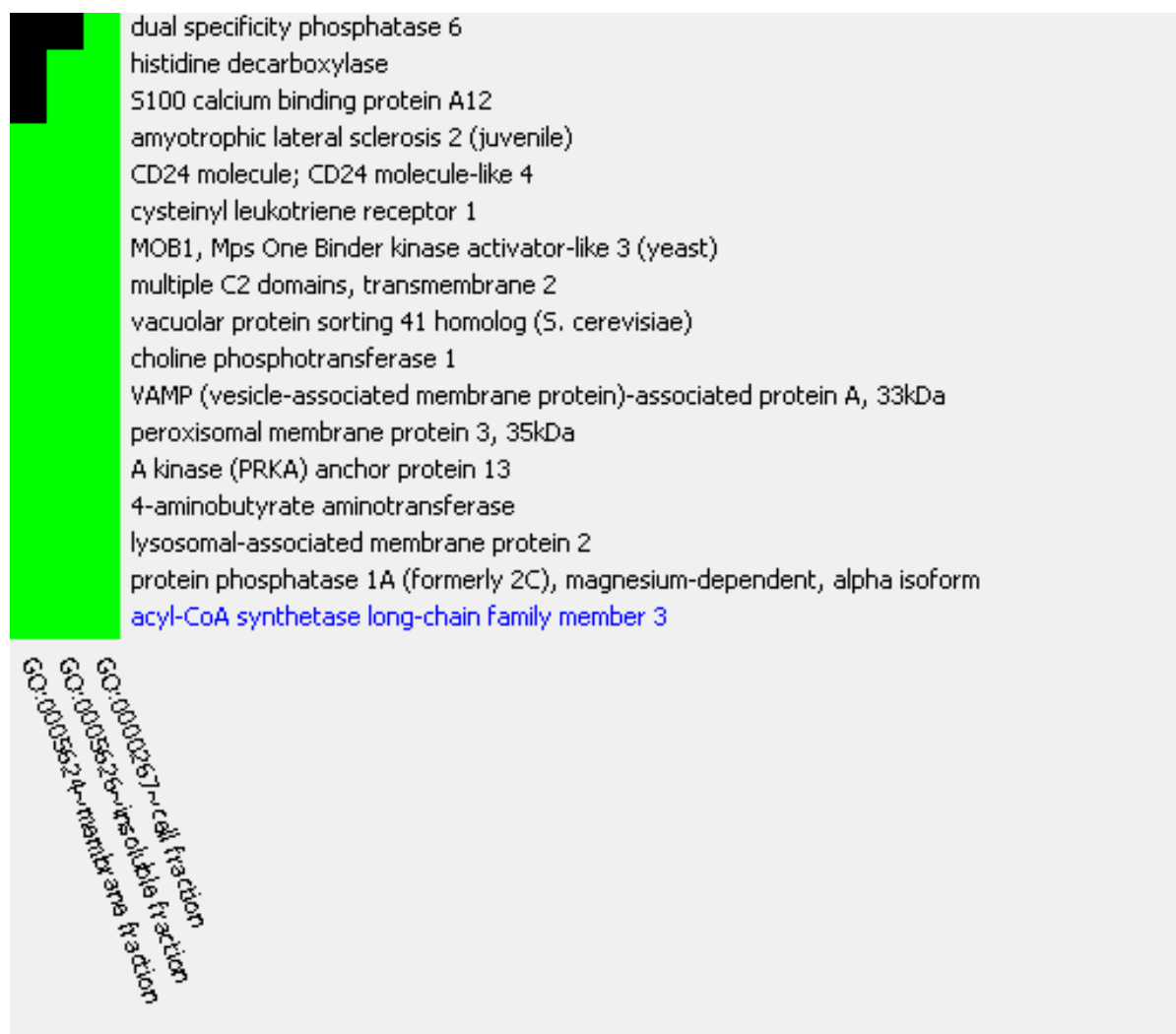
Slika 8. Prva grupa funkcionalno sličnih termina genske ontologije zastupljena na listi gena koji su pokazali povećan izražaj u bolesnika s jSpA-om te odgovarajući geni koje obilježavaju.

U drugoj grupi funkcionalno sličnih termina značajno zastupljenoj na listi gena koji su pokazali povećan izražaj u bolesnika s jSpA-om nalazili su se termini koji opisuju biološke procese povezane sa staničnom smrću. Na slici 9. prikazani su funkcionalno slični termini i geni koje obilježavaju, među kojima se nalaze geni CXCR4, TLR4 i NLRP3, korišteni za potvrdu rezultata qRT-PCR metodom.



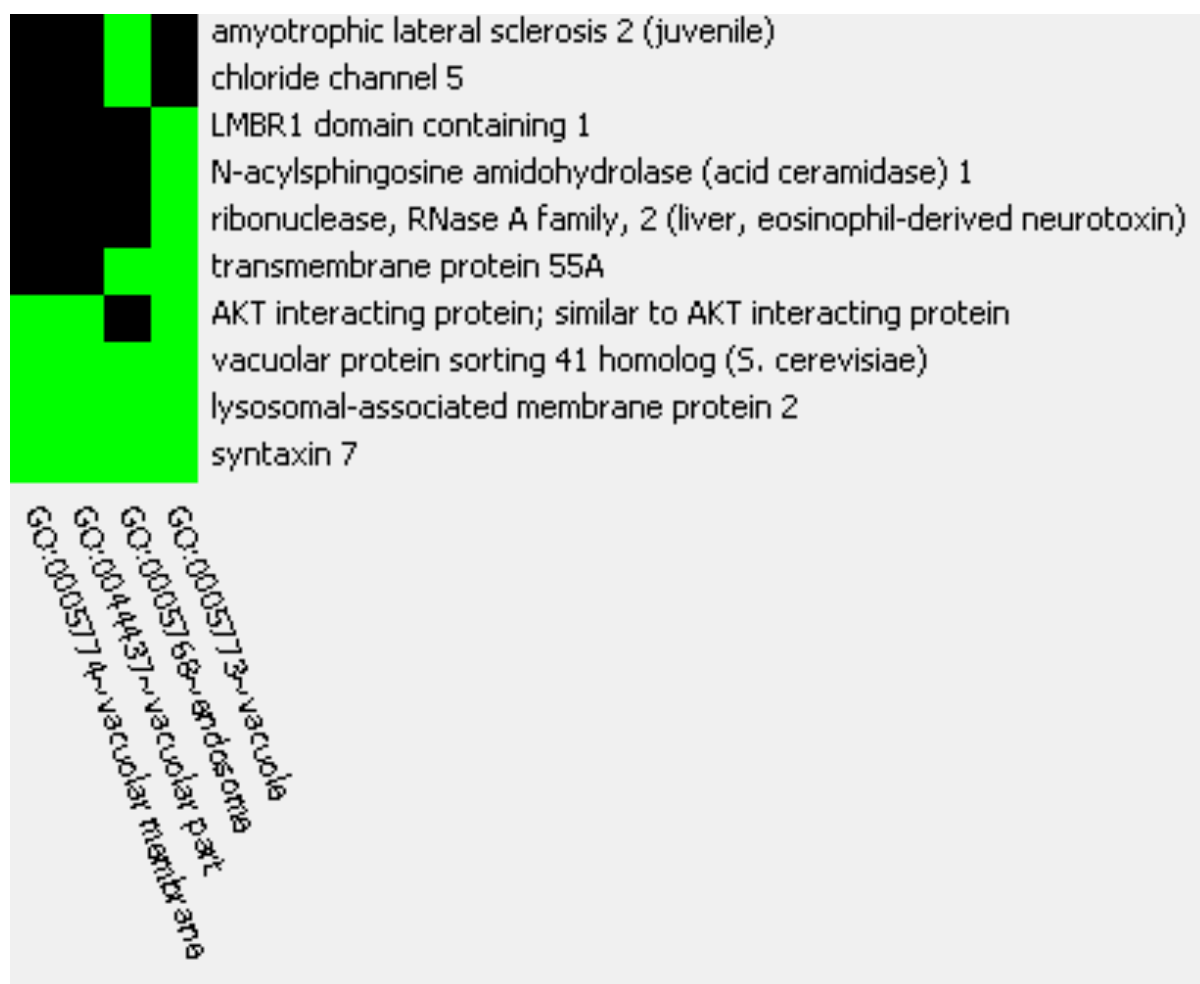
Slika 9. Druga grupa funkcionalno sličnih termina zastupljena na listi gena koji su pokazali povećan izražaj u bolesnika s jSpA-om te odgovarajući geni koje obilježavaju.

U trećoj grupi funkcionalno sličnih termina značajno zastupljenoj na listi gena koji su pokazali povećan izražaj u bolesnika s jSpA-om bili su termini genske ontologije koji opisuju stanične komponente poput različitih frakcija stanice. Na slici 10. prikazani su funkcionalno slični termini i geni koje obilježavaju, među kojima se nalazi i DUSP6 gen, korišten za potvrdu rezultata qRT-PCR metodom.



Slika 10. Treća grupa funkcionalno sličnih termina genske ontologije zastupljena na listi gena koji su pokazali povećan izražaj u bolesnika s jSpA-om te odgovarajući geni koje termini obilježavaju.

U četvrtoj grupi funkcionalno sličnih termina zastupljenoj na listi gena koji su pokazali povećan izražaj u bolesnika s jSpA-om bili su termini genske ontologije koji opisuju stanične komponente poput vakuole, vakuolarne membrane i endosoma. Prikaz funkcionalno sličnih termina iz četvrte skupine te gena koje obilježavaju može se vidjeti na slici 11.



Slika 11. Četvrta grupa funkcionalno sličnih termina genske ontologije zastupljena na listi gena koji su pokazali povećan izražaj u bolesnika s jSpA-om te odgovarajući geni koje obilježavaju.

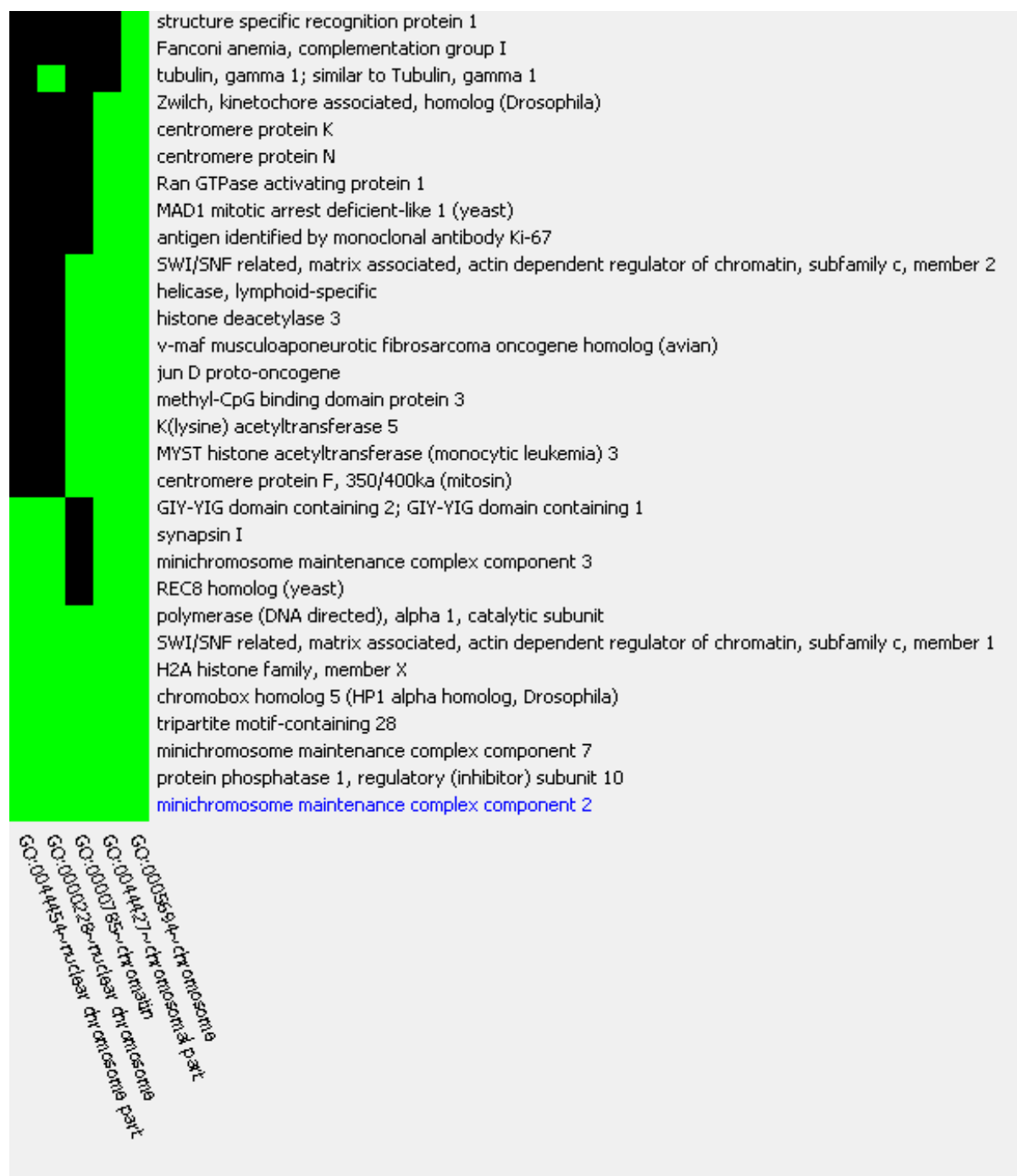
U prvoj grupi funkcionalno sličnih termina značajno zastupljenoj na listi gena koji su u bolesnika s jSpA-om pokazali smanjen izražaj prevladavali su termini genske ontologije koji opisuju stanične komponente poput različitih lumena unutar stanice i njezinih organela. Na slici 12. prikazani su funkcionalno slični termini i geni koje obilježavaju, među kojima se nalazi gen MYST3, korišten za potvrdu rezultata qRT-PCR metodom.

	protein disulfide isomerase family A, member 4
	calumenin
	mitochondrial ribosomal protein L52
	acyl-CoA synthetase short-chain family member 1
	KIAA1967
	mitochondrial ribosomal protein S18A
	voltage-dependent anion channel 1; similar to voltage-dependent anion channel 1
	CD4 molecule
	protein disulfide isomerase family A, member 6
	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, delta subunit
	coenzyme Q3 homolog, methyltransferase (<i>S. cerevisiae</i>)
	mitochondrial ribosomal protein L12
	calreticulin
	mitochondrial ribosomal protein S12
	mitochondrial ribosomal protein S9
	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 28
	peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B)
	complement component 1, q subcomponent binding protein
	translocase of inner mitochondrial membrane 44 homolog (yeast)
	glutamic-oxaloacetic transaminase 2, mitochondrial (aspartate aminotransferase 2)
	prolyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial (putative)
	splicing factor proline/glutamine-rich (polypyrimidine tract binding protein associated)
	interleukin enhancer binding factor 3, 90kDa
	exosome component 7
	RNA binding motif protein 22
	exosome component 1
	nucleolar complex associated 2 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 56
	centromere protein F, 350/400ka (mitosin)
	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67
	cytochrome b-561
	arachidonate 5-lipoxygenase
	heat shock transcription factor 1
	ceramide kinase-like
	SAP30-like
	zinc finger protein 687
	INO80 complex subunit B
	nucleolar and spindle associated protein 1
	tRNA splicing endonuclease 15 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
	TPX2, microtubule-associated, homolog (<i>Xenopus laevis</i>)
	DAZ associated protein 1
	death effector domain containing
	RAD9 homolog A (<i>S. pombe</i>)
	splicing factor, arginine/serine-rich 15
	structure specific recognition protein 1
	minichromosome maintenance complex component 3
	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R
	Fanconi anemia, complementation group I

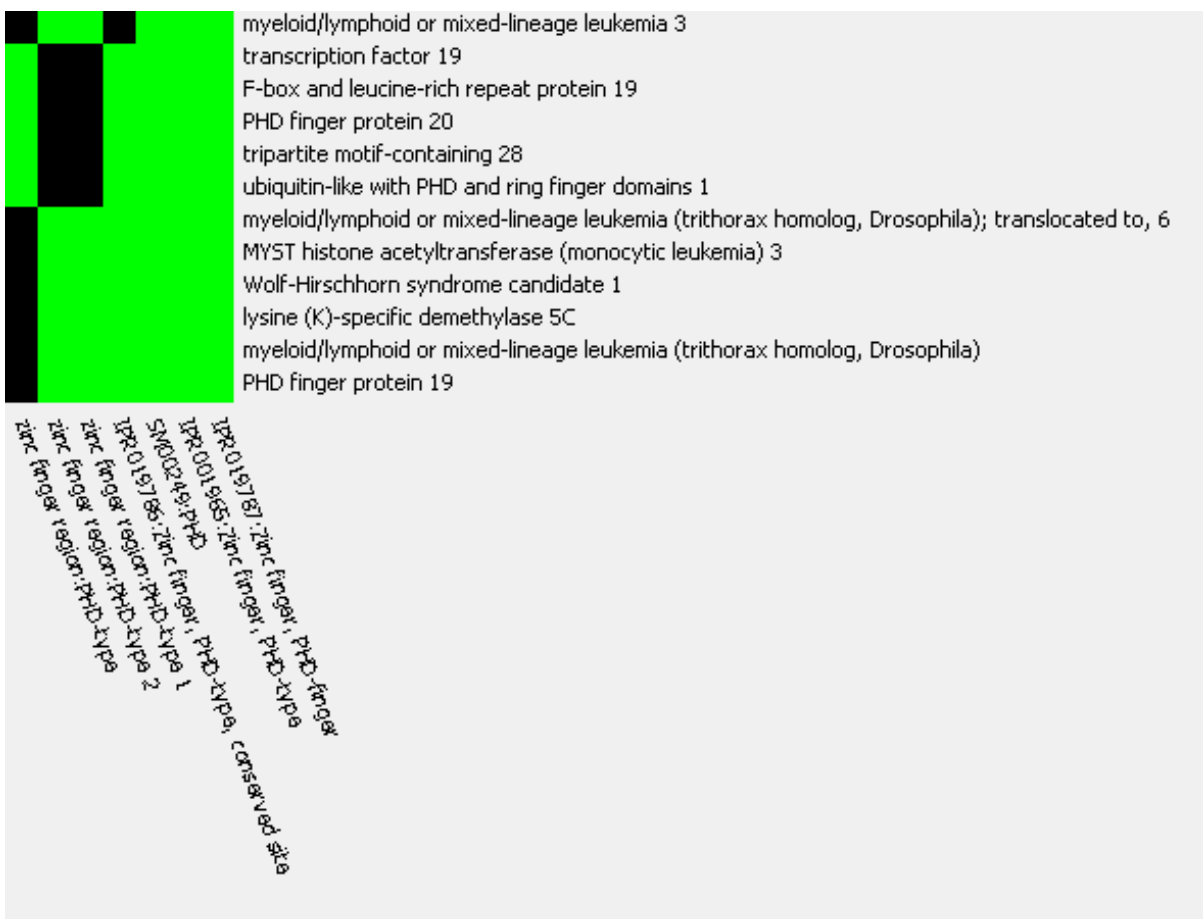
	cold inducible RNA binding protein
	minichromosome maintenance complex component 5
	ribosomal protein S6 kinase, 70kDa, polypeptide 2
	minichromosome maintenance complex component 2
	upstream binding transcription factor, RNA polymerase I
	ubiquitin-conjugating enzyme E2C
	polymerase (DNA directed), alpha 1, catalytic subunit
	XPA binding protein 2
	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily c, member 1
	cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)
	H2A histone family, member X
	tripartite motif-containing 28
	La ribonucleoprotein domain family, member 7
	cell division cycle 27 homolog (S. cerevisiae)
	POU class 2 homeobox 1
	RuvB-like 1 (E. coli)
	transformation/transcription domain-associated protein
	mediator complex subunit 24
	histone deacetylase 3
	protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isoform
	large subunit GTPase 1 homolog (S. cerevisiae)
	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide D, 44kDa
	methyl-CpG binding domain protein 3
	K(lysine) acetyltransferase 5
	minichromosome maintenance complex component 7
	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)
	E2F transcription factor 4, p107/p130-binding
	peptidylprolyl isomerase G (cyclophilin G)
	SUB1 homolog (S. cerevisiae)
	PCF11, cleavage and polyadenylation factor subunit, homolog (S. cerevisiae)
	similar to RNA binding motif protein 39; RNA binding motif protein 39
	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila)
	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily c, member 2
	nuclear receptor co-repressor 1
	cleavage and polyadenylation specific factor 1, 160kDa
	pyrin and HIN domain family, member 1
	general transcription factor IIIC, polypeptide 1, alpha 220kDa
	integrator complex subunit 1
	chromobox homolog 5 (HP1 alpha homolog, Drosophila)
	elongation factor, RNA polymerase II, 2
	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide E, 25kDa
	pre-B-cell leukemia homeobox 2
	MYST histone acetyltransferase (monocytic leukemia) 3
GO:0007001	intracellular or cellular
GO:0031974	transmembrane-anchored
GO:0043233	organelle lumen
GO:0031981	nuclear lumen
GO:0005554	nucleoplasm
GO:0044451	nucleoplasm part

Slika 12. Prva grupa funkcionalno sličnih termina genske ontologije zastupljena na listi gena koji su u bolesnika s jSpA-om pokazali smanjen izražaj te odgovarajući geni koje obilježavaju.

