Izražaj apoptotskih i proliferacijskih čimbenika u želučanoj sluznici oboljelih od sistemske skleroze

Borić, Katarina

Doctoral thesis / Disertacija

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:648753

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET
UNIVERSITAS STUDIORUM SPALATENSIS
FACULTAS MEDICA

Repository / Repozitorij:

MEFST Repository

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

KATARINA BORIĆ

IZRAŽAJ APOPTOTSKIH I PROLIFERACIJSKIH ČIMBENIKA U ŽELUČANOJ SLUZNICI OBOLJELIH OD SISTEMSKE SKLEROZE

DOKTORSKA DISERTACIJA

SPLIT, 2021.

Rad je izrađen u Laboratoriju za istraživanje ranog razvoja čovjeka Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

Voditeljica rada: izv. prof. dr. sc. Snježana Mardešić

ZAHVALA

Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Snježani Mardešić na pomoći, trudu i podršci tijekom izrade ove doktorske disertacije.

Posebnu zahvalnost izražavam prof. dr. sc. Mirni Saraga Babić na nesebičnoj pomoći i podršci prilikom izrade istraživanja. Hvala Vam na svemu što ste napravili za mene, što ste mi uvijek bili dostupni i spremni pomoći. U meni ste potaknuli istraživački duh i naučili me da se uporan i ustrajan rad na kraju uvijek isplati. Hvala Vam od srca.

Također se zahvaljujem svim kolegama Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju te Zavoda za reumatologiju i kliničku imunologiju Klinike za unutarnje bolesti Kliničkog bolničkog centra Split na pomoći pri izvođenju istraživanja i sakupljanju uzoraka.

I na kraju zahvala mojoj obitelji. Hvala Vam na podršci, strpljenju i ljubavi koju mi pružate.