U drugoj grupi funkcionalno sličnih termina značajno zastupljenoj na listi gena koji su u bolesnika s jSpA-om pokazali smanjen izražaj prevladavali su termini genske ontologije koji opisuju stanične komponente povezane s kromosomima i kromatinom. Na slici 13. prikazani su funkcionalno slični termini i geni koje obilježavaju, među kojima se nalazi gen MYST3, korišten za potvrdu rezultata qRT-PCR metodom.



Slika 13. Druga grupa funkcionalno sličnih termina genske ontologije zastupljena na listi gena koji su u bolesnika s jSpA-om pokazali smanjen izražaj te odgovarajući geni koje obilježavaju.





Slika 15. Četvrta grupa funkcionalno sličnih termina zastupljena na listi gena koji su u bolesnika s jSpA-om pokazali smanjen izražaj te odgovarajući geni koje obilježavaju.

U petoj grupi funkcionalno sličnih termina značajno zastupljenoj na listi gena koji su u bolesnika s jSpA-om pokazali smanjen izražaj, prevladavali su termini povezani s organizacijom, modifikacijom i regulacijom kromatina. Na slici 16. prikazani su funkcionalno slični termini i geni koje obilježavaju, među kojima se nalazi gen MYST3, korišten za potvrdu rezultata qRT-PCR metodom.



Slika 16. Peta grupa funkcionalno sličnih termina zastupljena na listi gena koji su u bolesnika s jSpA-om pokazali smanjen izražaj te odgovarajući geni koje obilježavaju.

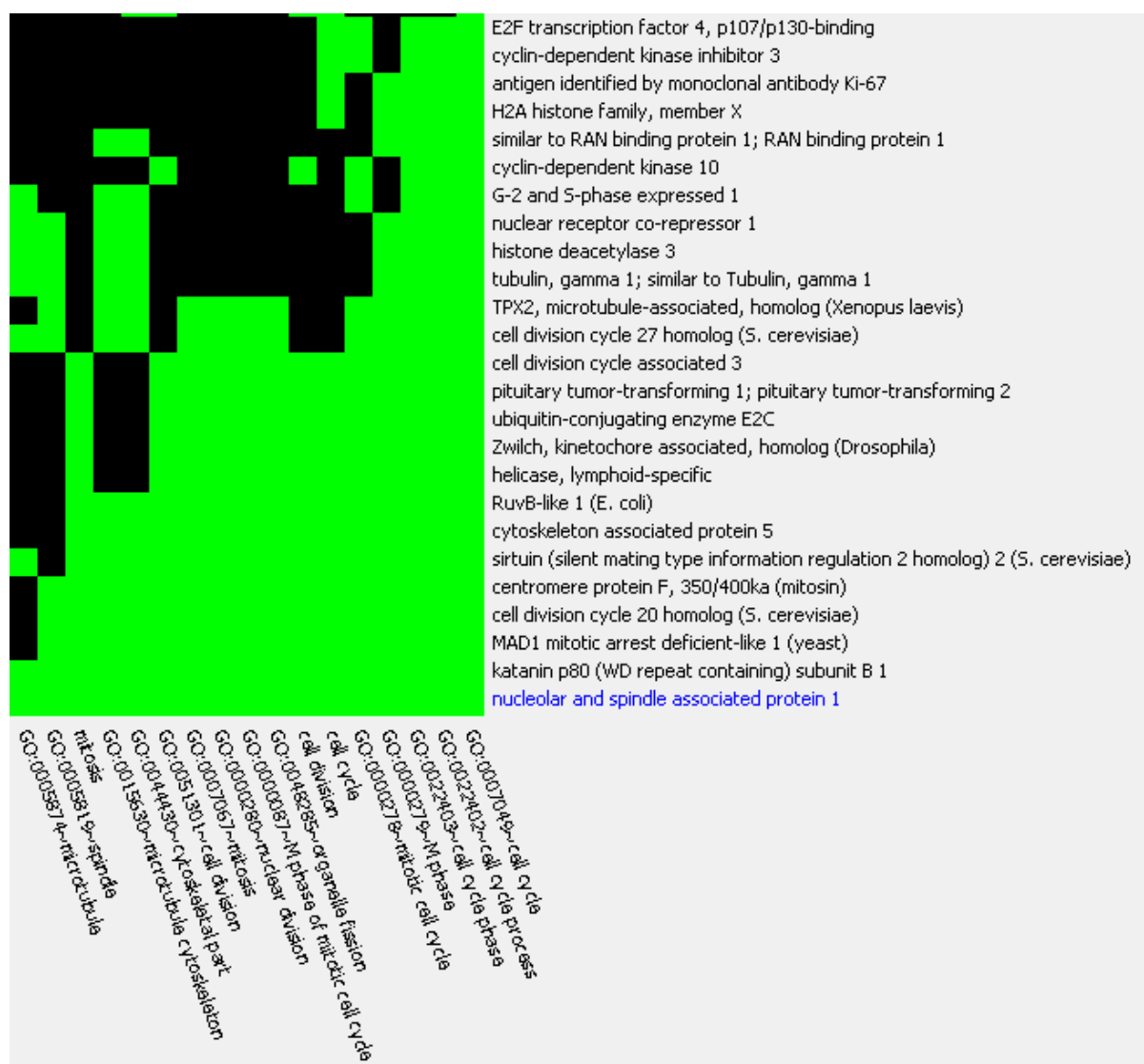
U šestoj grupi funkcionalno sličnih termina značajno zastupljenoj na listi gena koji su u bolesnika s jSpA-om pokazali smanjen izražaj prevladavali su termini genske ontologije koji opisuju biološke procese povezane s regulacijom i kontrolom staničnog ciklusa. Prikaz svih funkcionalno sličnih termina iz ove grupe, kao i odgovarajućih gena koje obilježavaju, može se vidjeti na slici 17.



Slika 17. Šesta grupa funkcionalno sličnih termina genske ontologije zastupljena na listi gena koji su u bolesnika s jSpA-om pokazali smanjen izražaj te odgovarajući geni koje obilježavaju.

U osmoj grupi funkcionalno sličnih termina značajno zastupljenoj na listi gena koji su u bolesnika s jSpA-om pokazali smanjen izražaj prevladavali su termini povezani sa staničnim ciklusom i diobom stanica. Prikaz svih funkcionalno sličnih termina iz ove grupe, kao i odgovarajućih gena koje obilježavaju, može se vidjeti na slici 19.





Slika 19. Osmu grupu funkcionalno sličnih termina zastupljena na listi gena koji su u bolesnika s jSpA-om pokazali smanjen izražaj te odgovarajući geni koje obilježavaju.

U devetoj grupi funkcionalno sličnih termina značajno zastupljenoj na listi gena koji su u bolesnika s jSpA-om pokazali smanjen izražaj, prevladavali su termini povezani s odgovorom na oštećenje DNA, metaboličkim procesima u kojima sudjeluje DNA i staničnim odgovorom na stres. Prikaz svih funkcionalno sličnih termina iz ove grupe, kao i odgovarajućih gena koje obilježavaju, može se vidjeti na slici 20.

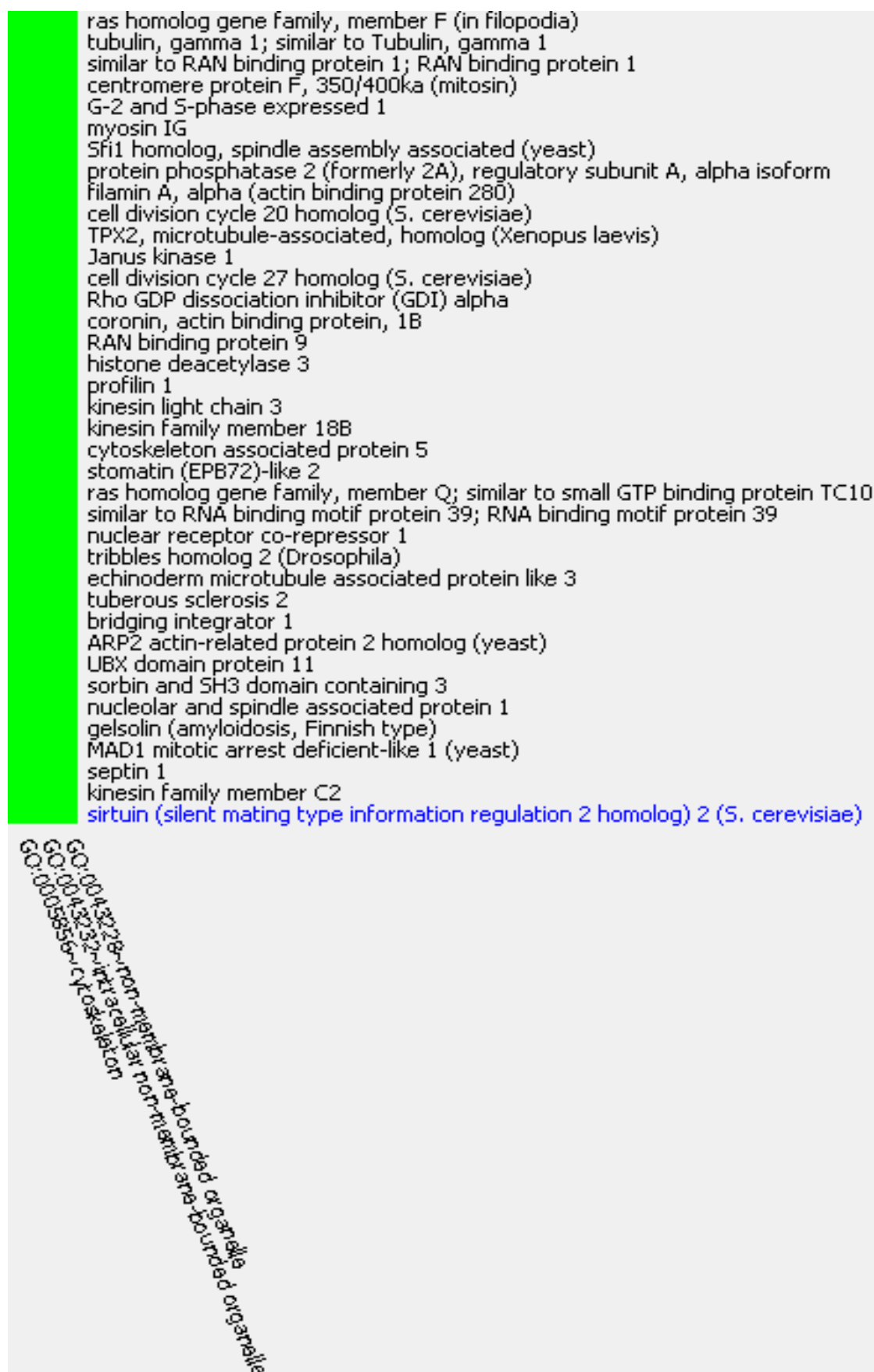
	minichromosome maintenance complex component 3
	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila)
	RuvB-like 1 (E. coli)
	REC8 homolog (yeast)
	ribonuclease H2, subunit A
	GIN5 complex subunit 2 (Psf2 homolog)
	helicase, lymphoid-specific
	insulin-like growth factor binding protein 4
	polymerase (DNA directed), mu
	minichromosome maintenance complex component 5
	minichromosome maintenance complex component 2
	centromere protein F, 350/400ka (mitosin)
	nuclear factor I/X (CCAAT-binding transcription factor)
	SH2 domain containing 3C
	autocrine motility factor receptor
	mitogen-activated protein kinase kinase 7
	G protein pathway suppressor 1
	BCL2 binding component 3
	G-2 and S-phase expressed 1
	mitochondrial ribosomal protein S9
	diacylglycerol kinase, zeta 104kDa
	F-box protein 31
	minichromosome maintenance complex component 7
	polymerase (DNA directed), alpha 1, catalytic subunit
	flap structure-specific endonuclease 1
	thymidylate synthetase
	K(lysine) acetyltransferase 5
	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 1
	RAD9 homolog A (S. pombe)
	splicing factor proline/glutamine-rich (polypyrimidine tract binding protein associated)
	SMG1 homolog, phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase (C. elegans)
	three prime repair exonuclease 1
	Fanconi anemia, complementation group I
	XPA binding protein 2
	Fanconi anemia, complementation group G
	GIY-YIG domain containing 2; GIY-YIG domain containing 1
	pituitary tumor-transforming 1; pituitary tumor-transforming 2
	H2A histone family, member X
	chromosome 19 open reading frame 62
	ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1
	structure specific recognition protein 1



Slika 20. Deveta grupa funkcionalno sličnih termina zastupljena na listi gena koji su u bolesnika s jSpA-om pokazali smanjen izražaj te odgovarajući geni koje obilježavaju.

Konačno, u desetoj grupi funkcionalno sličnih termina značajno zastupljenoj na listi gena koji su u bolesnika s jSpA-om pokazali smanjen izražaj prevladavali su termini genske ontologije koji opisuju stanične komponente povezane s organelama koje nisu vezane za membranu i citoskeletom. Na slici 21. prikazani su funkcionalno slični termini i geni koje obilježavaju, među kojima se nalazi gen MYST3, korišten za potvrdu rezultata qRT-PCR metodom.

mitochondrial ribosomal protein S27
 ribosomal protein L18
 centromere protein K
 centromere protein N
 voltage-dependent anion channel 1; similar to voltage-dependent anion channel 1
 jun D proto-oncogene
 minichromosome maintenance complex component 7
 exosome component 1
 nucleolar complex associated 2 homolog (*S. cerevisiae*)
 minichromosome maintenance complex component 2
 upstream binding transcription factor, RNA polymerase I
 polymerase (DNA directed), alpha 1, catalytic subunit
 mitochondrial ribosomal protein S12
 ceramide kinase-like
 v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog (avian)
 mitochondrial ribosomal protein S9
 SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily c, member 1
 tripartite motif-containing 28
 tRNA splicing endonuclease 15 homolog (*S. cerevisiae*)
 DAZ associated protein 1
 RAD9 homolog A (*S. pombe*)
 splicing factor, arginine/serine-rich 15
 mitochondrial ribosomal protein L4
 mitochondrial ribosomal protein L2
 mitochondrial ribosomal protein L52
 interleukin enhancer binding factor 3, 90kDa
 Fanconi anemia, complementation group I
 exosome component 7
 mitochondrial ribosomal protein S18A
 GIY-YIG domain containing 2; GIY-YIG domain containing 1
 methyl-CpG binding domain protein 3
 RNA binding motif protein 22
 K(lysine) acetyltransferase 5
 DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 56
 synapsin I
 protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 10
 ribosomal protein S6 kinase, 70kDa, polypeptide 2
 SUB1 homolog (*S. cerevisiae*)
 antigen identified by monoclonal antibody Ki-67
 Zwilch, kinetochore associated, homolog (*Drosophila*)
 cytochrome b-561
 heat shock transcription factor 1
 REC8 homolog (yeast)
 mitochondrial ribosomal protein L12
 SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily c, member 2
 helicase, lymphoid-specific
 DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 28
 SAP30-like
 zinc finger protein 687
 Ran GTPase activating protein 1
 INO80 complex subunit B
 chromobox homolog 5 (HP1 alpha homolog, *Drosophila*)
 H2A histone family, member X
 MYST histone acetyltransferase (monocytic leukemia) 3
 ribosomal protein L14
 death effector domain containing
 structure specific recognition protein 1
 katanin p80 (WD repeat containing) subunit B 1



Slika 21. Deseta grupa funkcionalno sličnih termina zastupljena na listi gena koji su u bolesnika s jSpA-om pokazali smanjen izražaj te odgovarajući geni koje obilježavaju.

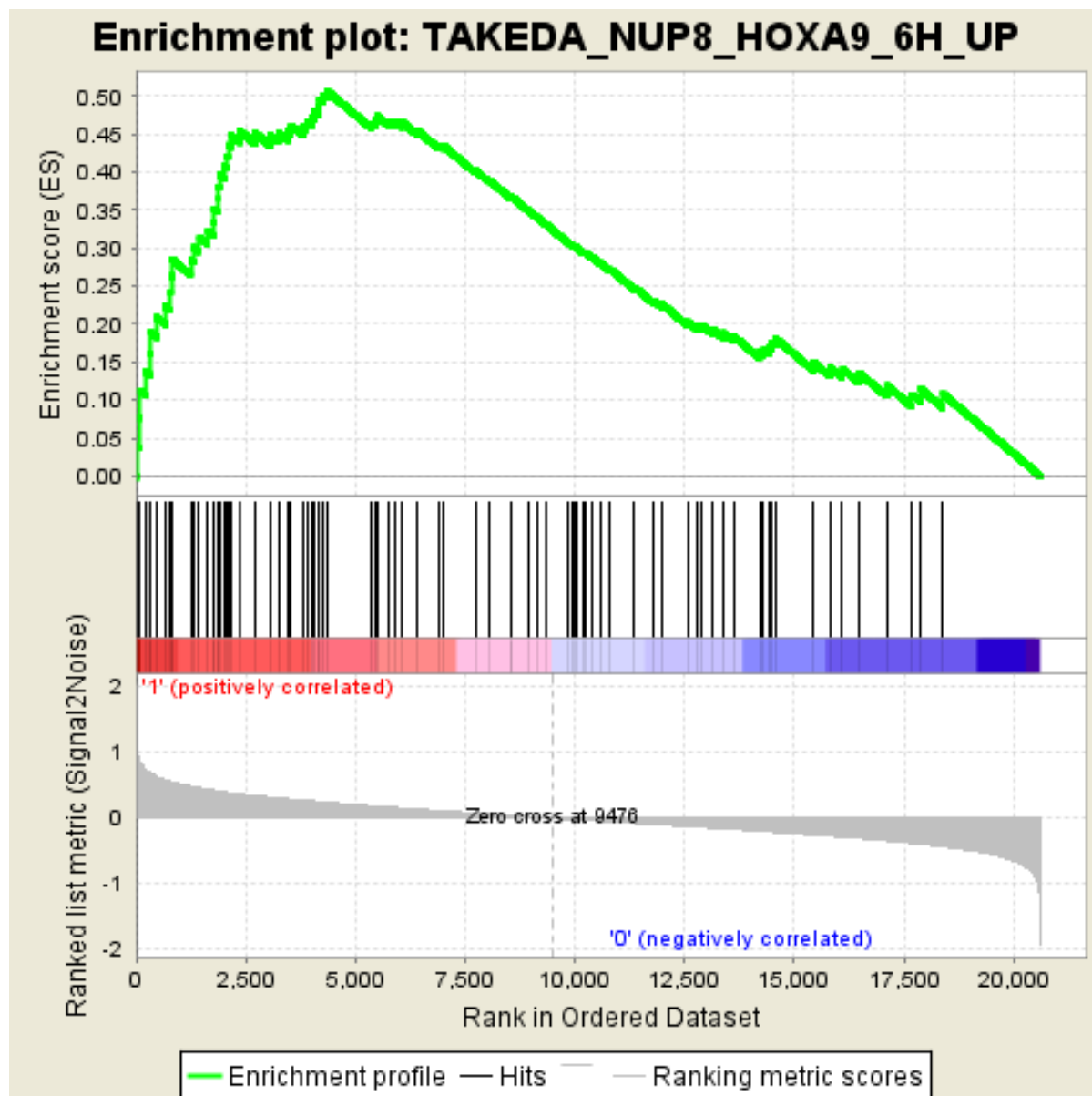
5.3. Rezultati analize zastupljenosti skupina gena

Ukupan broj zastupljenih skupina gena u bolesnika s jSpA-om bio je 634. Od toga su 23 skupine imale nominalnu p-vrijednost manju od 0,05. Ukupan broj skupina s vrijednošću normalizirane sume zastupljenosti većom od 1 u bolesnika s jSpA-om iznosio je 483.

Ukupan broj zastupljenih skupina gena u kontrolnoj skupini iznosio je 813. Od toga je 87 skupina gena imalo nominalnu p vrijednost manju od 0,05. Ukupan broj skupina s vrijednošću normalizirane sume zastupljenosti većom od 1 u kontrolnoj skupini iznosio je 284. Samo jedna skupina gena bila je statistički značajno obogaćena s postotkom lažnih otkrića manjim od 0,25.

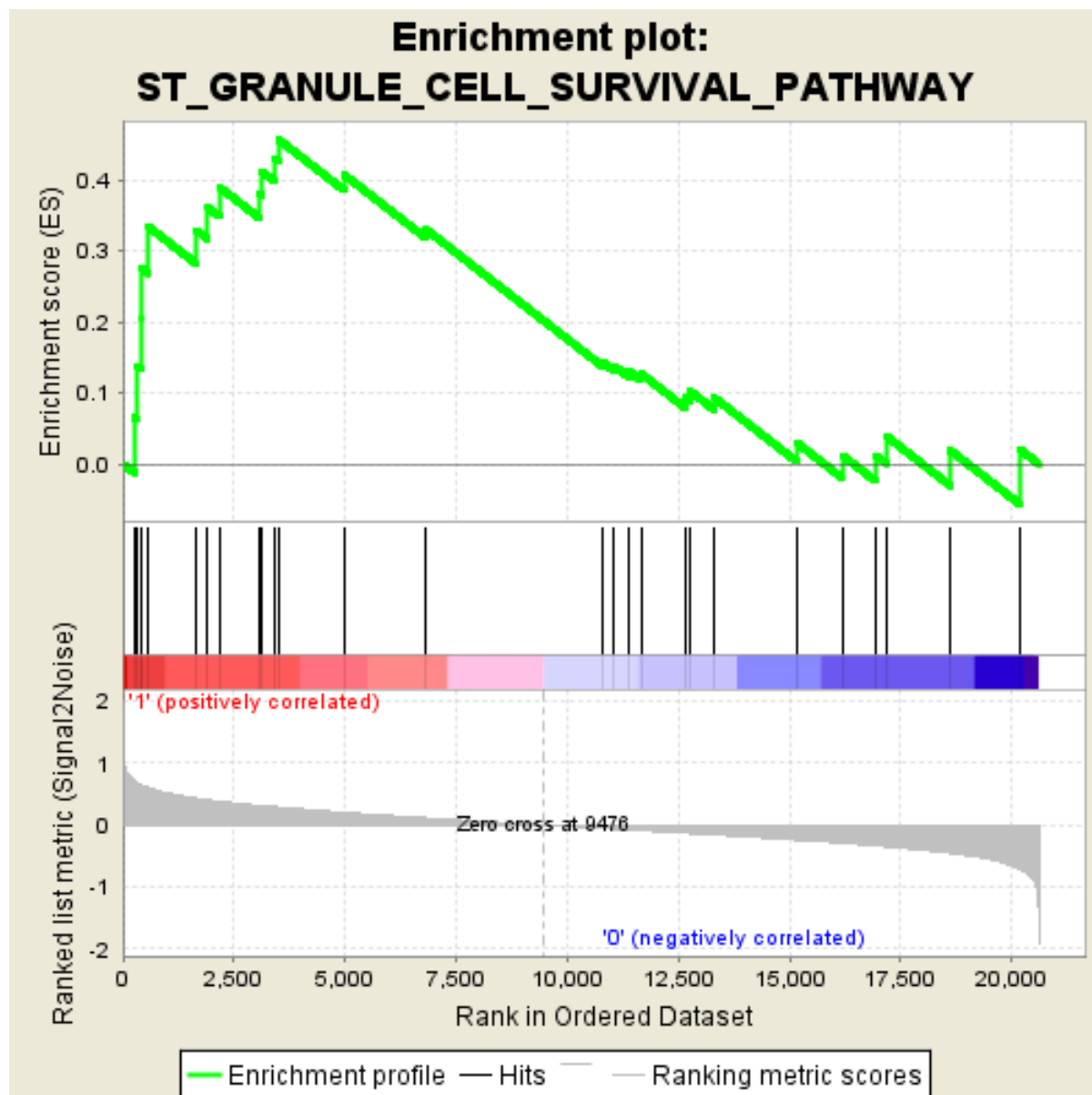
Analizom zastupljenosti skupina gena istakle su se tri skupine gena značajno zastupljene u bolesnika s jSpA-om. To je skupina gena koje sudjeluju u Hox signalnom putu, skupina gena koje sudjeluje u putu preživljavanja granulocita te skupina gena koja sudjeluje u putu aktivacije limfocita T.

Skupina gena koja je najznačajnije bila zastupljena u bolesnika s jSpA-om bila je vezana uz Hox signalni put (slika 22). Geni iz ove skupine sudjeluju u razvoju mijelodisplastičnog sindroma i akutne mijeloidne leukemije.



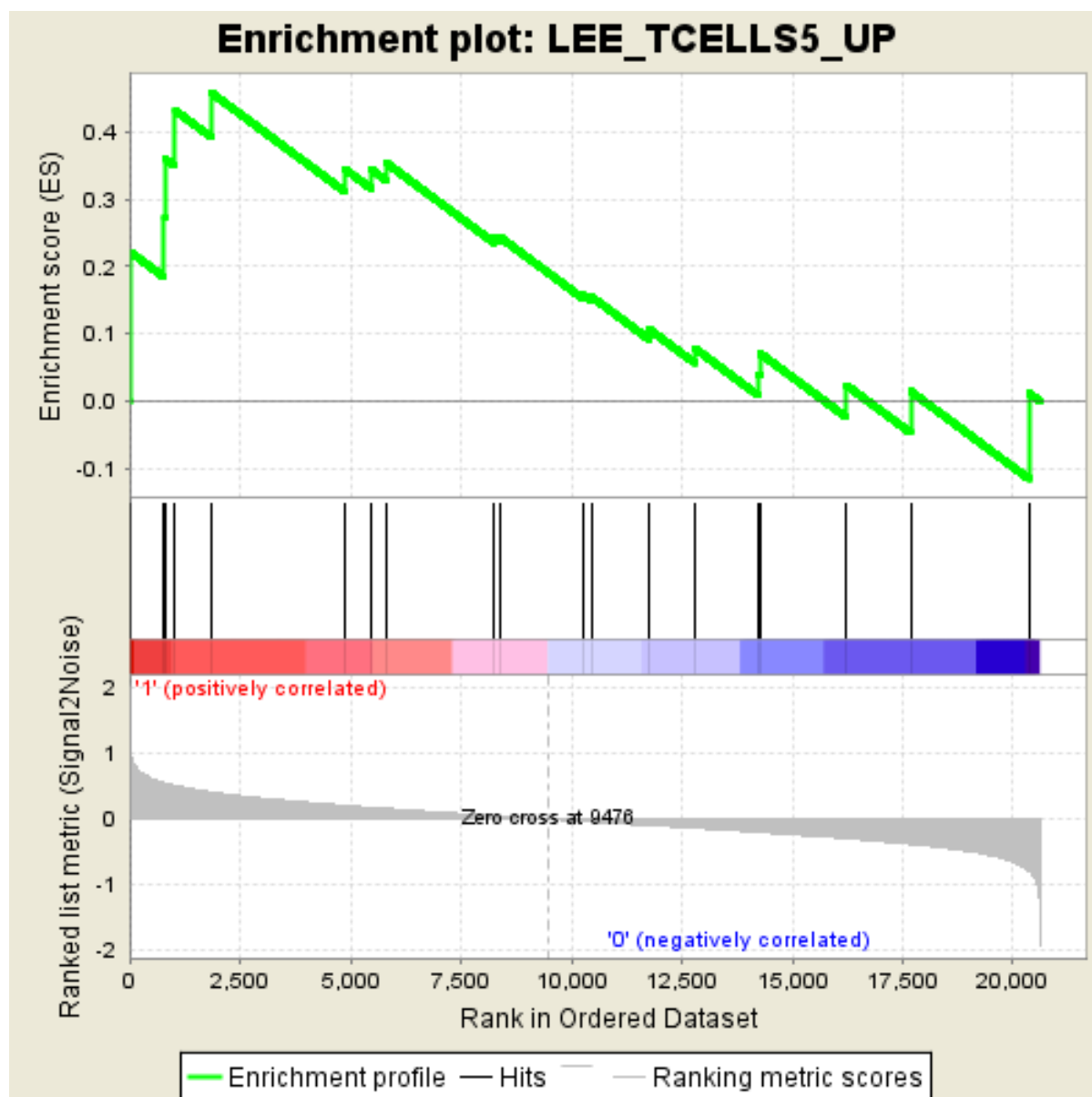
Slika 22. Analiza zastupljenosti skupine gena vezane uz Hox signalni put u bolesnika s jSpA-om.

Druga skupina gena koja je pokazala značajnu zastupljenost u bolesnika s jSpA-om bila je vezana uz put preživljavanja granuliranih stanica (slika 23). Zanimljivo je da se u ovoj skupini gena nalaze brojni geni koji sudjeluju u MAPK signalnom putu.



Slika 23. Analiza zastupljenosti skupine gena vezane uz put preživljavanja granuliranih stanica u bolesnika s jSpA-om.

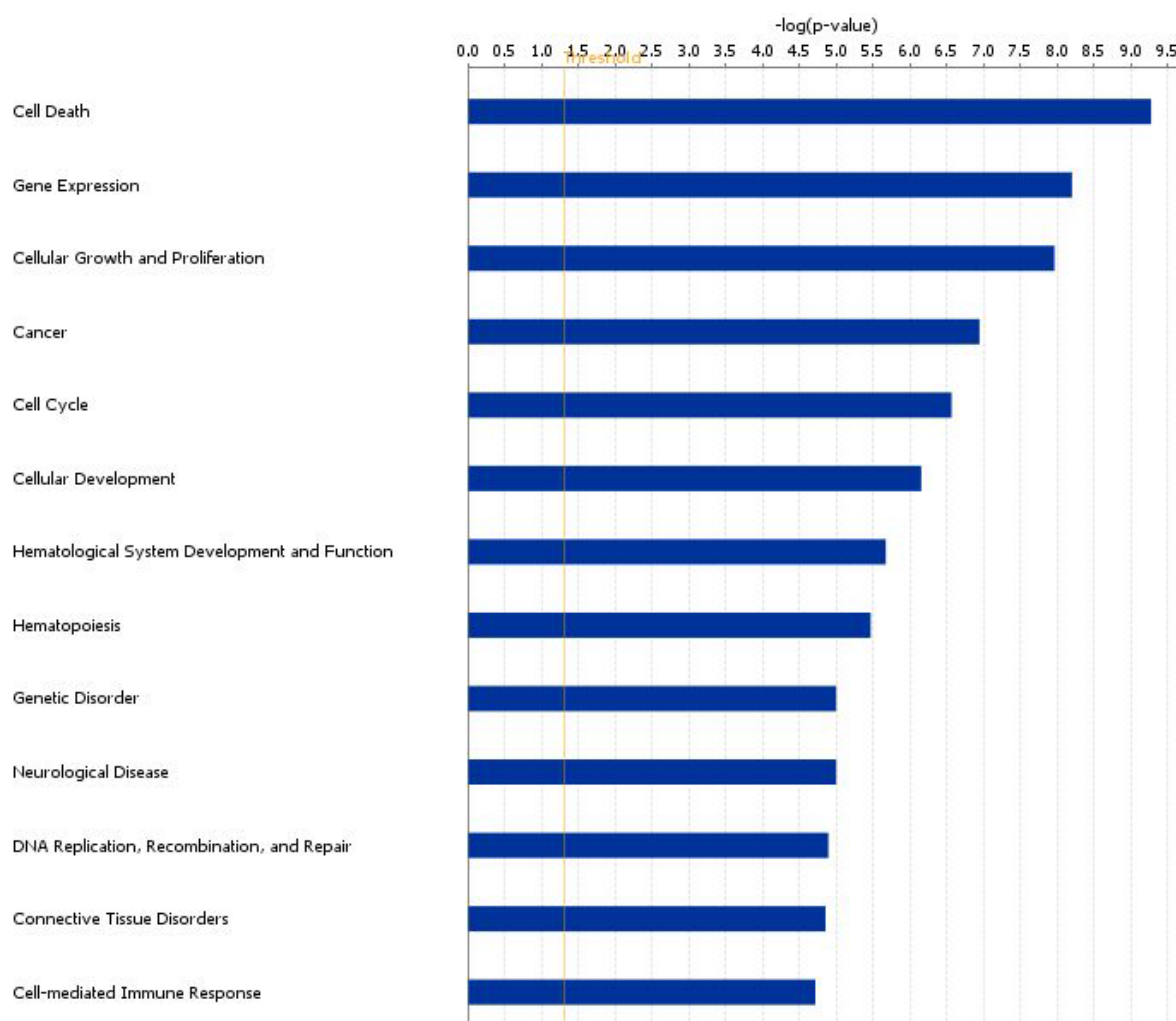
Naposljetku, treća skupina gena koja je pokazala značajnu zastupljenost u bolesnika s jSpA-om bila je povezana s putem pojačane aktivacije limfocita T (slika 24). U navedeni put uključen je i TNFSF4 gen, korišten za potvrdu rezultata qRT-PCR metodom.



Slika 24. Analiza zastupljenosti skupine gena vezane uz put imunološkog odgovora u bolesnika s jSpA-om.

5.4. Rezultati analize mreža i puteva

Analiza mreža i puteva provedena pomoću IPA programskog paketa pokazala je da su geni koji su u bolesnika s jSpA-om pokazali razliku u izražaju najviše povezani s funkcionalnim kategorijama kao što su stanična smrt; izražaj gena; rast i proliferacija stanice; rak; stanični ciklus; razvoj stanice; razvoj i funkcije hematološkog sustava; hematopoeza; genetski poremećaji; neurološke bolesti; replikacija, rekombinacija i popravak DNA; poremećaji vezivnog tkiva; stanični imunološki odgovor (slika 25, tablica 8).



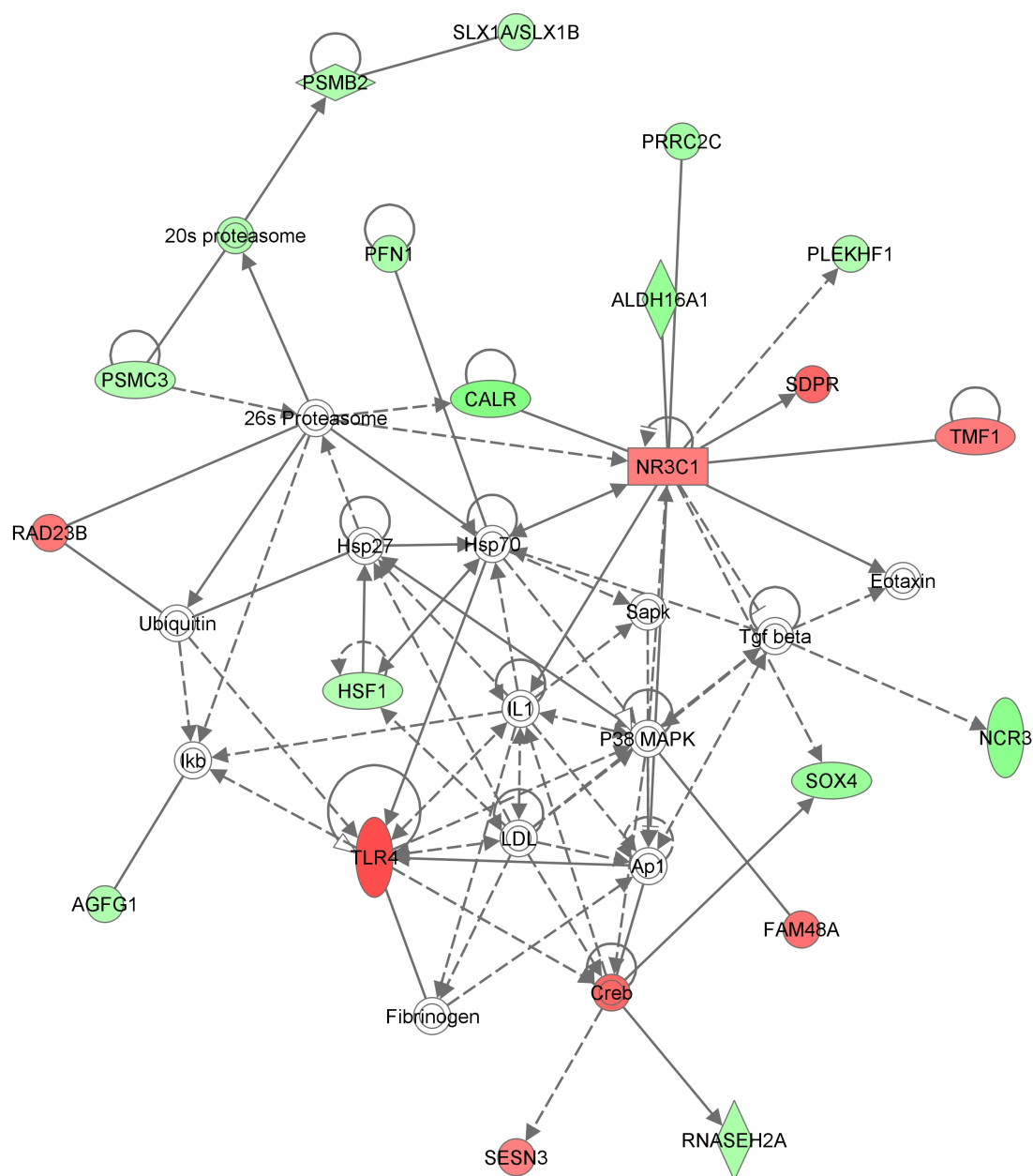
Slika 25. Rang lista funkcionalnih kategorija najviše povezanih s genima koji su pokazali razliku u izražaju u bolesnika s jSpA-om.