SADRŽAJ

1. UVOD ..……...4

1.1. Definicija sistemske skleroze……4

1.1.1. Epidemiologija sistemske skleroze ……...4

1.1.2. Etiologija sistemske skleroze…….5

1.1.3. Patogeneza sistemske skleroze……..5

1.1.4. Klasifikacija sistemske skleroze……9

1.1.5. Klinička prezentacija sistemske skleroze…….11

1.1.5.1. Opći simptomi……..11

1.1.5.2 Kožne promjene……11

1.1.5.3. Krvožilne promjene……..…12

1.1.5.4. Promjene unutarnjih organa……..……12

1.1.5.4.1. Probavni sustav……..……12

1.1.5.4.2. Pluća……...……...13

1.1.5.4.3. Srce……14

1.1.5.4.4. Bubrezi……...……...15

1.1.5.5. Koštanomišićni sustav……..…16

1.1.6. Dijagnoza……16

1.1.6.1. Laboratorijski testovi……16

1.1.6.2. Dodatne pretrage……...17

1.1.7. Liječenje……..17

1.1.8. Tijek i prognoza bolesti……19

1.2. Apoptoza……..…...20

1.2.1. Uloga apoptoze u sistemskoj sklerozi……..20

1.3. Proliferacija.……...22

1.3.1. Uloga proliferacije u sistemskoj sklerozi……..……...23

1.4. Čimbenik rasta vezivnog tkiva……24

1.4.1. Uloga čimbenika rasta vezivnog tkiva u sistemskoj sklerozi…..……..……25

1.5. Alfa-aktin glatkih mišićnih stanica.....……..26

1.5.1. Uloga alfa-aktina glatkih mišićnih stanica u sistemskoj sklerozi.....…….……27

2. HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA ……28

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA ……..……28

4. METODE ISTRAŽIVANJA ……29

4.1 Ispitanici .....……..29

4.2. Postupci ……..……..29

4.2.1. Laboratorijsko testiranje ……32

4.2.2. Ezofagogastroduodenoskopija……32

4.2.3. Uklapanje tkiva……32

4.2.4. Imunohistokemijsko bojanje……33

4.2.5. Imunofluorescentno i dvostruko imunofluorescentno bojanje.....…….34

4.3. Materijali ……..……..35

4.4. Statistička analiza ……..……..35

5. REZULTATI ……36

5.1. Klinička obilježja bolesnika sa sistemskom sklerozom…..……36

5.2. Histokemijsko (hematoksilin i eozin) i imunohistokemijsko bojanje kaspazom-3……38

5.3. Trikromno bojanje po Mallory-u.....……....40

5.4. Imunofluorescentno bojanje sindekanom-1……...42

5.5. Imunofluorescentno bojanje na CTGF.....……..44

5.6. Dvostruko imunofluorescentno bojanje primjenom protutijela za Ki-67 i α-SMA…….46

5.7. Statistička analiza….....……...49

5.7.1. Postotak Ki-67 pozitivnih stanica……49

5.7.2. Postotak α-SMA pozitivnih stanica…….50

5.7.3. Postotak kaspaze-3 pozitivnih stanica…….51

6. RASPRAVA …….53

7. ZAKLJUČCI ……..60

8. SAŽETAK ……62

9. SUMMARY ……...63

10. LITERATURA ……64

11. ŽIVOTOPIS …….78

POPIS OZNAKA I KRATICA

ACA	protutijela na centromere (od eng. anticentromere antibody)
ACE	angiotenzin konventirajući enzim (od engl. angiotensin-converting enzyme)
ACR	Američko reumatološko društvo (od engl. American College of Rheumatology)
ALT	alanin aminotransferaza
ANA	protutijela na staničnu jezgru (od eng. antinuclear antibody)
ARA	Američko reumatološko udruženje (od engl. American Rheumatology Association)
anti-Scl-70	protutijela na topoizomerazu I
AST	aspartat aminotransferaza
α-SMA	α-aktin glatkih mišićnih stanica (od eng α-smooth muscle actin)
CK	kreatin kinaza (od engl. creatine kinase)
CMV	citomegalovirus
CREST	akronim od calcinosis, Raynaud's phenomenon, esophageal dysmotility, sclerodactylia, teleangiectasia
CTGF	čimbenik rasta vezivnog tkiva (od eng. connective tissue growth factor)
CRP	C reaktivni protein
DAB	diaminobenzidin
DAPI	4',6'-diamidino-2-phenylindole
dcSSc	difuzni kožni oblik sistemske skleroze (od engl. diffuse cutaneous systemic sclerosis)
DLCO	difuzijski kapacitet pluća za ugljikov monoksid (od engl. diffusing capacity of the lung for carbon monoxide)
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
DU	digitalne ulceracije (od engl. digital ulceration)
ECM	izvanstanična tekućina (od eng. extracellular matrix)
ELISA	od eng. enzyme-linked immunosorbent assay
EMG	elektromiografija
EMT	epitelno mezenhimska transdiferencijacija
Endo-MT	endotelno-mezenhimska transdiferencijacija

EULAR	Europska liga protiv reumatizma (od engl. European league against rheumatism)
EUSTAR	Europska skleroderma istraživačka skupina (od engl. European Scleroderma Trials and Research group)
FEV1	forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi (od engl. forced expiratory volume in the first second)
FGF	čimbenik rasta fibroblasta (od eng. fibroblast growth factor)
FVC	forsirani vitalni kapacitet (od engl. forced vital capacity)
GAVE	proširenje krvnih žila antruma želuca (od eng. gastric antral vascular ectasia)
GERB	gastroezofagealna refluksna bolest
GGT	gama-glutamiltransferaza
HLA	humani leukocitni antigen (od eng. human leukocyte antigen)
H_2O_2	vodikov peroksid
HRCT	kompjuterizirana tomografija visoke rezolucije (od engl. high resolution computed tomography)
ICAM	međustanične adhezijske molekule (od eng.intercellular adhesion molecule)
KKS	kompletna krvna slika
IL	interleukin
ILD	intersticijska bolest pluća (od engl. intestital lung disease)
IPP	inhibitor protonske pumpe
lcSSc	ograničeni kožni oblik sistemske skleroze (od engl. limited cutaneous systemic sclerosis)
MCP	metakarpofalangealni zglobovi (od engl. metacarpophalangeal joints)
MMF	mikofenolat-mofetil
MTX	metotreksat
NSAR	nesteroidni antireumatik (od engl. nonsteroid antirheumatic)
NSIP	nespecifični intersticijski pneumonitis (od eng. nonspecif interstital pneumonitis)
PAH	plućna arterijska hipertenzija (od engl. pulmonary arterial hypertension)
PBS	puferirana fiziološka otopina (eng. phosphate buffer saline)
PDGF	trombocitni čimbenik rasta (od eng. platelet derived growth factor)
PWP	plućni kapilarni tlak (od engl. pulmonary wedge pressure)