Tablica 8. Funkcionalne kategorije najviše povezane s genima koji su pokazali razliku u izražaju u bolesnika s jSpA-om.

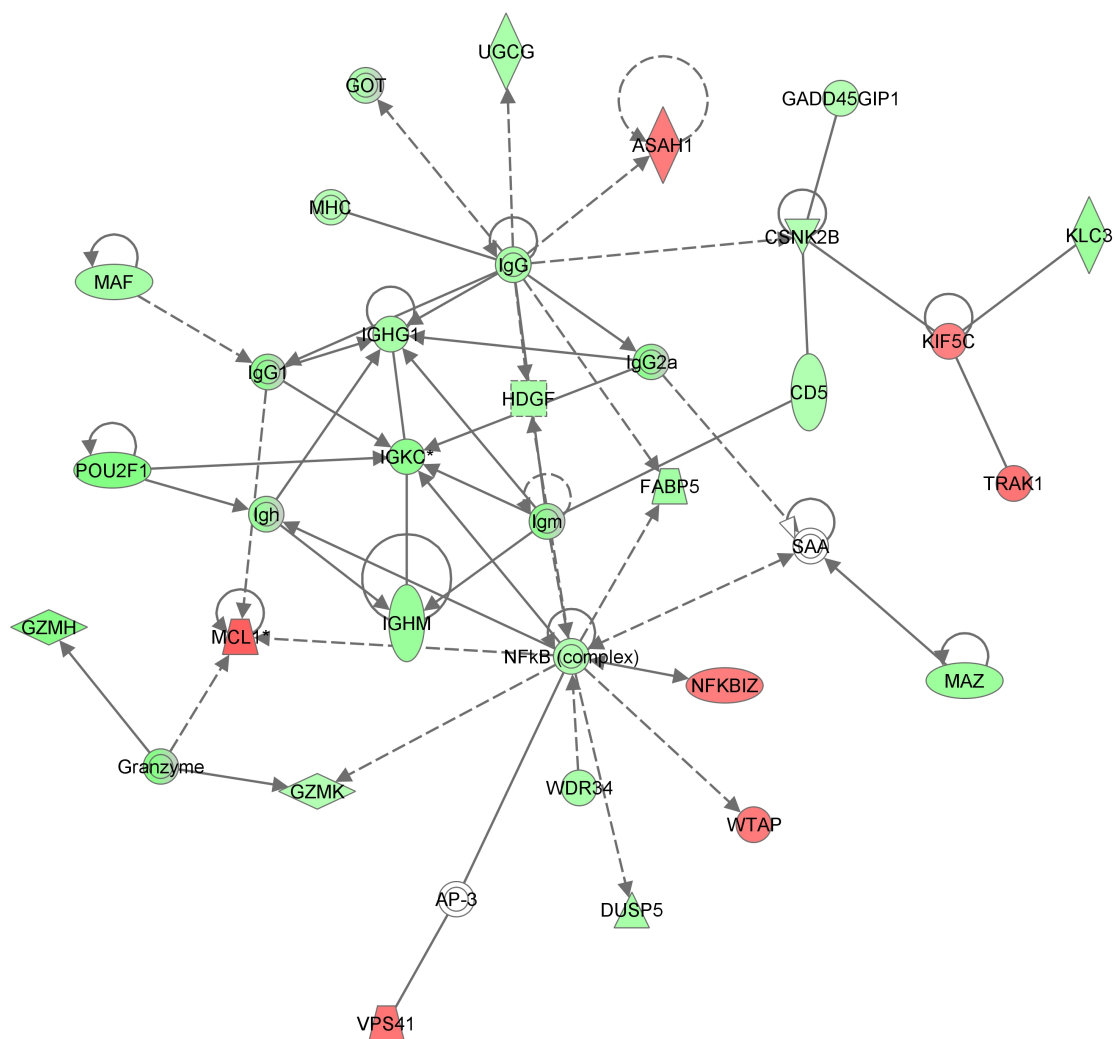
Funkcionalna kategorija	Opis	Primjeri funkcija
Stanična smrt (engl. <i>Cell Death</i>)	Funkcije povezane sa staničnom smrću i preživljavanjem;	Citoliza, nekroza, preživljavanje stanica, oporavak stanica.
Izražaj gena (engl. <i>Gene Expression</i>)	Funkcije povezane s izražajem gena;	Acetilacija kromatina, transkripcija gena i elongacija mRNA.
Rast i proliferacija stanice (engl. <i>Cellular Growth and Proliferation</i>)	Funkcije povezane s rastom i proliferacijom stanica;	Kemotaksija, infiltracija, preuređenje i transmigracija stanica.
Rak (engl. <i>Cancer</i>)	Funkcije povezane s rakom;	Bilo koji proces povezan s tumorom, stanicama raka ili kanceroznim tkivom; bilo koji procesi povezani s karcinogenezom kao što su transformacija i metastaza; sve maligne bolesti poput limfoma i neuroblastoma.
Stanični ciklus (engl. <i>Cell Cycle</i>)	Funkcije i stupnjevi staničnog ciklusa uključujući i diobu stanice; funkcije povezane s mitozom i mejozom;	Sastavljanje telomere, napredovanje staničnog ciklusa i G0 faza.
Razvoj stanice (engl. <i>Cellular Development</i>)	Funkcije povezane s razvojem i diferencijacijom stanice;	Stanične funkcije uključene u specifičnu diferencijaciju kao što je miogeneza i hematopoeza stanica; razvojne funkcije kao što je sazrijevanje i starenje stanica.
Razvoj i funkcije hematološkog sustava (engl. <i>Hematological System Development and Function</i>)	Funkcije povezane s normalnim razvojem i funkcijama stanica, tkiva i organa koji tvore hematološki sustav, kao i funkcije specifične za hematološki sustav;	Agregacija crvenih krvnih stanica i perfuzija.
Hematopoeza (engl. <i>Hematopoiesis</i>)	Funkcije povezane s razvojem i diferencijacijom limfoidnih, mezenhimalnih i mijeloidnih matičnih stanica;	
Genetski poremećaji (engl. <i>Genetic Disorder</i>)	Bolesti i poremećaji koji nastaju kao rezultat genetskih defekata;	Cistična fibroza, dvarfizam, spina bifida, spolno vezana mentalna retardacija.
Neurološke bolesti (engl. <i>Neurological Disease</i>)	Bolesti i poremećaji neurološkog sustava;	Atrofija aksona, konvulzije, diskinezija i oticanje mozga.

Replikacija, rekombinacija i popravak DNA (<i>engl. DNA Replication, Recombination and Repair</i>)	Funkcije povezane s replikacijom, rekombinacijom i popravkom DNA;	Stvaranje replikacijske vilice, homologna rekombinacija DNA, oštećenje DNA.
Poremećaji vezivnog tkiva (<i>engl. Connective Tissue Disorders</i>)	Bolesti vezivnog tkiva;	Artritis, reumatske bolesti, razvojni poremećaji kosti.
Stanični imunološki odgovor (<i>engl. Cell Mediated Immune Response</i>)	Sadržaj ove kategorije ograničen je na limfocite T i podvrste, prirodne stanice ubojice i podvrste; sve limfocitne stanice koje prirodno izražavaju TCR i dodatne vrste prirodnih stanica ubojica uključene su u ovu kategoriju; kategorija je ograničena na diferenciranije oblike ovih stanica i procese koje takve stanice obavljaju	

U primarnoj kategoriji koja opisuje bolesti i poremećaje, s genima koji su u bolesnika s jSpA-om pokazali razliku u izražaju najviše su bile povezane funkcionalne kategorije kao što su genetski i upalni poremećaji (slika 26, 27). Na slici 26. vidljiva je važna uloga gena TLR4, odabranog za potvrdu rezultata, u jednoj od stvorenih mreža gena povezanih s genetskim poremećajima te upalnim i infektivnim bolestima.

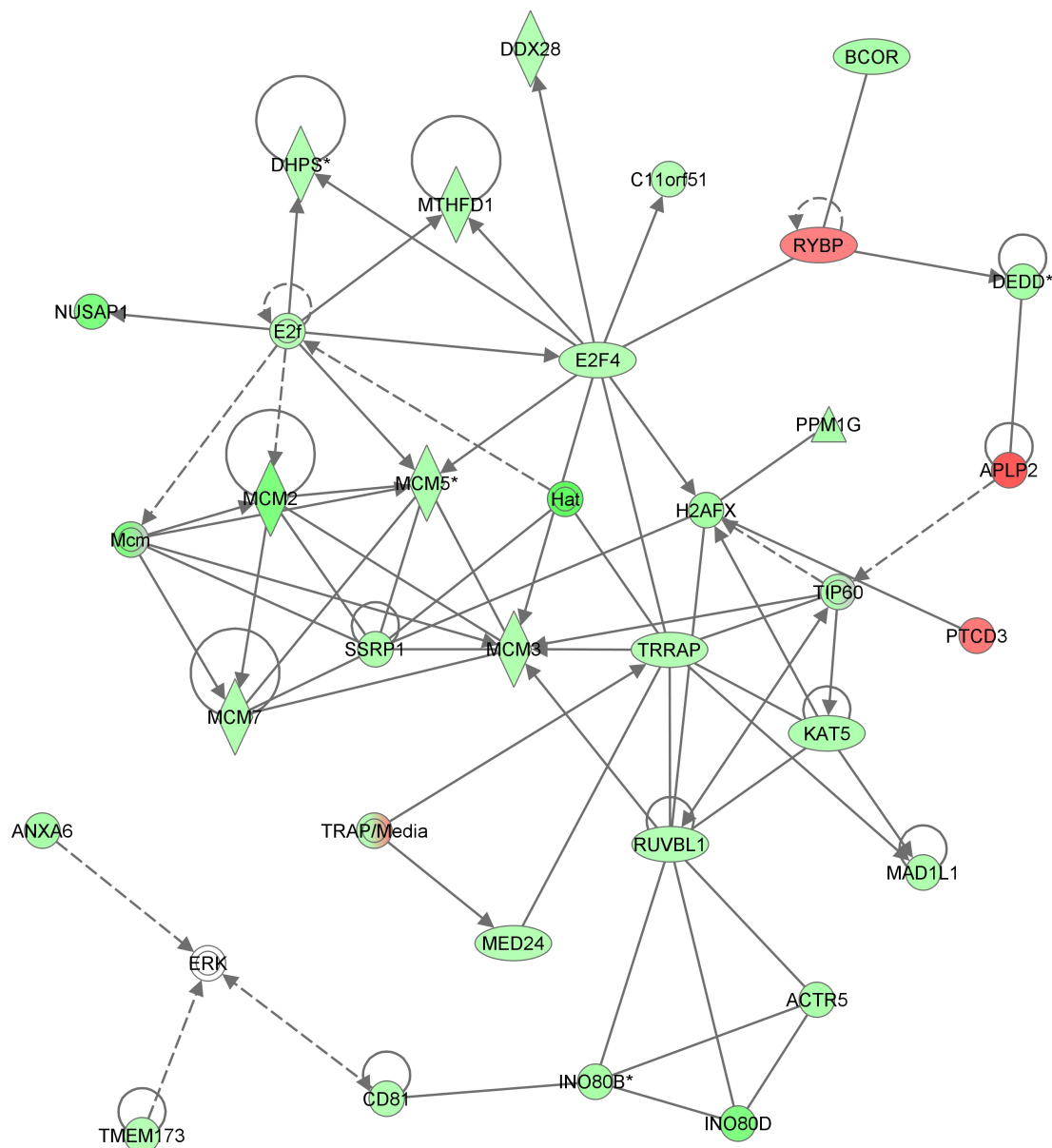


Slika 26. Mreža gena povezanih s genetskim poremećajima te upalnim i infektivnim bolestima.



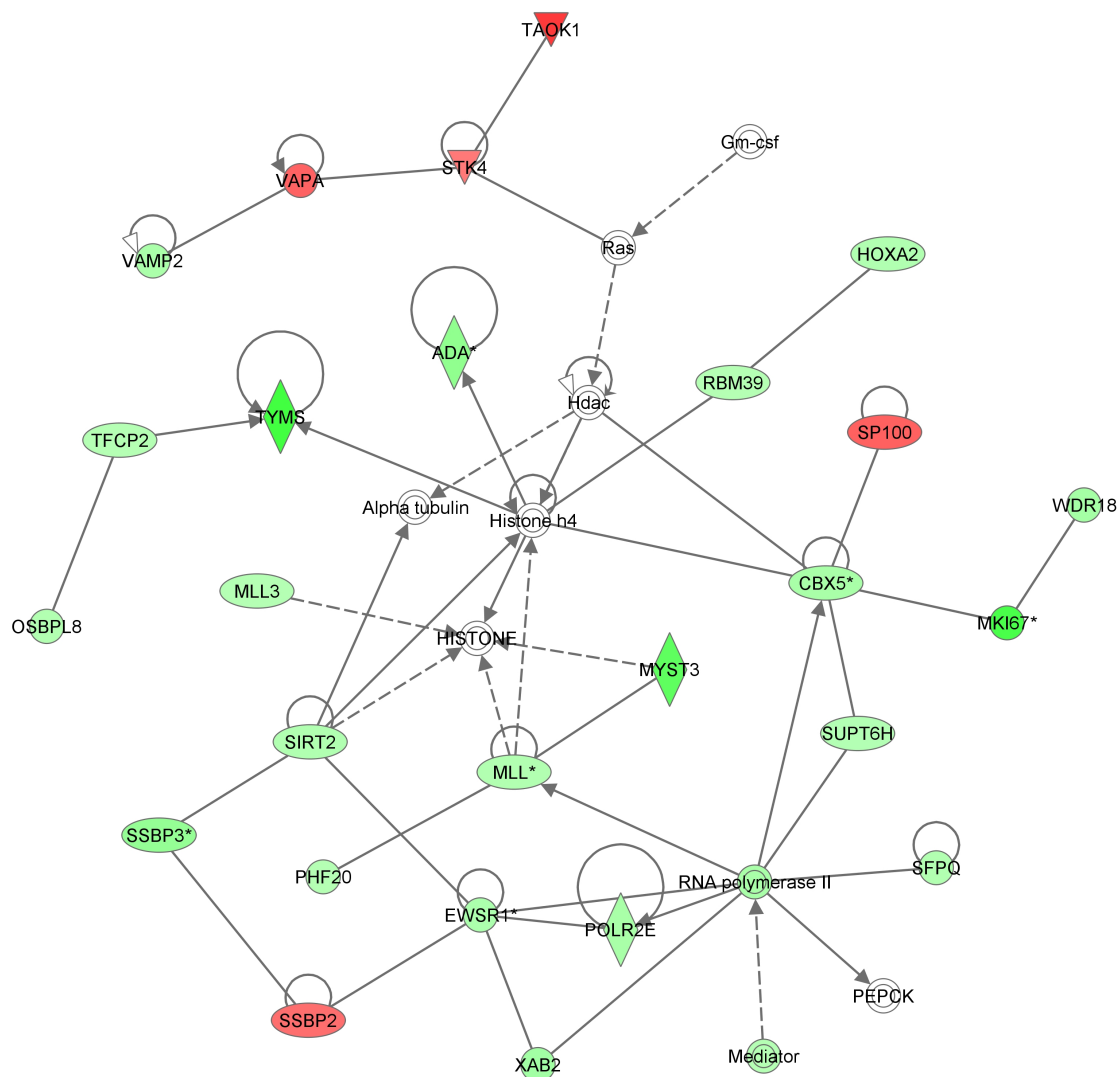
Slika 27. Mreža gena povezanih s imunološkim i upalnim bolestima.

U primarnoj kategoriji koja opisuje funkcije molekula i stanica, s genima koji su u bolesnika s jSpA-om pokazali razliku u izražaju najviše su bile povezane funkcionalne kategorije kao što su stanična smrt, izražaj gena, stanični ciklus i razvoj stanice (slika 28).



Slika 28. Mreža gena povezanih sa staničnim ciklusom te replikacijom, rekombinacijom i popravkom DNA.

Konačno, u primarnoj kategoriji koja opisuje funkcije i razvoj fizioloških sustava, s genima koji su u bolesnika s jSpA-om pokazali razliku u izražaju najviše su bile povezane funkcionalne kategorije kao što su razvoj i funkcije hematološkog sustava, te hematopoeza (slika 29).



Slika 29. Mreža gena povezanih s razvojem hematološkog sustava i hematopoezom.

5.5. Potvrda rezultata

Za potvrdu rezultata izdvojeno je 6 gena koji su prilikom analize na DNA čipu pokazali značajno povećan izražaj (TLR4, NLRP3, PTPRN2, CXCR4, DUSP6, TNFSF4), 3 gena koja su pokazala značajno smanjen izražaj (MAP2K2, MAPKBP1, MYST3) te gen koji nije pokazao značajnu razliku u izražaju, no za koji se pretpostavlja da ima važnu i još neistraženu ulogu u imunološkim bolestima (PTPN12). Rezultati analize genskoga izražaja na DNA čipu za odabrane gene prikazani su u tablici 9.

Tablica 9. Geni odabrani za daljnju analizu s prikazom rezultata dobivenih analizom izražaja na DNA čipu.

Simbol	Ime gena	Oznaka skupa proba na čipu	Vrijednost intenziteta	Omjer promjene	p
TLR4	Toll-like receptor 4	232068_s_at	248,25	+2,13	0,02
NLRP3	NLR family, pyrin domain containing 3	207075_at	130,39	+1,97	<0,01
PTPRN2	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, N polypeptide 2	203029_s_at	189,93	+1,78	0,01
CXCR4	Chemokine (C-X-X motif) receptor 4	217028_at	4753,75	+1,60	0,02
DUSP6	Dual specificity phosphatase 6	208892_s_at	1724,53	+1,71	0,05
TNFSF4	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4	207426_s_at	137,50	+1,95	<0,01
MAP2K2	Mitogen-activated protein kinase kinase 2	213490_s_at	193,45	-1,55	0,03
MAPKBP1	Mitogen-activated protein kinase binding protein 1	213394_at	130,88	-2,17	0,01
MYST3	MYST histone acetyltransferase (monocytic leukemia) 3	216361_s_at	101,78	-3,26	<0,01
PTPN12	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 12	202006_at	710,88	+1,57	0,07
		216884_at	6,09	-1,05	0,91
		216915_s_at	26,69	+2,30	0,11

Objašnjenje: svaki gen na Affymetrixovom čipu predstavljen je jednim ili više skupom proba. Svaki skup proba daje određenu vrijednost intenziteta, a usporedba vrijednosti intenziteta skupova proba na eksperimentalnom i osnovnom skupu pločica daje omjer promjene koji predstavlja relativno povećanje (+) ili smanjenje (-) izražaja nekog gena. Kako bi se utvrdilo je li ta razlika u izražaju statistički značajna, računa se i p-vrijednost. Za dodatna objašnjenja vidjeti poglavlje 1.8.

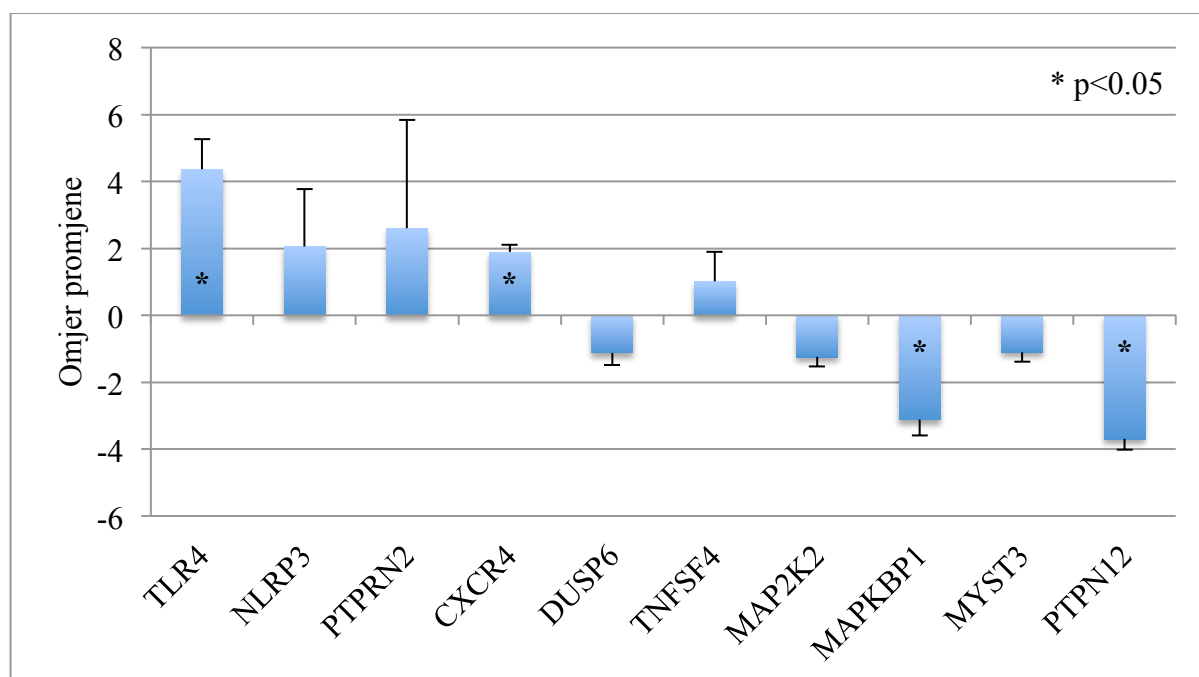
Potvrda rezultata provedena je pomoću qRT-PCR metode u istoj skupini bolesnika u kojoj je učinjena analiza genskoga izražaja pomoću DNA čipova (B1), zatim u novim skupinama neliječenih i liječenih bolesnika s postavljenom dijagnozom jSpA-a (B2 i B3) te u skupini bolesnika s postavljenom dijagnozom poliartrikularnog ili oligoartrikularnog oblika JIA (KB), kao što je prikazano u tablici 6. Izražaj gena bolesnika uspoređivan je s izražajem u kontrolnoj skupini (KZ2), a rezultati su prikazani u tablici 10.

Tablica 10. Rezultati qRT-PCR analize odabranih gena u skupini bolesnika kod kojih je učinjena analiza genskoga izražaja na DNA čipu (B1), u skupini neliječenih bolesnika s postavljenom dijagnozom ErA-a (B2), u skupini liječenih bolesnika s postavljenom dijagnozom ErA-a (B3), te u skupini bolesnika s postavljenom dijagnozom nekog drugog oblika JIA-a (KB).

GEN	B1		B2		B3		KB	
	OP	p	OP	p	OP	p	OP	p
TLR4	+4,36	0,05	+3,91	<0,01	+1,32	0,26	+1,37	0,30
NLRP3	+2,06	0,53	-5,00	<0,01	-3,70	0,05	-2,13	0,21
PTPRN2	+2,60	0,54	-5,55	0,01	+1,41	0,59	-2,78	0,17
CXCR4	+1,89	<0,01	+1,87	<0,01	+1,37	0,03	+1,23	0,43
DUSP6	-1,12	0,72	-1,19	0,52	+1,11	0,66	-1,06	0,71
TNFSF4	+1,02	0,97	-1,16	0,46	-1,56	0,04	+1,26	0,23
MAP2K2	-1,25	0,44	1,04	0,80	-1,07	0,75	+1,01	0,96
MAPKBP1	-3,12	0,02	-1,39	0,29	-1,96	0,05	-1,05	0,75
MYST3	-1,10	0,73	-1,05	0,79	+1,03	0,86	-1,56	0,34
PTPN12	-3,70	<0,01	-2,63	<0,01	-2,44	<0,01	-1,06	0,84

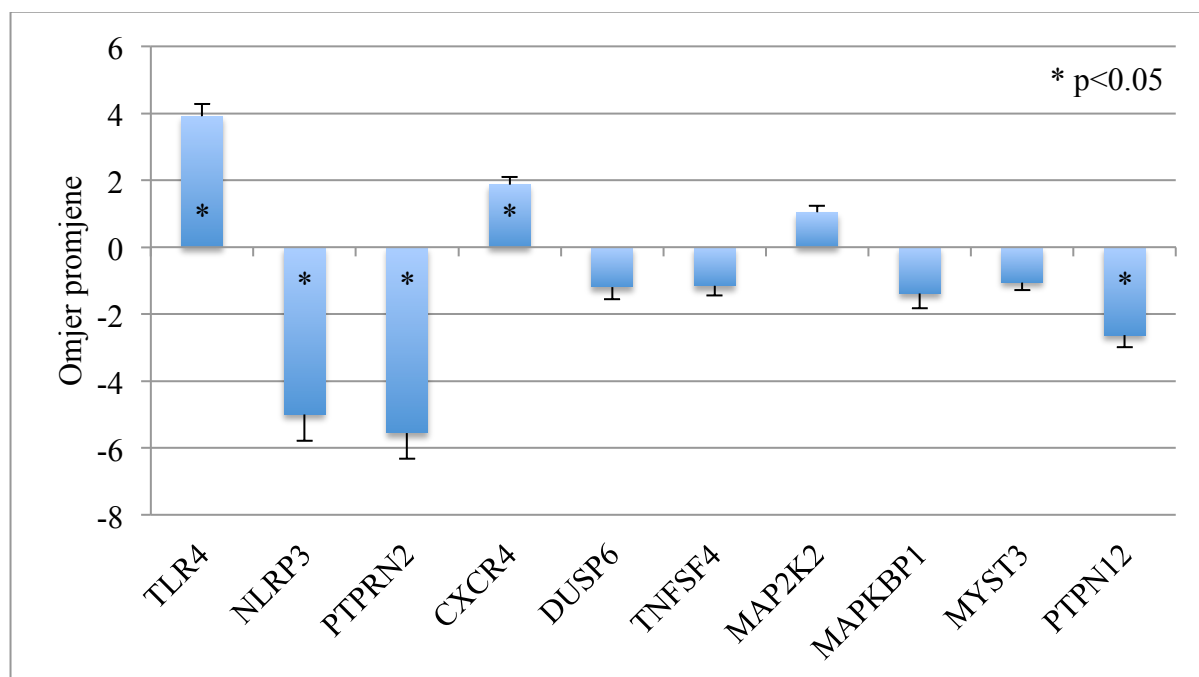
Objašnjenje: OP, odnosno omjer promjene, predstavlja relativno povećanje (+) odnosno smanjenje (-) izražaja gena kvantificirano pomoću $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metode. Za dodatna objašnjenja vidjeti poglavlje 1.8.

Rezultati qRT-PCR analize odabranih gena u skupini bolesnika s novopostavljenom dijagnozom jSpA-a kod kojih je učinjena analiza genskoga izražaja na čipu (B1) pokazali su statistički značajnu ($p < 0,05$) promjenu izražaja četiri gena. Dva gena imala su povećan izražaj (TLR4 i CXCR4), a dva smanjen (MAPKBP1 i PTPN12), kao što je prikazano u tablici 10. i na slici 30.



Slika 30. Rezultati qRT-PCR analize odabranih gena u skupini bolesnika s novopostavljenom dijagnozom jSpA-a kod kojih je učinjena analiza genskoga izražaja na čipu (B1). Stupci pogreške (engl. *error bars*) izračunati su pomoću formule $2^{\text{SEM}} - 1$, pri čemu SEM označava standardnu pogrešku aritmetičke sredine (engl. *standard error of the mean*, SEM).

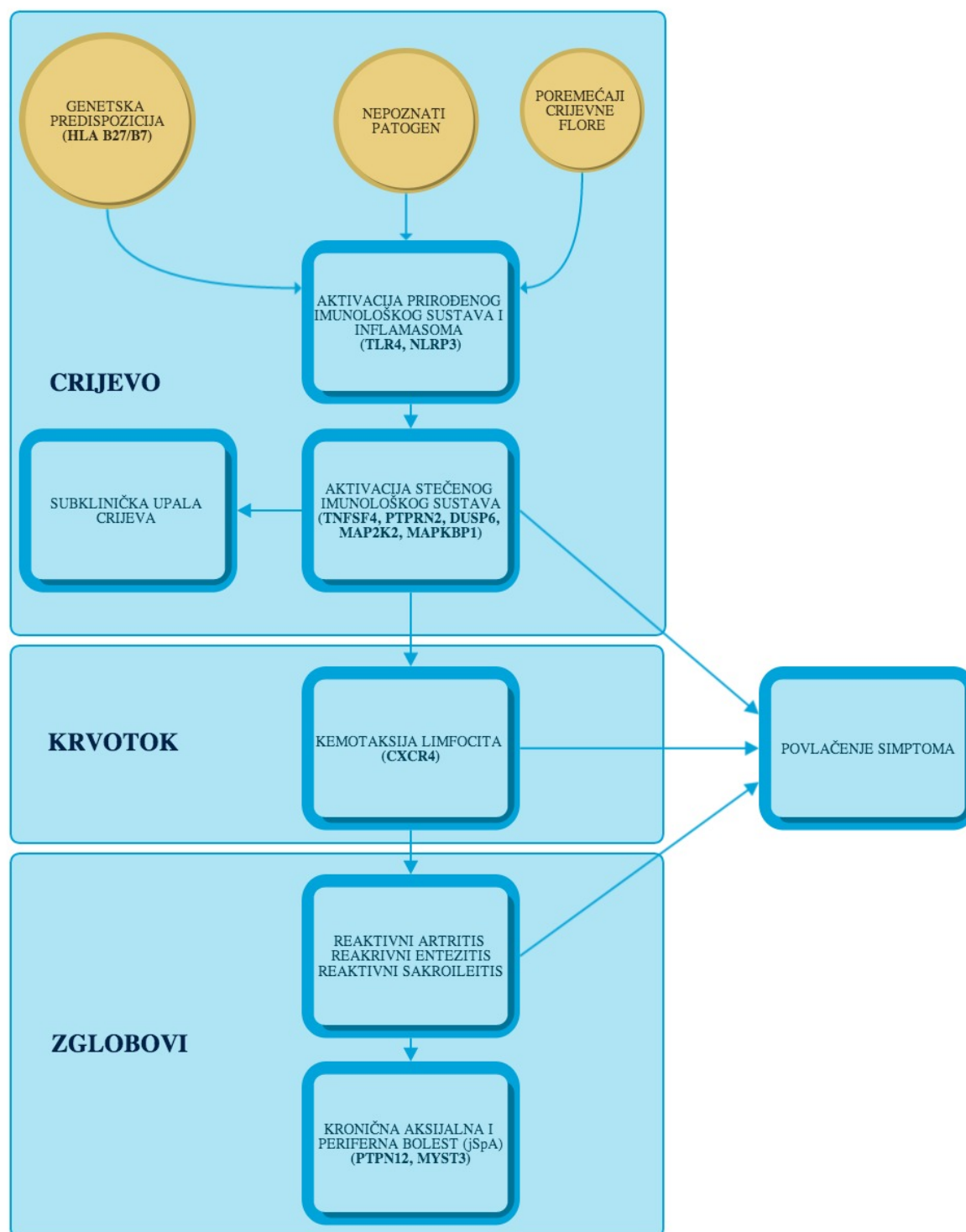
U novoj skupini neliječenih bolesnika s tek postavljenom dijagnozom jSpA-a (B2), qRT-PCR analiza pokazala je statistički značajnu ($p < 0,05$) promjenu izražaja pet gena, od kojih su dva imala povećan izražaj (TLR4 i CXCR4), a tri smanjen (NLRP3, PTPRN2 i PTPN12). Rezultati qRT-PCR analize u ovoj skupini bolesnika prikazani su u tablici 10. i na slici 31.



Slika 31. Rezultati qRT-PCR analize odabranih gena u skupini neliječenih bolesnika s tek postavljenom dijagnozom jSpA-a (B2). Stupci pogreške (engl. *error bars*) izračunati su pomoću formule $2^{\text{SEM}} - 1$, pri čemu SEM označava standardnu pogrešku aritmetičke sredine (engl. *standard error of the mean*, SEM).

U skupini liječenih bolesnika kod kojih je postavljena dijagnoza jSpA-a (B3), qRT-PCR analiza pokazala je statistički značajno promijenjen ($p < 0,05$) izražaj pet gena. Od toga

Naposl



Slika 35. Shematski prikaz patogeneze jSpA-a s prikazom uloge gena odabranih za potvrdu rezultata.

6.4. Prednosti i nedostaci provedenog istraživanja

Kao što je već na nekoliko mjesta navedeno, provedeno istraživanje bilo je prvo u kojem je analiziran izražaj svih gena u stanicama krvi pomno odabranih bolesnika kojima je dijagnoza jSpA-a postavljena korištenjem ILAR-ovih klasifikacijskih kriterija. S obzirom na važnost HLA genotipa u razvoju spondiloartritisa, na što ukazuje i činjenica da je prisutnost B27 genotipa jedan od kriterija za uključivanje bolesnika u ErA podskupinu JIA-a, svim bolesnicima učinjena je HLA tipizacija. Osim toga, ponovno je važno naglasiti da su svi bolesnici imali poznat omjer vjerojatnosti za razvoj bolesti s obzirom na HLA genotip, koji je izračunat za populaciju Hrvatske. Nadalje, bolesnici kojima je učinjena analiza genskoga izražaja na DNA čipu primali su samo lijekove iz skupine NSAIL, koje i inače koristi većina djece za skidanje temperature ili liječenje boli u uhu. No, čak ni ti lijekovi nisu bili korišteni najmanje 24h prije uzimanja uzorka. Samo ispitivanje provedeno je na čipu koji se danas najčešće koristi za analizu sveukupnoga genskoga izražaja, a analiza dobivenih rezultata provedena je korištenjem bioinformatičkih metoda koje koriste različite pristupe za povezivanje izražaja i odgovarajućih bioloških funkcija. Naposljetku, ispitivanje izražaja pomno odabranih gena u novoj skupini neliječenih i liječenih bolesnika omogućilo nam je da potvrdimo konzistentnost izražaja, ali i da otkrijemo utjecaj standardne terapije na izražaj gena za koje se pokazalo da imaju značajnu ulogu u razvoju bolesti. Osim toga, izražaj odabranih gena ispitan je i u skupini bolesnika koji su korištenjem ILAR-ovih klasifikacijskih kriterija svrstani u skupinu oligoartikularno i poliarartikularnog oblika JIA-a, što nam je omogućilo da dobijemo uvid u sličnosti i razlike koje postoje između navedenih entiteta.

Kao nedostatak istraživanja mogao bi se navesti mali broj bolesnika i kontrola kojima je učinjeno ispitivanje izražaja na čipu, no valja naglasiti kako je broj sudionika kojima je rađena analiza sveukupnoga genskoga izražaja bio u skladu s ranije provedenim istraživanjima u kojima je sudjelovalo od 6 do 28 bolesnika, kao što je prikazano u tablici 5. Osim toga, ranija istraživanja pokazala su da je za analizu razlika u izražaju gena dovoljno provesti pet eksperimenata s RNA izoliranom iz različitih osoba (283). Kada tome još dodamo da su rezultati ispitivanja na DNA čipu potvrđeni u istoj i u novim skupinama bolesnika drugom neovisnom metodom koja služi kao “zlatni standard” za mjerenje genskoga izražaja, možemo ustvrditi da su rezultati ispitivanja na DNA čipu dobiveni u našem istraživanju vjerodostojni.

6.5. Daljnja istraživanja

Analiza transkriptoma daje nam važan uvid u zbivanja u stanici koja bi mogla biti odgovorna za opažene biološke fenomene. Međutim, sama transkripcija predstavlja tek jedan korak u stvaranju fenotipskih obilježja koje mi prepoznajemo kao bolest. Čini se da se gotovo svakodnevno otkrivaju novi čimbenici koji utječu na ovaj složeni proces, a sve njih proučava funkcionalna genomika. Tako danas više ne govorimo samo o genomu, transkriptomu i proteomu, već se javio cijeli niz novih –omova*, poput epigenoma, metaboloma, lipidoma. Sveubohvatno proučavanje neke bolesti danas stoga zahtjeva pristup na nekoliko razina. Upravo zbog toga, na temelju rezultata provedene analize transkriptoma, pokrenuta su daljnja istraživanja na razini genoma (polimorfizmi), epigenoma (epigenetska regulacija) i proteoma (proteinske analize). Doprinos navedenih istraživanja zaokružiti će ovaj veliki projekt i nadamo se poslužiti u otkrivanju, praćenju i liječenju bolesnika kojima je postavljena dijagnoza ove nepredvidive bolesti.