RAP	tlak u desnom atriju (od engl. right atrial pressure)
RNK	ribonukleinska kiselina
RNP	ribonukleoprotein
RP	Raynaudov fenomen (od engl. Raynaud's phenomenon)
RVSP	sistolički tlak desnog ventrikla (od engl. right ventricular systolic pressure)
SE	sedimentacija eritrocita
SLE	sistemski eritemski lupus (od engl. systemic lupus erythematosus)
SRC	sklerodermijska bubrežna kriza (od engl. sclerodermal renal crisis)
SSc	sistemska skleroza (od engl. systemic sclerosis)
TGF-ß	transformirajući čimbenik rasta- ß (od eng. transforming growth factor-ß)
TFR	trenje tetiva (od engl. tendon friction rubs)
UIP	uobičajeni intersticijski pneumonitis (od engl. usual interstital pneumonitis)
VCAM	endotelne adhezijske molekule (od eng. vascular cell adhesion molecule)
VEGF	vaskularni endotelni čimbenik rasta (od engl. vascular endotel growth factor)
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (od engl. World Health Organization)

1. UVOD

1.1. SISTEMSKA SKLEROZA

Sistemska skleroza (SSc) je kronična bolest vezivnog tkiva kojoj su svojstvena mikrovaskularna oštećenja, poremećaj urođenog i stečenog imuniteta te fibroza kože i unutarnjih organa (srca, pluća, bubrega, probavnog sustava) (1). Sistemska je bolest nepoznate etiologije, progresivnog i nepredvidljivog tijeka, a obilježena je krvožilnim promjenama i prekomjernim stvaranjem vezivnog tkiva u koži i unutarnjim organima.

1.1.1. Epidemiologija sistemske skleroze

Sistemska skleroza ima relativno nisku pojavnost. Rezultati studija prevalencije i incidencije bolesti se razlikuju između pojedinih populacija uslijed različitih metodoloških pristupa i geografskih razlika, a vjerojatno i zbog utjecaja genetske predispozicije i okolišnih čimbenika. Sustavnim pretraživanjem radova incidencije i prevalencije SSc utvrđeno je da se prevalencija SSc u svijetu kreće od 7 do 489/milijun stanovnika, a incidencija od 0,6 do 122/milijun/godišnje (2). Ustanovljene su i značajne geografske varijacije. Prevalencija SSc je veća u Sjedinjenim Američkim Državama (276/milijun) nego u Europi (80-150/milijun). Navedena razlika se dijelom objašnjava posljedicom različitog definiranja i dijagnosticiranja SSc u istraživanjima, ali i stvarnom razlikom prevalencije SSc u pojedinim područjima zbog utjecaja okolišnih čimbenika i nasljeđa (2, 3).

Rizik od razvoja SSc je veći u žena nego u muškaraca, ali se i tu nalaze velike varijacije omjera rizika, od 3 do 14:1 (2, 3). SSc se u žena javlja ranije nego u muškaraca. Rijetko se pojavljuje u djetinjstvu, a najčešće se javlja u petom desetljeću života. Istraživanjem incidencije i prevalencije SSc u Splitsko dalmatinskoj županiji provedenim 2010. godine utvrđena je prevalencija 15/100,000, a incidencija 3/100,000 godišnje s omjerom žena prema muškarcima od 5:1 (4).