* grč. sveukupnost;

7. ZAKLJUČCI

1. U djece s tek postavljenom dijagnozom jSpA-a postoje promjene genskoga izražaja koje utječu na pojavu bolesti.
2. Usporedba genskoga izražaja stanica krvi bolesnika s tek postavljenom dijagnozom jSpA-a i genskoga izražaja stanica krvi sudionika odgovarajuće dobi i spola iz kontrolne skupine sudionika bez postavljene dijagnoze upalne bolesti pokazala je da postoji statistički značajna razlika u izražaju 745 gena, od čega je 197 gena pokazalo smanjen izražaj u bolesnika s jSpA-om, a 548 gena povećan.
3. Analize zastupljenosti termina genske ontologije među genima koji su pokazali razlike u izražaju ukazala je na pojačanu aktivnost stanica krvi u bolesnika s jSpA-om, s posljedično pojačanom reaktivnošću i apoptozom te sniženom transkripcijskom aktivnošću i usporenim staničnim ciklusom, što je potvrdilo disfunkciju stanica na više razina.
4. Analiza zastupljenosti skupina gena pokazala je da su u bolesnika s jSpA-om najzastupljenije skupine gena koje sudjeluju u Hox signalnom putu, u putu preživljavanja granuliranih stanica te u putu aktivacije limfocita T.
5. Analiza mreža i puteva pokazala je kako u razvoju jSpA-a sudjeluju slični mehanizmi kao u upalnim, genetskim, imunološkim i zaraznim bolestima koji uključuju poremećaj staničnog ciklusa, stanične smrti, diferencijacije stanica i genskoga izražaja.
6. Ispitivanje izražaja deset odabranih gena neovisnom metodom potvrdilo je obrasce izražaja koji su u bolesnika s jSpA-om opaženi ispitivanjem izražaja na DNA čipu.
7. Ispitivanje izražaja deset odabranih gena qRT-PCR metodom u novoj skupini neliječenih bolesnika s postavljenom dijagnozom jSpA-a potvrdilo je univerzalnost opaženih obrazaca izražaja.
8. Ispitivanje izražaja deset odabranih gena qRT-PCR metodom u novoj skupini liječenih bolesnika s jSpA-om pokazalo je da standardna terapija utječe na izražaj nekih gena.
9. Ispitivanje izražaja deset odabranih gena qRT-PCR metodom u skupini bolesnika kojima je postavljena dijagnoza oligoartikularnog i poliartikularnog oblika JIA-a pokazalo je da su opaženi obrasci izražaja specifični za bolesnike s jSpA-om.
10. Sveobuhvatna analiza transkriptoma bolesnika s jSpA-om i dodatna analiza odabranih gena u novim skupinama bolesnika pružala je važne informacije o patofiziološkim mehanizmima odgovornima za razvoj jSpA-a koje se mogu iskoristiti u ispitivanju novih modaliteta liječenja.

8. SAŽETAK

Uvod: Juvenilni spondiloartritis (jSpA) je naziv za skupinu upalnih bolesti nepredvidivog tijeka koje imaju mnoga preklapajuća obilježja, a javljaju se u djece prije 16. godine života. Najčešće se povezuju s HLA-B27 genotipom, no mnoga istraživanja pokazala su da postoji niz do sada nepoznatih gena izvan HLA sustava koji utječu na razvoj bolesti.

Sudionici i metode: U istraživanju je sudjelovalo 45 djece s poznatim HLA genotipom, kojima je dijagnoza nediferencirane jSpA postavljena pomoću ILAR-ovih kriterija, 11 djece s postavljenom dijagnozom drugog oblika JIA-a te 12 djece bez dijagnoze upalne bolesti. Kod 11 djece s jSpA i kod četvero djece bez dijagnoze upalne bolesti učinjena je analiza genskoga izražaja pomoću DNA čipa te bioinformatička analiza dobivenih rezultata. Kod svih sudionika učinjena je qRT-PCR analiza deset pomno odabranih gena.

Rezultati: Analiza na DNA čipu pokazala je da kod bolesnika s jSpA postoji razlika u izražaju 745 gena koji sudjeluju u raznim upalnim procesima, dok je qRT-PCR analiza potvrdila da su dobiveni rezultati univerzalni i specifični za bolesnike s jSpA.

Zaključak: Rezultati provedenog istraživanja pokazali su da je jSpA poligenska bolest u kojoj dolazi do poremećaja u prepoznavanju patogena i aktivaciji imunološkog odgovora, u migraciji upalnih stanica te u regulaciji imunološkog sustava, zbog čega mogu poslužiti kao putokaz za daljnja istraživanja patogenetskih mehanizama i novih modaliteta liječenja.

9. SUMMARY

Distinctive gene expression in patients with juvenile seronegative spondyloarthtopathy; Lovro Lamot, 2014.

Introduction: Juvenile spondyloarthritis (jSpA) refers to spectrum of unpredictable inflammatory diseases with overlapping features in children younger than 16 years. There is a strong association of jSpA with HLA-B27 genotype, but many studies shows that other genetic factors, of which we have little or no knowledge, plays a role in the development of jSpA.

Patients and methods: In this study participated 45 children with obtained HLA genotype and diagnosis of jSpA according to ILAR criteria, as well as 11 children with other forms of JIA and 12 children without diagnosis of inflammatory disease. DNA microarray gene expression was preformed in 11 patients with jSpA and in 4 participants without diagnosis of inflammatory disease, along with bioinformatic analysis of retrieved data. Carefully selected differentially expressed genes where analyzed by qRT-PCR in all participants.

Results: Microarray results and bioinformatic analysis revealed 745 differentially expressed genes involved in various inflammatory processes in jSpA patients, while qRT-PCR analysis confirmed data universality and specificity.

Conclusion: Our findings showed that jSpA is polygenic disease with malfunction in antigen recognition and activation of immunological response, in migration of inflammatory cells and in regulation of the immune system. Results of our study can be used for further investigation of disease patophysiology and new treatment options.

10. POPIS LITERATURE

1. Loknar V. Rječnik latinskog i hrvatskog medicinskog nazivlja. Zagreb: Medicinska naklada; 2003.
2. Colbert RA. Classification of juvenile spondyloarthritis: Enthesitis-related arthritis and beyond. *Nat Rev Rheumatol* 2010;6:477-85.
3. Braun J, Bollow M, Remlinger G *i sur.* Prevalence of spondylarthropathies in HLA-B27 positive and negative blood donors. *Arthritis Rheum* 1998;41:58-67.
4. Andersson Gare B. Juvenile arthritis--who gets it, where and when? A review of current data on incidence and prevalence. *Clin Exp Rheumatol* 1999;17:367-74.
5. Saraux A, Guedes C, Allain J *i sur.* Prevalence of rheumatoid arthritis and spondyloarthropathy in Brittany, France. *Societe de Rhumatologie de l'Ouest. J Rheumatol* 1999;26:2622-7.
6. Fernandez-Sueiro JL, Alonso C, Blanco FJ, Rodriguez-Gomez M, Galdo F, Gonzalez-Gay MA. Prevalence of HLA-B27 and subtypes of HLA-B27 associated with ankylosing spondylitis in Galicia, Spain. *Clin Exp Rheumatol* 2004;22:465-8.
7. Tse SM, Laxer RM. New advances in juvenile spondyloarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2012;8:269-79.
8. Burgos-Vargas R. The juvenile-onset spondyloarthritides. *Rheum Dis Clin North Am* 2002;28:531-60, vi.
9. Burgos-Vargas R, Clark P. Axial involvement in the seronegative enthesopathy and arthropathy syndrome and its progression to ankylosing spondylitis. *J Rheumatol* 1989;16:192-7.
10. Rosenberg AM, Petty RE. A syndrome of seronegative enthesopathy and arthropathy in children. *Arthritis Rheum* 1982;25:1041-7.
11. Hafner R. [Juvenile spondarthritis. Retrospective study of 71 patients]. *Monatsschr Kinderheilkd* 1987;135:41-6.
12. Hussein A, Abdul-Khaliq H, von der Hardt H. Atypical spondyloarthritis in children: proposed diagnostic criteria. *Eur J Pediatr* 1989;148:513-7.
13. Petty RE, Southwood TR, Baum J *i sur.* Revision of the proposed classification criteria for juvenile idiopathic arthritis: Durban, 1997. *J Rheumatol* 1998;25:1991-4.
14. Petty RE, Southwood TR, Manners P *i sur.* International League of Associations for Rheumatology classification of juvenile idiopathic arthritis: second revision, Edmonton, 2001. *J Rheumatol* 2004;31:390-2.
15. Amor B, Dougados M, Mijiyawa M. [Criteria of the classification of spondylarthropathies]. *Rev Rhum Mal Osteoartic* 1990;57:85-9.
16. Amor B, Dougados M, Listrat V *i sur.* [Evaluation of the Amor criteria for spondylarthropathies and European Spondylarthropathy Study Group (ESSG). A cross-sectional analysis of 2,228 patients]. *Ann Med Interne (Paris)* 1991;142:85-9.
17. Dougados M, van der Linden S, Juhlin R *i sur.* The European Spondylarthropathy Study Group preliminary criteria for the classification of spondylarthropathy. *Arthritis Rheum* 1991;34:1218-27.
18. Bennett PH, Wood PHN. Population studies of the Rheumatic Diseases New York. 1968:456.
19. Rudwaleit M, van der Heijde D, Landewe R *i sur.* The Assessment of SpondyloArthritis International Society classification criteria for peripheral spondyloarthritis and for spondyloarthritis in general. *Ann Rheum Dis* 2011;70:25-31.

20. Joos R, Dehoorne J, Hoffman I, Mielants H, Verbruggen G, Elewaut D. Sensitivity and specificity of criteria for spondyloarthritis in children with late onset pauciarticular juvenile chronic arthritis as well as their characteristics. *Clin Exp Rheumatol* 2009;27:870-6.
21. Burgos-Vargas R, Rudwaleit M, Sieper J. The place of juvenile onset spondyloarthropathies in the Durban 1997 ILAR classification criteria of juvenile idiopathic arthritis. *International League of Associations for Rheumatology. J Rheumatol* 2002;29:869-74.
22. Cassidy JT. Textbook of pediatric rheumatology. 6. izd. Philadelphia: Saunders; 2010, str. 800.
23. Manners PJ, Bower C. Worldwide prevalence of juvenile arthritis why does it vary so much? *J Rheumatol* 2002;29:1520-30.
24. Prutki M, Tambic Bukovac L, Jelusic M, Potocki K, Kralik M, Malcic I. Retrospective study of juvenile spondylarthropathies in Croatia over the last 11 years. *Clin Exp Rheumatol* 2008;26:693-9.
25. Bowyer S, Roettcher P. Pediatric rheumatology clinic populations in the United States: results of a 3 year survey. Pediatric Rheumatology Database Research Group. *J Rheumatol* 1996;23:1968-74.
26. Malleson PN, Fung MY, Rosenberg AM. The incidence of pediatric rheumatic diseases: results from the Canadian Pediatric Rheumatology Association Disease Registry. *J Rheumatol* 1996;23:1981-7.
27. Symmons DP, Jones M, Osborne J, Sills J, Southwood TR, Woo P. Pediatric rheumatology in the United Kingdom: data from the British Pediatric Rheumatology Group National Diagnostic Register. *J Rheumatol* 1996;23:1975-80.
28. Saurenmann RK, Rose JB, Tyrrell P *i sur*. Epidemiology of juvenile idiopathic arthritis in a multiethnic cohort: ethnicity as a risk factor. *Arthritis Rheum* 2007;56:1974-84.
29. Harjacek M, Lamot L, Bukovac L, Vidovic M, Joss R. Juvenile Spondyloarthritis. U: Harjaček M, ur. *Challenges in Rheumatology: InTech*; 2011, str. 89-128.
30. Flato B, Hoffmann-Vold AM, Reiff A, Forre O, Lien G, Vinje O. Long-term outcome and prognostic factors in enthesitis-related arthritis: a case-control study. *Arthritis Rheum* 2006;54:3573-82.
31. Minden K, Niewerth M, Listing J *i sur*. Long-term outcome in patients with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2002;46:2392-401.
32. Burgos-Vargas R, Vazquez-Mellado J. The early clinical recognition of juvenile-onset ankylosing spondylitis and its differentiation from juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995;38:835-44.
33. Cabral DA, Oen KG, Petty RE. SEA syndrome revisited: a longterm followup of children with a syndrome of seronegative enthesopathy and arthropathy. *J Rheumatol* 1992;19:1282-5.
34. Burgos-Vargas R, Vazquez-Mellado J, Cassis N *i sur*. Genuine ankylosing spondylitis in children: a case-control study of patients with early definite disease according to adult onset criteria. *J Rheumatol* 1996;23:2140-7.
35. O'Shea FD, Boyle E, Riarh R, Tse SM, Laxer RM, Inman RD. Comparison of clinical and radiographic severity of juvenile-onset versus adult-onset ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2009;68:1407-12.
36. Weiss PF, Klink AJ, Behrens EM *i sur*. Enthesitis in an inception cohort of enthesitis-related arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2011.
37. Burgos-Vargas R, Pacheco-Tena C, Vazquez-Mellado J. A short-term follow-up of enthesitis and arthritis in the active phase of juvenile onset spondyloarthropathies. *Clin Exp Rheumatol* 2002;20:727-31.
38. Alvarez-Madrid C, Merino R, De Inocencio J, Garcia-Consuegra J. Tarsitis as an initial manifestation of juvenile spondyloarthropathy. *Clin Exp Rheumatol* 2009;27:691-4.

39. Jabs DA, Nussenblatt RB, Rosenbaum JT, Standardization of Uveitis Nomenclature Working G. Standardization of uveitis nomenclature for reporting clinical data. Results of the First International Workshop. *Am J Ophthalmol* 2005;140:509-16.
40. Monnet D, Breban M, Hudry C, Dougados M, Brezin AP. Ophthalmic findings and frequency of extraocular manifestations in patients with HLA-B27 uveitis: a study of 175 cases. *Ophthalmology* 2004;111:802-9.
41. Packham JC, Hall MA. Long-term follow-up of 246 adults with juvenile idiopathic arthritis: functional outcome. *Rheumatology (Oxford)* 2002;41:1428-35.
42. Petty RE, Smith JR, Rosenbaum JT. Arthritis and uveitis in children. A pediatric rheumatology perspective. *Am J Ophthalmol* 2003;135:879-84.
43. Huppertz H, Voigt I, Muller-Scholden J, Sandhage K. Cardiac manifestations in patients with HLA B27-associated juvenile arthritis. *Pediatr Cardiol* 2000;21:141-7.
44. Kean WF, Anastassiades TP, Ford PM. Aortic incompetence in HLA B27-positive juvenile arthritis. *Ann Rheum Dis* 1980;39:294-5.
45. Kim TH, Jung SS, Sohn SJ, Park MH, Kim SY. Aneurysmal dilatation of ascending aorta and aortic insufficiency in juvenile spondyloarthritis. *Scand J Rheumatol* 1997;26:218-21.
46. Stewart SR, Robbins DL, Castles JJ. Acute fulminant aortic and mitral insufficiency in ankylosing spondylitis. *N Engl J Med* 1978;299:1448-9.
47. Reid GD, Patterson MW, Patterson AC, Cooperberg PL. Aortic insufficiency in association with juvenile ankylosing spondylitis. *J Pediatr* 1979;95:78-80.
48. Gore JE, Vizcarrondo FE, Rieffel CN. Juvenile ankylosing spondylitis and aortic regurgitation: a case presentation. *Pediatrics* 1981;68:423-6.
49. Pelkonen P, Byring R, Pesonen E, Leijala M, Haapasaari J. Rapidly progressive aortic incompetence in juvenile ankylosing spondylitis: a case report. *Arthritis Rheum* 1984;27:698-700.
50. Simpson J, Borzy MS, Silberbach GM. Aortic regurgitation at diagnosis of HLA-B27 associated spondyloarthritis. *J Rheumatol* 1995;22:332-4.
51. Johnson WL, Toone E. The clinical and pathological cardiac manifestations of rheumatoid spondylitis. *Va Med Mon (1918)* 1968;95:132-40.
52. Lee SJ, Im HY, Schueller WC. HLA-B27 positive juvenile arthritis with cardiac involvement preceding sacroiliac joint changes. *Heart* 2001;86:E19.
53. Camiciottoli G, Trapani S, Ermini M, Falcini F, Pistolesi M. Pulmonary function in children affected by juvenile spondyloarthritis. *J Rheumatol* 1999;26:1382-6.
54. Reid GD, Hill RH. Atlantoaxial subluxation in juvenile ankylosing spondylitis. *J Pediatr* 1978;93:531-2.
55. Foster HE, Cairns RA, Burnell RH *i sur*. Atlantoaxial subluxation in children with seronegative enthesopathy and arthropathy syndrome: 2 case reports and a review of the literature. *J Rheumatol* 1995;22:548-51.
56. Allen RC, Petty RE, Lirenman DS, Malleson PN, Laxer RM. Renal papillary necrosis in children with chronic arthritis. *Am J Dis Child* 1986;140:20-2.
57. Ansell BM. Juvenile spondylitis and related disorders. Moll JMH, ed *Ankylosing spondylitis*. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1980.
58. Rodrigues CE, Vieira WP, Bortoluzzo AB *i sur*. Low prevalence of renal, cardiac, pulmonary, and neurological extra-articular clinical manifestations in spondyloarthritis: analysis of the Brazilian Registry of Spondyloarthritis. *Rev Bras Reumatol* 2012;52:375-83.
59. Poznanski AK. Radiological approaches to pediatric joint disease. *J Rheumatol Suppl* 1992;33:78-93.
60. Guglielmi G, Scalzo G, Cascavilla A, Carotti M, Salaffi F, Grassi W. Imaging of the sacroiliac joint involvement in seronegative spondylarthropathies. *Clin Rheumatol* 2009;28:1007-19.

61. D'Agostino MA, Aegerter P, Bechara K *i sur*. How to diagnose spondyloarthritis early? Accuracy of peripheral enthesitis detection by power Doppler ultrasonography. *Ann Rheum Dis* 2011;70:1433-40.
62. Riente L, Delle Sedie A, Filippucci E *i sur*. Ultrasound imaging for the rheumatologist IX. Ultrasound imaging in spondyloarthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2007;25:349-53.
63. Aydin SZ, Karadag O, Filippucci E *i sur*. Monitoring Achilles enthesitis in ankylosing spondylitis during TNF-alpha antagonist therapy: an ultrasound study. *Rheumatology (Oxford)* 2010;49:578-82.
64. Weber U, Maksymowych WP. Sensitivity and specificity of magnetic resonance imaging for axial spondyloarthritis. *Am J Med Sci* 2011;341:272-7.
65. Eshed I, Bollow M, McGonagle DG *i sur*. MRI of enthesitis of the appendicular skeleton in spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis* 2007;66:1553-9.
66. Braun J, Baraliakos X. Imaging of axial spondyloarthritis including ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2011;70 Suppl 1:i97-103.
67. Lamot L, Bukovac LT, Vidovic M, Frleta M, Harjacek M. The 'head-to-head' comparison of etanercept and infliximab in treating children with juvenile idiopathic arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2011;29:131-9.
68. Beukelman T, Patkar NM, Saag KG *i sur*. 2011 American College of Rheumatology recommendations for the treatment of juvenile idiopathic arthritis: initiation and safety monitoring of therapeutic agents for the treatment of arthritis and systemic features. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2011;63:465-82.
69. Davidson A, Diamond B. Autoimmune diseases. *N Engl J Med* 2001;345:340-50.
70. Rioux JD, Abbas AK. Paths to understanding the genetic basis of autoimmune disease. *Nature* 2005;435:584-9.
71. McGonagle D, McDermott MF. A proposed classification of the immunological diseases. *PLoS Med* 2006;3:e297.
72. Melis L, Elewaut D. Progress in spondylarthritis. Immunopathogenesis of spondyloarthritis: which cells drive disease? *Arthritis Res Ther* 2009;11:233.
73. Schiellerup P, Krogfelt KA, Locht H. A comparison of self-reported joint symptoms following infection with different enteric pathogens: effect of HLA-B27. *J Rheumatol* 2008;35:480-7.
74. Birnbaum J, Bartlett JG, Gelber AC. Clostridium difficile: an under-recognized cause of reactive arthritis? *Clin Rheumatol* 2008;27:253-5.
75. Gerard HC, Whittum-Hudson JA, Carter JD, Hudson AP. The pathogenic role of Chlamydia in spondyloarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2010;22:363-7.
76. Harjacek M, Ostojic J, Djakovic Rode O. Juvenile spondyloarthropathies associated with Mycoplasma pneumoniae infection. *Clin Rheumatol* 2006;25:470-5.
77. Leirisalo-Repo M. Early arthritis and infection. *Curr Opin Rheumatol* 2005;17:433-9.
78. Hacquard-Bouder C, Ittah M, Breban M. Animal models of HLA-B27-associated diseases: new outcomes. *Joint Bone Spine* 2006;73:132-8.
79. Murphy KM, Ouyang W, Farrar JD *i sur*. Signaling and transcription in T helper development. *Annu Rev Immunol* 2000;18:451-94.
80. Wilson NJ, Boniface K, Chan JR *i sur*. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 2007;8:950-7.
81. Poddubnyy D, Appel H, Sieper J. Investigation of involved tissue in axial spondyloarthritis--what have we learnt from immunohistochemical studies? *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2010;24:715-9.
82. Sukumaran S, Marzan K, Shaham B, Church JA. A child with x-linked agammaglobulinemia and enthesitis-related arthritis. *Int J Rheumatol* 2011;2011:175973.