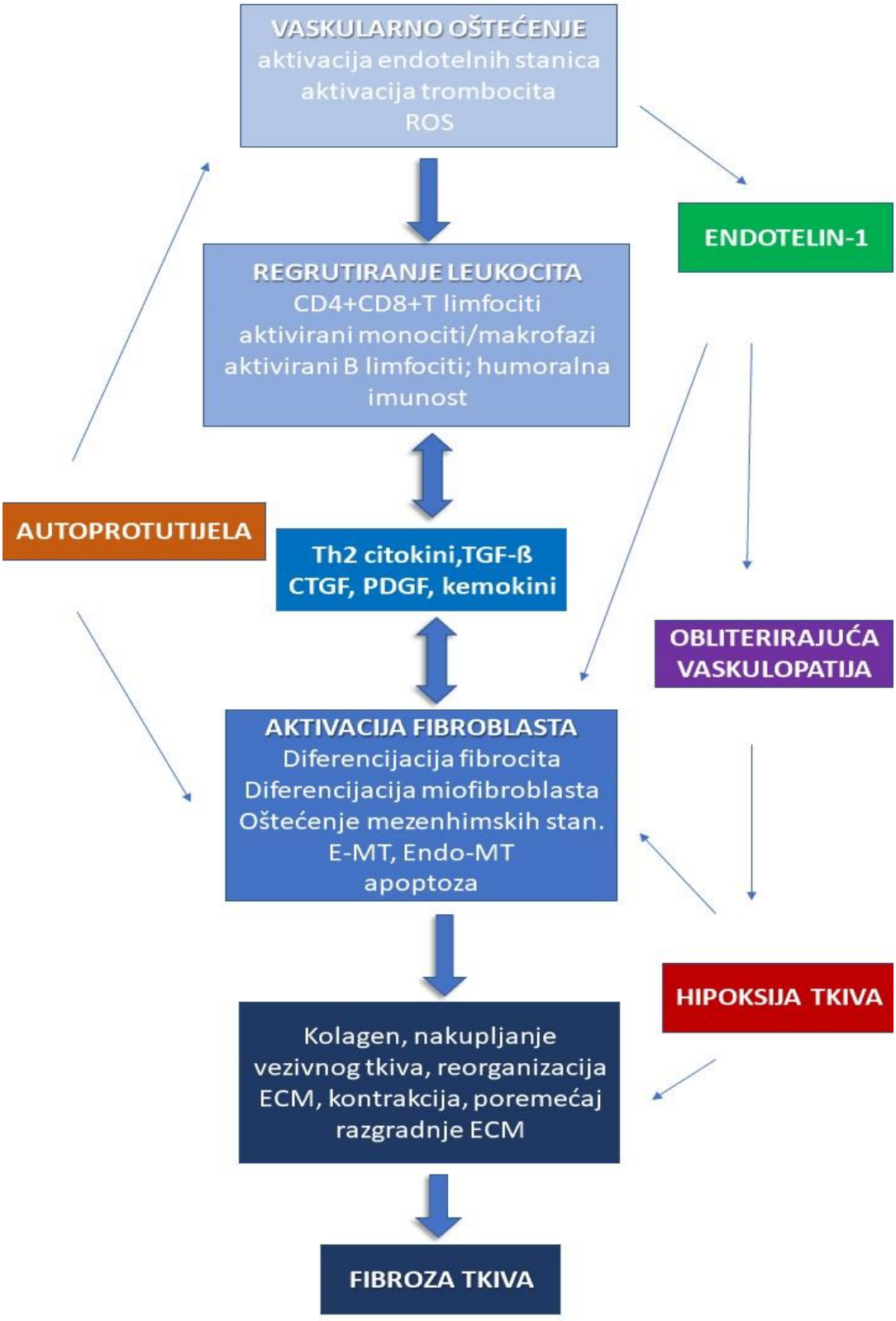
1.1.2. Etiologija sistemske skleroze

Etiologija bolesti je nepoznata. Smatra se da bolest nastaje u genetski predisponiranih osoba pod utjecajem određenih čimbenika okoliša kao što su izloženost silicijskoj prašini, vinil kloridu, epoksi-smolama, trikloretilenu, benzenu, ksilenu, organskim otapalima ili lijekovima, bleomicinu, pentazocinu, kokainu (5). Prema teoriji o „molekularnoj mimikriji" po kojoj zbog strukturalnih sličnosti epitopa vlastitih antigena i proteina virusa ili bakterija dolazi do stvaranja autoreaktivnih protutijela, kao mogući uzročnici SSc navode se infektivni čimbenici, herpes virusi, retrovirusi i citomegalovirusi (6). Smatra se i da mikrokimerizam, prisustvo malog broja cirkulirajućih stanica koji su preneseni s jednog pojedinca u drugog (tijekom trudnoće, transfuzije krvi, transplantacije koštane srži ili solidnog organa), može biti okidač za nastanak bolesti obzirom da je utvrđeno povećano prisustvo mikrokimeričnih stanica u oboljelih od SSc (7).

SSc se povezuje sa specifičnim humanim leukocitnim antigenima (HLA) DR2, DR3, DR5, DQA1 i DQB1 (8). Premda se ne nasljeđuje po Mendelovom zakonu, SSc je zabilježena u nekoliko obitelji s više članova oboljelih što uz fenotipske razlike ovisne o rasi i etničkoj pripadnosti upućuje na moguću genetsku podlogu bolesti. Genetska istraživanja su uglavnom usmjerena na ispitivanja specifičnih gena povezanih sa SSc, a to su geni koji sudjeluju u interferonskom signaliziranju, aktivaciji T i B limfocita, DNK raščišćavanju i urođenoj imunosti (9). Većina ovih gena povezana je i sa drugim autoimunim bolestima, pogotovo sistemskim eritemskim lupusom i uključena je u imunološku regulaciju što ukazuje na moguću važnost imunološkog poremećaja u patogenezi SSc (9).

1.1.3. Patogeneza sistemske skleroze

Patogeneza SSc je izuzetno kompleksna i ne postoji jedinstvena teorija kojom bi se objasnile sve prezentacije bolesti. Pretpostavlja se da dolazi do interakcije vaskularnih i imunoloških poremećaja što rezultira prekomjernim stvaranjem izvanstanične tvari (ECM, *engl. extracellular matrix*) i taloženjem većih količina kolagena (Slika 1) (10).



ROS-reaktivni metaboliti kisika, CD-biljeg limfocita, Th-pomagački T limfocit, TGF-β-transformirajući čimbenik rasta-β, CTGF-čimbenik rasta vezivnog tkiva, PDGF-trombocitni čimbenik rasta, E-MT-epitelno-mezenhimska transdiferencijacija, Endo-MT-endotelno-mezenhimska transdiferencijacija, ECM-izvanstanična tvar

Slika 1. Patofiziologija sistemske skleroze. Prema Harrison's Principles of Internal Medicine, 18. izdanje.

Dok je početni proces vjerojatno uzrokovan imunološkim poremećajem, aktivirani miofibroblast predstavlja izvršnu stanicu koja pokreće fibrotičke promjene u SSc. Fibroblasti su stanice mezenhimskog porijekla koje proizvode izvanstaničnu tvar i obično su metabolički slabo aktivni, ali posjeduju sposobnost aktivacije i diferencijacije u miofibroblaste koji kao odgovor na tkivnu ozljedu stvaraju izvanstaničnu tvar. Miofibroblasti reguliraju pregradnju vezivnog tkiva sudjelujući u stvaranju ECM, ali i ispoljavajući citoskeletne karakteristike kontraktilnih glatkih mišićnih stanica. Oni, u normalnim procesima epitelizacije, nakon tkivne ozljede, nestaju apoptozom, ali se u fibrotičkim procesima kao što je SSc zadržavaju i postaju ključni pokretač koji dovodi do oštećenja organa.

O porijeklu fibroblasta i miofibroblasta u SSc se vode brojni prijepori. Smatra se da u sklerodermijskoj koži fibroblasti većim dijelom potječu iz postojećih mezenhimskih matičnih stanica, a manjim dijelom iz cirkulirajućih fibrocita. Postoje brojni dokazi koji potkrepljuju stavove da miofibroblasti nastaju iz više staničnih izvora. Najbolje definirani put za diferencijaciju miofibroblasta je aktiviranje postojećih fibroblasta kao odgovor na djelovanje transformirajućeg čimbenika rasta-ß (TGF-ß, *engl. transforming growth factor-ß*) i drugih mitogenih podražaja.

Osnovna teorija razvoja fibroze, posebno pluća, je proces transdiferencijacije epitela u mezenhim (EMT, *engl epithelial mesenhimal transition*), a postoje dokazi da se i kožne epitelne stanice (keratinociti) mogu transdiferencirati u kožne miofibroblaste. Dobro je poznato da u SSc dolazi do oštećenja endotelnih stanica i one procesom transdiferencijacije poznatim kao endotelno-mezenhimska tranzicija (Endo-MT*, engl. endothelial mesenhimal transition*) gube morfološke i imunološke karakteristike fibroblasta i postaju aktivirani miofibroblasti (11). Također se vjeruje da u SSc miofibrobasti mogu potjecati iz monocita i adipocita. Brojna ispitivanja su ukazala na ulogu epigenetskog programiranja kao ključnog čimbenika u funkcioniranju fibroblasta. Smatra se da zbog epigenetskih promjena kao što su metilacija DNK i promjene histona koje su pokrenute postojanom upalom i profibrotskom citokinskom signalizacijom dolazi do reprogramiranja miofibroblasta (12).

Sistemska skleroza je bolest obilježena vaskularnim oštećenjem, a postoje teorije da vaskularna ozljeda može predstavljati primarni događaj koji vodi do pojave obilježja sistemske skleroze.

Oštećenje i disfunkcija endotelnih stanica uzrokovana upalnim citokinima, vaskulotropnim virusima, oksidativnim radikalima ili protutijelima specifičnim za endotelne stanice igra glavnu ulogu u patogenezi SSc i u velikoj su mjeri uključeni u krvožilne poremećaje uočene u SSc (13). Osim ove uloge, koja vodi do vazokonstrikcije i promjena poput Raynaudovog fenomena, digitalnih ulkusa i plućne hipertenzije, endotelne stanice doprinose i stvaranju miofibroblasta.