83. Kinsella TD, Espinoza L, Vasey FB. Serum complement and immunoglobulin levels in sporadic and familial ankylosing spondylitis. *J Rheumatol* 1975;2:308-13.
84. Veys EM, van Leare M. Serum IgG, IgM, and IgA levels in ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 1973;32:493-6.
85. Cowling P, Ebringer R, Ebringer A. Association of inflammation with raised serum IgA in ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 1980;39:545-9.
86. Wellcome Trust Case Control C, Australo-Anglo-American Spondylitis C, Burton PR *i sur*. Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants. *Nat Genet* 2007;39:1329-37.
87. Rahman P, Inman RD, Gladman DD, Reeve JP, Peddle L, Maksymowych WP. Association of interleukin-23 receptor variants with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 2008;58:1020-5.
88. Rueda B, Orozco G, Raya E *i sur*. The IL23R Arg381Gln non-synonymous polymorphism confers susceptibility to ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2008;67:1451-4.
89. Jandus C, Bioley G, Rivals JP, Dudler J, Speiser D, Romero P. Increased numbers of circulating polyfunctional Th17 memory cells in patients with seronegative spondylarthritides. *Arthritis Rheum* 2008;58:2307-17.
90. Singh R, Aggarwal A, Misra R. Th1/Th17 cytokine profiles in patients with reactive arthritis/undifferentiated spondyloarthropathy. *J Rheumatol* 2007;34:2285-90.
91. Mahendra A, Misra R, Aggarwal A. Th1 and Th17 Predominance in the Enthesitis-related Arthritis Form of Juvenile Idiopathic Arthritis. *J Rheumatol* 2009;36:1730-6.
92. Boissier MC, Assier E, Biton J, Denys A, Falgarone G, Bessis N. Regulatory T cells (Treg) in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 2009;76:10-4.
93. de Kleer IM, Wedderburn LR, Taams LS *i sur*. CD4+CD25bright regulatory T cells actively regulate inflammation in the joints of patients with the remitting form of juvenile idiopathic arthritis. *J Immunol* 2004;172:6435-43.
94. Nistala K, Wedderburn LR. Th17 and regulatory T cells: rebalancing pro- and anti-inflammatory forces in autoimmune arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2009;48:602-6.
95. Ambarus C, Yermenko N, Tak PP, Baeten D. Pathogenesis of spondyloarthritis: autoimmune or autoinflammatory? *Curr Opin Rheumatol* 2012;24:351-8.
96. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008;8:958-69.
97. Tak PP, Smeets TJ, Daha MR *i sur*. Analysis of the synovial cell infiltrate in early rheumatoid synovial tissue in relation to local disease activity. *Arthritis Rheum* 1997;40:217-25.
98. Baeten D, Kruithof E, De Rycke L *i sur*. Infiltration of the synovial membrane with macrophage subsets and polymorphonuclear cells reflects global disease activity in spondyloarthropathy. *Arthritis Res Ther* 2005;7:R359-69.
99. Haringman JJ, Gerlag DM, Zwinderman AH *i sur*. Synovial tissue macrophages: a sensitive biomarker for response to treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005;64:834-8.
100. Kruithof E, Baeten D, Van den Bosch F, Mielants H, Veys EM, De Keyser F. Histological evidence that infliximab treatment leads to downregulation of inflammation and tissue remodelling of the synovial membrane in spondyloarthropathy. *Ann Rheum Dis* 2005;64:529-36.
101. Baeten D, Kruithof E, Van den Bosch F *i sur*. Immunomodulatory effects of anti-tumor necrosis factor alpha therapy on synovium in spondylarthropathy: histologic findings in eight patients from an open-label pilot study. *Arthritis Rheum* 2001;44:186-95.

102. Kruithof E, De Rycke L, Vandooren B *i sur*. Identification of synovial biomarkers of response to experimental treatment in early-phase clinical trials in spondylarthritis. *Arthritis Rheum* 2006;54:1795-804.
103. Baeten D, Moller HJ, Delanghe J, Veys EM, Moestrup SK, De Keyser F. Association of CD163+ macrophages and local production of soluble CD163 with decreased lymphocyte activation in spondylarthropathy synovitis. *Arthritis Rheum* 2004;50:1611-23.
104. Fonseca JE, Edwards JC, Blades S, Goulding NJ. Macrophage subpopulations in rheumatoid synovium: reduced CD163 expression in CD4+ T lymphocyte-rich microenvironments. *Arthritis Rheum* 2002;46:1210-6.
105. Baeten D, Demetter P, Cuvelier CA *i sur*. Macrophages expressing the scavenger receptor CD163: a link between immune alterations of the gut and synovial inflammation in spondyloarthropathy. *J Pathol* 2002;196:343-50.
106. Vandooren B, Noordenbos T, Ambarus C *i sur*. Absence of a classically activated macrophage cytokine signature in peripheral spondylarthritis, including psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum* 2009;60:966-75.
107. Smith JA, Barnes MD, Hong D, DeLay ML, Inman RD, Colbert RA. Gene expression analysis of macrophages derived from ankylosing spondylitis patients reveals interferon-gamma dysregulation. *Arthritis Rheum* 2008;58:1640-9.
108. Sieper J. Spondyloarthropathies in 2010: new insights into therapy-TNF blockade and beyond. *Nat Rev Rheumatol* 2011;7:78-80.
109. Kruithof E, De Rycke L, Roth J *i sur*. Immunomodulatory effects of etanercept on peripheral joint synovitis in the spondylarthropathies. *Arthritis Rheum* 2005;52:3898-909.
110. Sims AM, Timms AE, Bruges-Armas J *i sur*. Prospective meta-analysis of interleukin 1 gene complex polymorphisms confirms associations with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2008;67:1305-9.
111. Hueber AJ, Asquith DL, Miller AM *i sur*. Mast cells express IL-17A in rheumatoid arthritis synovium. *J Immunol* 2010;184:3336-40.
112. Appel H, Maier R, Wu P *i sur*. Analysis of IL-17+ cells in facet joints of patients with spondyloarthritis suggests that the innate immune pathway might be of greater relevance than the Th17-mediated adaptive immune response. *Arthritis Res Ther* 2011;13:R95.
113. Moran EM, Heydrich R, Ng CT *i sur*. IL-17A expression is localised to both mononuclear and polymorphonuclear synovial cell infiltrates. *PLoS One* 2011;6:e24048.
114. Patel DD, Lee DM, Kolbinger F, Antoni C. Effect of IL-17A blockade with secukinumab in autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis* 2012.
115. Qian BF, Tonkonogy SL, Sartor RB. Aberrant innate immune responses in TLR-ligand activated HLA-B27 transgenic rat cells. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:1358-65.
116. Stebbings SM, Taylor C, Tannock GW, Baird MA, Highton J. The immune response to autologous bacteroides in ankylosing spondylitis is characterized by reduced interleukin 10 production. *J Rheumatol* 2009;36:797-800.
117. Kular J, Tickner J, Chim SM, Xu J. An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. *Clin Biochem* 2012;45:863-73.
118. Agarwal S, Misra R, Aggarwal A. Synovial fluid RANKL and matrix metalloproteinase levels in enthesitis related arthritis subtype of juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatol Int* 2009;29:907-11.
119. Dougados M, Baeten D. Spondyloarthritis. *Lancet* 2011;377:2127-37.
120. Schett G, Gravallese E. Bone erosion in rheumatoid arthritis: mechanisms, diagnosis and treatment. *Nat Rev Rheumatol* 2012;8:656-64.
121. Jacques P, Mielants H, De Vos M, Elewaut D. Spondyloarthropathies: progress and challenges. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2008;22:325-37.

122. Ball J. Enthesopathy of rheumatoid and ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 1971;30:213-23.
123. Benjamin M, Moriggl B, Brenner E, Emery P, McGonagle D, Redman S. The "enthesitis organ" concept: why enthesopathies may not present as focal insertional disorders. *Arthritis Rheum* 2004;50:3306-13.
124. Benjamin M, Toumi H, Suzuki D, Redman S, Emery P, McGonagle D. Microdamage and altered vascularity at the enthesitis-bone interface provides an anatomic explanation for bone involvement in the HLA-B27-associated spondylarthritides and allied disorders. *Arthritis Rheum* 2007;56:224-33.
125. McGonagle D, Marzo-Ortega H, O'Connor P *i sur*. Histological assessment of the early enthesitis lesion in spondyloarthropathy. *Ann Rheum Dis* 2002;61:534-7.
126. McGonagle D, Lories RJ, Tan AL, Benjamin M. The concept of a "synovio-enthesal complex" and its implications for understanding joint inflammation and damage in psoriatic arthritis and beyond. *Arthritis Rheum* 2007;56:2482-91.
127. McGonagle D, Aydin SZ, Tan AL. The synovio-enthesal complex and its role in tendon and capsular associated inflammation. *J Rheumatol Suppl* 2012;89:11-4.
128. Luis Carlos Junqueira JC, Robert O. Kelley. *Osnove Histologije*. Zagreb: Školska knjiga d.d.; 1994.
129. Fitzgerald O, Bresnahan B. Synovial membrane cellularity and vascularity. *Ann Rheum Dis* 1995;54:511-5.
130. Simkin PA. Synovial perfusion and synovial fluid solutes. *Ann Rheum Dis* 1995;54:424-8.
131. Baeten D, Demetter P, Cuvelier C *i sur*. Comparative study of the synovial histology in rheumatoid arthritis, spondyloarthropathy, and osteoarthritis: influence of disease duration and activity. *Ann Rheum Dis* 2000;59:945-53.
132. Kruithof E, Van den Bossche V, De Rycke L *i sur*. Distinct synovial immunopathologic characteristics of juvenile-onset spondylarthritis and other forms of juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2006;54:2594-604.
133. Baeten D, De Keyser F. The histopathology of spondyloarthropathy. *Curr Mol Med* 2004;4:1-12.
134. Jacques P, Elewaut D. Joint expedition: linking gut inflammation to arthritis. *Mucosal Immunol* 2008;1:364-71.
135. Mielants H, Veys EM, Cuvelier C, De Vos M. Course of gut inflammation in spondyloarthropathies and therapeutic consequences. *Baillieres Clin Rheumatol* 1996;10:147-64.
136. Schatteman L, Mielants H, Veys EM *i sur*. Gut inflammation in psoriatic arthritis: a prospective ileocolonoscopy study. *J Rheumatol* 1995;22:680-3.
137. Mielants H, Veys EM, Joos R, Cuvelier C, De Vos M, Proot F. Late onset pauciarticular juvenile chronic arthritis: relation to gut inflammation. *J Rheumatol* 1987;14:459-65.
138. Mielants H, Veys EM, Cuvelier C *i sur*. Gut inflammation in children with late onset pauciarticular juvenile chronic arthritis and evolution to adult spondyloarthropathy--a prospective study. *J Rheumatol* 1993;20:1567-72.
139. Mielants H, Veys EM, Joos R, Cuvelier C, De Vos M. Repeat ileocolonoscopy in reactive arthritis. *J Rheumatol* 1987;14:456-8.
140. Mielants H, Veys EM, De Vos M *i sur*. The evolution of spondyloarthropathies in relation to gut histology. I. Clinical aspects. *J Rheumatol* 1995;22:2266-72.
141. Stoll ML, Punaro M, Patel AS. Fecal calprotectin in children with the enthesitis-related arthritis subtype of juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol* 2011;38:2274-5.
142. Jacques P, Elewaut D, Mielants H. Interactions between gut inflammation and arthritis/spondylitis. *Curr Opin Rheumatol* 2010;22:368-74.

143. Cepek KL, Shaw SK, Parker CM *i sur*. Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the alpha E beta 7 integrin. *Nature* 1994;372:190-3.
144. Elewaut D, De Keyser F, Van Den Bosch F *i sur*. Enrichment of T cells carrying beta7 integrins in inflamed synovial tissue from patients with early spondyloarthropathy, compared to rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1998;25:1932-7.
145. Demetter P, De Vos M, Van Huysse JA *i sur*. Colon mucosa of patients both with spondyloarthritis and Crohn's disease is enriched with macrophages expressing the scavenger receptor CD163. *Ann Rheum Dis* 2005;64:321-4.
146. Kontoyiannis D, Pasparakis M, Pizarro TT, Cominelli F, Kollias G. Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies. *Immunity* 1999;10:387-98.
147. Armaka M, Apostolaki M, Jacques P, Kontoyiannis DL, Elewaut D, Kollias G. Mesenchymal cell targeting by TNF as a common pathogenic principle in chronic inflammatory joint and intestinal diseases. *J Exp Med* 2008;205:331-7.
148. Brown MA. Breakthroughs in genetic studies of ankylosing spondylitis. *Rheumatology (Oxford)* 2008;47:132-7.
149. Choo SY. The HLA system: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. *Yonsei Med J* 2007;48:11-23.
150. Reveille JD, Maganti RM. Subtypes of HLA-B27: history and implications in the pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Adv Exp Med Biol* 2009;649:159-76.
151. Thomas GP, Brown MA. Genetics and genomics of ankylosing spondylitis. *Immunol Rev* 2010;233:162-80.
152. Ehrenfeld M. Geoepidemiology: the environment and spondyloarthropathies. *Autoimmun Rev* 2010;9:A325-9.
153. Thomson W, Barrett JH, Donn R *i sur*. Juvenile idiopathic arthritis classified by the ILAR criteria: HLA associations in UK patients. *Rheumatology (Oxford)* 2002;41:1183-9.
154. Stanevicha V, Eglite J, Zavadskā D *i sur*. HLA B27 allele types in homogeneous groups of juvenile idiopathic arthritis patients in Latvia. *Pediatr Rheumatol Online J* 2010;8:26.
155. Hammer RE, Maika SD, Richardson JA, Tang JP, Taurog JD. Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human beta 2m: an animal model of HLA-B27-associated human disorders. *Cell* 1990;63:1099-112.
156. Hermann E, Yu DT, Meyer zum Buschenfelde KH, Fleischer B. HLA-B27-restricted CD8 T cells derived from synovial fluids of patients with reactive arthritis and ankylosing spondylitis. *Lancet* 1993;342:646-50.
157. May E, Dorris ML, Satumtira N *i sur*. CD8 alpha beta T cells are not essential to the pathogenesis of arthritis or colitis in HLA-B27 transgenic rats. *J Immunol* 2003;170:1099-105.
158. Taurog JD, Dorris ML, Satumtira N *i sur*. Spondylarthritis in HLA-B27/human beta2-microglobulin-transgenic rats is not prevented by lack of CD8. *Arthritis Rheum* 2009;60:1977-84.
159. Allen RL, O'Callaghan CA, McMichael AJ, Bowness P. Cutting edge: HLA-B27 can form a novel beta 2-microglobulin-free heavy chain homodimer structure. *J Immunol* 1999;162:5045-8.
160. Kollnberger S, Bowness P. The role of B27 heavy chain dimer immune receptor interactions in spondyloarthritis. *Adv Exp Med Biol* 2009;649:277-85.
161. Brown MA. Genetics of ankylosing spondylitis. *Curr Opin Rheumatol* 2010;22:126-32.
162. Colbert RA, DeLay ML, Layh-Schmitt G, Sowders DP. HLA-B27 misfolding and spondyloarthropathies. *Prion* 2009;3:15-26.

163. Goodall JC, Wu C, Zhang Y *i sur*. Endoplasmic reticulum stress-induced transcription factor, CHOP, is crucial for dendritic cell IL-23 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:17698-703.
164. DeLay ML, Turner MJ, Klenk EI, Smith JA, Sowders DP, Colbert RA. HLA-B27 misfolding and the unfolded protein response augment interleukin-23 production and are associated with Th17 activation in transgenic rats. *Arthritis Rheum* 2009;60:2633-43.
165. Zeng L, Lindstrom MJ, Smith JA. Ankylosing spondylitis macrophage production of higher levels of interleukin-23 in response to lipopolysaccharide without induction of a significant unfolded protein response. *Arthritis Rheum* 2011;63:3807-17.
166. Reynolds TL, Khan MA. B7 crossreactive antigens in spondyloarthropathies. *J Rheumatol* 1988;15:1454.
167. Cedoz JP, Wendling D, Viel JF. The B7 cross reactive group and spondyloarthropathies: an epidemiological approach. *J Rheumatol* 1995;22:1884-90.
168. el-Zaatari FA, Taurog JD. In vitro mutagenesis of HLA-B27: single and multiple amino acid substitutions at consensus B27 sites identify distinct monoclonal antibody-defined epitopes. *Hum Immunol* 1992;33:243-8.
169. Grubic Z, Zunec R, Cecuk-Jelicic E, Kerhin-Brkljacic V, Kastelan A. Polymorphism of HLA-A, -B, -DRB1, -DQA1 and -DQB1 haplotypes in a Croatian population. *Eur J Immunogenet* 2000;27:47-51.
170. Grubic Z, Kerhin-Brkljacic V, Peric P, Cecuk-Jelicic E, Zunec R, Kastelan A. HLA-B27 subtypes in Croatian patients with ankylosing spondylitis. *Scand J Rheumatol* 2001;30:51-2.
171. Harjacek M, Margetic T, Kerhin-Brkljacic V, Martinez N, Grubic Z. HLA-B*27/HLA-B*07 in combination with D6S273-134 allele is associated with increased susceptibility to juvenile spondyloarthropathies. *Clin Exp Rheumatol* 2008;26:498-504.
172. Prahalad S, Glass DN. A comprehensive review of the genetics of juvenile idiopathic arthritis. *Pediatr Rheumatol Online J* 2008;6:11.
173. Frei R, Steinle J, Birchler T *i sur*. MHC class II molecules enhance Toll-like receptor mediated innate immune responses. *PLoS One* 2010;5:e8808.
174. Reveille JD. The genetic basis of spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis* 2011;70 Suppl 1:i44-50.
175. van der Linden SM, Valkenburg HA, de Jongh BM, Cats A. The risk of developing ankylosing spondylitis in HLA-B27 positive individuals. A comparison of relatives of spondylitis patients with the general population. *Arthritis Rheum* 1984;27:241-9.
176. Reveille JD. Genetics of spondyloarthritis--beyond the MHC. *Nat Rev Rheumatol* 2012;8:296-304.
177. Jorde LB, Wooding SP. Genetic variation, classification and 'race'. *Nat Genet* 2004;36:S28-33.
178. Altmuller J, Palmer LJ, Fischer G, Scherb H, Wjst M. Genomewide scans of complex human diseases: true linkage is hard to find. *Am J Hum Genet* 2001;69:936-50.
179. Dawn Teare M, Barrett JH. Genetic linkage studies. *Lancet* 2005;366:1036-44.
180. Cordell HJ, Clayton DG. Genetic association studies. *Lancet* 2005;366:1121-31.
181. Manolio TA. Genomewide association studies and assessment of the risk of disease. *N Engl J Med* 2010;363:166-76.
182. Bush WS, Moore JH. Chapter 11: Genome-wide association studies. *PLoS Comput Biol* 2012;8:e1002822.
183. Griffith OL, Montgomery SB, Bernier B *i sur*. ORegAnno: an open-access community-driven resource for regulatory annotation. *Nucleic Acids Res* 2008;36:D107-13.
184. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC *i sur*. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 2001;409:928-33.

185. International HapMap C, Frazer KA, Ballinger DG *i sur.* A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* 2007;449:851-61.
186. International HapMap C. A haplotype map of the human genome. *Nature* 2005;437:1299-320.
187. International HapMap C, Altshuler DM, Gibbs RA *i sur.* Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations. *Nature* 2010;467:52-8.
188. Genomes Project C, Abecasis GR, Auton A *i sur.* An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* 2012;491:56-65.
189. Naidoo N, Pawitan Y, Soong R, Cooper DN, Ku CS. Human genetics and genomics a decade after the release of the draft sequence of the human genome. *Hum Genomics* 2011;5:577-622.
190. Pollock JD. Gene expression profiling: methodological challenges, results, and prospects for addiction research. *Chem Phys Lipids* 2002;121:241-56.
191. Crick F. Central dogma of molecular biology. *Nature* 1970;227:561-3.
192. Frith MC, Pheasant M, Mattick JS. The amazing complexity of the human transcriptome. *Eur J Hum Genet* 2005;13:894-7.
193. Clamp M, Fry B, Kamal M *i sur.* Distinguishing protein-coding and noncoding genes in the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:19428-33.
194. Consortium EP, Dunham I, Kundaje A *i sur.* An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 2012;489:57-74.
195. Ecker JR, Bickmore WA, Barroso I, Pritchard JK, Gilad Y, Segal E. Genomics: ENCODE explained. *Nature* 2012;489:52-5.
196. Rivera RM, Bennett LB. Epigenetics in humans: an overview. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2010;17:493-9.
197. Johnson JM, Castle J, Garrett-Engele P *i sur.* Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays. *Science* 2003;302:2141-4.
198. Wang GS, Cooper TA. Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nat Rev Genet* 2007;8:749-61.
199. Thomas M, Lieberman J, Lal A. Desperately seeking microRNA targets. *Nat Struct Mol Biol* 2010;17:1169-74.
200. Houry GA, Baliban RC, Floudas CA. Proteome-wide post-translational modification statistics: frequency analysis and curation of the swiss-prot database. *Sci Rep* 2011;1.
201. Baker M. Proteomics: The interaction map. *Nature* 2012;484:271-5.
202. Cox J, Mann M. Is proteomics the new genomics? *Cell* 2007;130:395-8.
203. Altelaar AF, Munoz J, Heck AJ. Next-generation proteomics: towards an integrative view of proteome dynamics. *Nat Rev Genet* 2013;14:35-48.
204. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975;98:503-17.
205. Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74:5350-4.
206. Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 1981;112:195-203.
207. Kafatos FC, Jones CW, Efstratiadis A. Determination of nucleic acid sequence homologies and relative concentrations by a dot hybridization procedure. *Nucleic Acids Res* 1979;7:1541-52.
208. Dufva M. Introduction to microarray technology. *Methods Mol Biol* 2009;529:1-22.
209. Jelušić M, Malčić I, ur. *Pedijatrijska reumatologija*. Zagreb: Medicinska naklada; 2014, str. 370.

210. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995;270:467-70.
211. Bilitewski U. DNA microarrays: an introduction to the technology. *Methods Mol Biol* 2009;509:1-14.
212. Hegde P, Qi R, Abernathy K *i sur*. A concise guide to cDNA microarray analysis. *Biotechniques* 2000;29:548-50, 52-4, 56 passim.
213. Schulze A, Downward J. Navigating gene expression using microarrays--a technology review. *Nat Cell Biol* 2001;3:E190-5.
214. Ehrenreich A. DNA microarray technology for the microbiologist: an overview. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006;73:255-73.
215. Dalma-Weiszhausz DD, Warrington J, Tanimoto EY, Miyada CG. The affymetrix GeneChip platform: an overview. *Methods Enzymol* 2006;410:3-28.
216. Madabusi LV, Latham GJ, Andruss BF. RNA extraction for arrays. *Methods Enzymol* 2006;411:1-14.
217. Mesko B, Poliska S, Nagy L. Gene expression profiles in peripheral blood for the diagnosis of autoimmune diseases. *Trends Mol Med* 2011;17:223-33.
218. Schroeder A, Mueller O, Stocker S *i sur*. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol* 2006;7:3.
219. Wildsmith SE, Archer GE, Winkley AJ, Lane PW, Bugelski PJ. Maximization of signal derived from cDNA microarrays. *Biotechniques* 2001;30:202-6, 8.
220. Reiner A, Yekutieli D, Benjamini Y. Identifying differentially expressed genes using false discovery rate controlling procedures. *Bioinformatics* 2003;19:368-75.
221. Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J *i sur*. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat Genet* 2001;29:365-71.
222. Ball CA, Brazma A. MGED standards: work in progress. *OMICS* 2006;10:138-44.
223. Spellman PT, Miller M, Stewart J *i sur*. Design and implementation of microarray gene expression markup language (MAGE-ML). *Genome Biol* 2002;3:RESEARCH0046.
224. Rayner TF, Rocca-Serra P, Spellman PT *i sur*. A simple spreadsheet-based, MIAME-supportive format for microarray data: MAGE-TAB. *BMC Bioinformatics* 2006;7:489.
225. Breitling R. Biological microarray interpretation: the rules of engagement. *Biochim Biophys Acta* 2006;1759:319-27.
226. Brazma A, Vilo J. Gene expression data analysis. *Microbes Infect* 2001;3:823-9.
227. Iris Hovatta KK, Antti Lehmussola, Juha Saharinen, Pekka Tiikkainen, M. Minna Laine, Tomi Pasanen, Janna Saarela, Ilana Saarikko, Teemu Toivanen, Martti Tolvanen, Jarno Tuimala, Mauno Vihinen, Garry Wong. Helsinki: CSC - Scientific Computing Ltd.; 2005.
228. Ashburner M, Ball CA, Blake JA *i sur*. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 2000;25:25-9.
229. Khatry P, Draghici S. Ontological analysis of gene expression data: current tools, limitations, and open problems. *Bioinformatics* 2005;21:3587-95.
230. Barabasi AL, Oltvai ZN. Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nat Rev Genet* 2004;5:101-13.
231. Price ND, Shmulevich I. Biochemical and statistical network models for systems biology. *Curr Opin Biotechnol* 2007;18:365-70.
232. Ramanan VK, Shen L, Moore JH, Saykin AJ. Pathway analysis of genomic data: concepts, methods, and prospects for future development. *Trends Genet* 2012;28:323-32.
233. Minguez P, Dopazo J. Functional genomics and networks: new approaches in the extraction of complex gene modules. *Expert Rev Proteomics* 2010;7:55-63.
234. Ghosh S, Matsuoka Y, Asai Y, Hsin KY, Kitano H. Software for systems biology: from tools to integrated platforms. *Nat Rev Genet* 2011;12:821-32.

235. Chuaqui RF, Bonner RF, Best CJ *i sur*. Post-analysis follow-up and validation of microarray experiments. *Nat Genet* 2002;32 Suppl:509-14.
236. Dallas PB, Gottardo NG, Firth MJ *i sur*. Gene expression levels assessed by oligonucleotide microarray analysis and quantitative real-time RT-PCR -- how well do they correlate? *BMC Genomics* 2005;6:59.
237. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 2005;39:75-85.
238. Gu J, Marker-Hermann E, Baeten D *i sur*. A 588-gene microarray analysis of the peripheral blood mononuclear cells of spondyloarthropathy patients. *Rheumatology (Oxford)* 2002;41:759-66.
239. Gu J, Rihl M, Marker-Hermann E *i sur*. Clues to pathogenesis of spondyloarthropathy derived from synovial fluid mononuclear cell gene expression profiles. *J Rheumatol* 2002;29:2159-64.
240. Sharma SM, Choi D, Planck SR *i sur*. Insights in to the pathogenesis of axial spondyloarthropathy based on gene expression profiles. *Arthritis Res Ther* 2009;11:R168.
241. Gu J, Wei YL, Wei JC *i sur*. Identification of RGS1 as a candidate biomarker for undifferentiated spondylarthritis by genome-wide expression profiling and real-time polymerase chain reaction. *Arthritis Rheum* 2009;60:3269-79.
242. Duan R, Leo P, Bradbury L, Brown MA, Thomas G. Gene expression profiling reveals a downregulation in immune-associated genes in patients with AS. *Ann Rheum Dis* 2010;69:1724-9.
243. Assassi S, Reveille JD, Arnett FC *i sur*. Whole-blood gene expression profiling in ankylosing spondylitis shows upregulation of toll-like receptor 4 and 5. *J Rheumatol* 2011;38:87-98.
244. Pimentel-Santos FM, Ligeiro D, Matos M *i sur*. Whole blood transcriptional profiling in ankylosing spondylitis identifies novel candidate genes that might contribute to the inflammatory and tissue-destructive disease aspects. *Arthritis Res Ther* 2011;13:R57.
245. Barnes MG, Aronow BJ, Luyrink LK *i sur*. Gene expression in juvenile arthritis and spondyloarthropathy: pro-angiogenic ELR+ chemokine genes relate to course of arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2004;43:973-9.
246. Barnes MG, Grom AA, Thompson SD *i sur*. Subtype-specific peripheral blood gene expression profiles in recent-onset juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2009;60:2102-12.
247. Golding DN. Hematology and biochemistry of ankylosing spondylitis. *Br Med J* 1973;2:663.
248. Braun J, Bollow M, Neure L *i sur*. Use of immunohistologic and in situ hybridization techniques in the examination of sacroiliac joint biopsy specimens from patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 1995;38:499-505.
249. Myles A, Tuteja A, Aggarwal A. Synovial fluid mononuclear cell gene expression profiling suggests dysregulation of innate immune genes in enthesitis-related arthritis patients. *Rheumatology (Oxford)* 2012;51:1785-9.
250. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 2009;4:44-57.
251. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK *i sur*. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:15545-50.
252. Javierre BM, Hernando H, Ballestar E. Environmental triggers and epigenetic deregulation in autoimmune disease. *Discov Med* 2011;12:535-45.
253. Pastinen T, Ge B, Hudson TJ. Influence of human genome polymorphism on gene expression. *Hum Mol Genet* 2006;15 Spec No 1:R9-16.

254. Berridge, M.J. (2012) Cell Signalling Biology; doi:10.1042/csb0001002.
255. Harjacek M. Autoinflammatory Diseases. *Pediatr Croat* 2009;110-6.
256. Villani AC, Lemire M, Fortin G *i sur*. Common variants in the NLRP3 region contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat Genet* 2009;41:71-6.
257. Myles A, Aggarwal A. Expression of Toll-like receptors 2 and 4 is increased in peripheral blood and synovial fluid monocytes of patients with enthesitis-related arthritis subtype of juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2011;50:481-8.
258. Myles A, Aggarwal A. Lack of association of single nucleotide polymorphisms in toll-like receptors 2 and 4 with enthesitis-related arthritis category of juvenile idiopathic arthritis in Indian population. *Rheumatol Int* 2013;33:417-21.
259. Triantafilou M, Lepper PM, Briault CD *i sur*. Chemokine receptor 4 (CXCR4) is part of the lipopolysaccharide "sensing apparatus". *Eur J Immunol* 2008;38:192-203.
260. Werner L, Guzner-Gur H, Dotan I. Involvement of CXCR4/CXCR7/CXCL12 Interactions in Inflammatory bowel disease. *Theranostics* 2013;3:40-6.
261. Koelink PJ, Overbeek SA, Braber S *i sur*. Targeting chemokine receptors in chronic inflammatory diseases: an extensive review. *Pharmacol Ther* 2012;133:1-18.
262. Tamura M, Sato MM, Nashimoto M. Regulation of CXCL12 expression by canonical Wnt signaling in bone marrow stromal cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2011;43:760-7.
263. Sengupta S, Schiff R, Katzenellenbogen BS. Post-transcriptional regulation of chemokine receptor CXCR4 by estrogen in HER2 overexpressing, estrogen receptor-positive breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2009;117:243-51.
264. Hermiston ML, Zikherman J, Zhu JW. CD45, CD148, and Lyp/Pep: critical phosphatases regulating Src family kinase signaling networks in immune cells. *Immunol Rev* 2009;228:288-311.
265. Stanford SM, Rapini N, Bottini N. Regulation of TCR signalling by tyrosine phosphatases: from immune homeostasis to autoimmunity. *Immunology* 2012;137:1-19.
266. Alonso A, Sasin J, Bottini N *i sur*. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* 2004;117:699-711.
267. Veillette A, Rhee I, Souza CM, Davidson D. PEST family phosphatases in immunity, autoimmunity, and autoinflammatory disorders. *Immunol Rev* 2009;228:312-24.
268. Burn GL, Svensson L, Sanchez-Blanco C, Saini M, Cope AP. Why is PTPN22 a good candidate susceptibility gene for autoimmune disease? *FEBS Lett* 2011;585:3689-98.
269. Eleniste PP, Du L, Shivanna M, Bruzzaniti A. Dynamin and PTP-PEST cooperatively regulate Pyk2 dephosphorylation in osteoclasts. *Int J Biochem Cell Biol* 2012;44:790-800.
270. Zhang P, Liu X, Li Y *i sur*. Protein tyrosine phosphatase with proline-glutamine-serine-threonine-rich motifs negatively regulates TLR-triggered innate responses by selectively inhibiting IkappaB kinase beta/NF-kappaB activation. *J Immunol* 2013;190:1685-94.
271. Xunyi Y, Zhentao Y, Dandan J, Funian L. Clinicopathological significance of PTPN12 expression in human breast cancer. *Braz J Med Biol Res* 2012;45:1334-40.
272. Kawasaki E, Hutton JC, Eisenbarth GS. Molecular cloning and characterization of the human transmembrane protein tyrosine phosphatase homologue, phogrin, an autoantigen of type 1 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;227:440-7.
273. Caunt CJ, Keyse SM. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs): shaping the outcome of MAP kinase signalling. *FEBS J* 2013;280:489-504.
274. Bromberg-White JL, Andersen NJ, Duesbery NS. MEK genomics in development and disease. *Brief Funct Genomics* 2012;11:300-10.
275. Ito M, Yoshioka K, Akechi M *i sur*. JSAP1, a novel jun N-terminal protein kinase (JNK)-binding protein that functions as a Scaffold factor in the JNK signaling pathway. *Mol Cell Biol* 1999;19:7539-48.

276. Yamaguchi T, Miyashita C, Koyano S *i sur*. JNK-binding protein 1 regulates NF-kappaB activation through TRAF2 and TAK1. *Cell Biol Int* 2009;33:364-8.
277. Croft M. Control of immunity by the TNFR-related molecule OX40 (CD134). *Annu Rev Immunol* 2010;28:57-78.
278. Karulf M, Kelly A, Weinberg AD, Gold JA. OX40 ligand regulates inflammation and mortality in the innate immune response to sepsis. *J Immunol* 2010;185:4856-62.
279. Sinistro A, Almerighi C, Ciaprini C *i sur*. Downregulation of CD40 ligand response in monocytes from sepsis patients. *Clin Vaccine Immunol* 2008;15:1851-8.
280. Thomas T, Voss AK. The diverse biological roles of MYST histone acetyltransferase family proteins. *Cell Cycle* 2007;6:696-704.
281. Perez-Campo FM, Costa G, Lie-a-Ling M, Kouskoff V, Lacaud G. The MYSTerious MOZ, a histone acetyltransferase with a key role in haematopoiesis. *Immunology* 2013;139:161-5.
282. Voss AK, Vanyai HK, Collin C *i sur*. MOZ regulates the Tbx1 locus, and Moz mutation partially phenocopies DiGeorge syndrome. *Dev Cell* 2012;23:652-63.
283. Allison DB, Cui X, Page GP, Sabripour M. Microarray data analysis: from disarray to consolidation and consensus. *Nat Rev Genet* 2006;7:55-65.

11. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 08.06.1983. u Zagrebu. Po završetku XV. gimnazije, upisao sam Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu koji sam završio 2007. godine. Pripravnički staž odradio sam u OB Zabok. Od 2008. godine znanstveni sam novak na projektu “Uloga biomarkera u patofiziologiji seronegativnih spondiloartropatija”, voditelja prof. dr. sc. Miroslava Harjačeka. Iste godine upisao sam doktorski studij “Biomedicina i zdravstvo”, a 2010. godine započeo sam specijalizaciju iz pedijatrije. Sudjelovao sam u izvođenju dodiplomske nastave iz modula “Muskuloskeletne bolesti” i “*Clinical Integrated Module*” te predmeta “*Back to basics*”. Od 2008. do 2011. bio sam stručni suradnik u Srednjoj školi Pregrada. Od 2008. godine član sam Europskog društva za dječju reumatologiju te Hrvatske liječničke komore, od 2011. Hrvatskog društva za medicinsku genetiku, od 2012. Hrvatskog pedijatrijskog društva, a od 2013. Hrvatskog liječničkog zbora i Hrvatskog imunološkog društva. Aktivno sam sudjelovao na desetak međunarodnih i dva domaća kongresa te sedam međunarodnih tečaja iz područja reumatologije i pedijatrije. Prvi sam autor dva rada objavljena u časopisima indeksiranim u *Current Contents* te jednog u časopisu indeksiranom u MEDLINE bazi podataka. Za jedan od radova primio sam “Ernst Mayerhofer” nagradu Hrvatskog pedijatrijskog društva. Kao koautor sudjelovao sam u izradi dva rada te poglavlja o juvenilnim spondiloartritisima u knjizi posvećenoj reumatologiji.