Hipoksija koja nastaje uslijed vaskularnog oštećenja i taloženja izvanstanične tvari može potaknuti signalizaciju TGF-ß koji potiče diferencijaciju mezenhimskih stanica prema miofibroblastima i na taj način doprinosi ciklusu fibrogeneze (14). Čimbenik rasta vezivnog tkiva (CTGF, *engl. connective tissue growth factor*) je u interakciji sa TGF-ß i povišen je u serumu i koži oboljelih od SSc, a povezan je s fibrozom kože i unutarnjih organa te igra važnu ulogu u Endo-MT, stvaranju izvanstanične tvari i stvaranju trombocitnog čimbenika rasta (PDGF, *engl platelet derived growth factor*). Povećan izražaj PDGF izaziva proliferaciju endotelnih stanica, a potiskuje izražaj vaskularnog endotelnog čimbenik rasta (VEGF*, engl. vascular endothelial growth factor*) koji sudjeluje u procesu neovaskularizacije. Uslijed ozljede endotela dolazi do gubitka integriteta endotelnog sloja i povećane kapilarne propusnosti, aktivacije trombocita i fibrinolitičkih putova, povećane ekspresije endotelnih adhezijskih molekula-1 (VCAM-1 *od engl. vascular cell adhesion molecule-1)* i sekrecije vazoaktivnih posrednika kao što je endotelin-1 koji potiče vazokonstrikciju, adheziju leukocita, proliferaciju glatkih mišića i aktivaciju fibroblasta. Navedeni procesi za posljedicu imaju proliferaciju intime krvnih žila, obliteraciju lumena, posljedičnu tkivnu hipoksiju, a u kasnijim fazama bolesti i gubitak krvnih žila što dovodi do pojačanog izražaja VEGF-a i neovaskularizacije (15).

Uloga stečenog imunološkog poremećaja dolazi do izražaja u poliklonskoj aktivaciji B limfocita i stvaranju protutijela. U SSc su opisana brojna autoprotutijela. Autoprotutijela protiv stanične jezgre (ANA, *engl. antinuclear antibodies*) su prisutna u više od 90% oboljelih, autoprotutijela protiv DNK topoizomeraze I (anti-Scl-70) se gotovo isključivo opisuju u difuznoj kožnoj SSc (dcSSc), a autoprotutijela protiv centromere (ACA, *engl. anticentromere antibodies*) su prisutna u 80-90% oboljelih od ograničene (limitirane) kožne SSc (lcSSc). Rjeđe se mogu utvrditi anti-RNK polimeraza II i III autoprotutijela i to u bolesnika s brzoprogresivnom bolešću i sa značajnim zahvaćanjem unutarnjih organa te anti-PM-Scl autoprotutijela u bolesnika s upalnom miopatijom (16).

Uslijed poremećaja ravnoteže između pomoćničkih Th1 i Th2 limfocita u korist Th2 limfocita i lučenja profibrotskih citokina: IL-4, IL-6, IL-13 dolazi do sve intenzivnije fibrogeneze što rezultira nakupljanjem izvanstanične tvari i narušavanjem normalne građe tkiva te posljedično do oštećenja organskih sustava (15).

1.1.4. Klasifikacija sistemske skleroze

Prve klasifikacijske kriterije sistemske skleroze je 1980. godine predložilo Američko reumatološko udruženje (ARA, od engl. American Rheumatology Association), danas American College of Rheumatology (ACR) (17). U nekoliko navrata su predloženi novi klasifikacijski kriteriji koji su uključivali klinička obilježja, autoantitijela i kapilaroskopski nalaz uz naglasak na razlike između dva podtipa SSc: difuzni i ograničeni (limitirani) oblik te uvođenje pojma „rana“ SSc. Trenutno važeći klasifikacijski kriteriji za SSc su objavljeni 2013. godine od strane Američkog udruženja reumatologa (ACR, od engl. American College of Rheumatology) i Europske lige protiv reumatizma (EULAR, od engl. European league against rheumatism) (Tablica 1) (18).

Tablica 1. Klasifikacijski kriteriji SSc (18)

Kliničko obilježje	Podobilježje	Zbroj
Zadebljanje kože obje šake proksimalno od metakarpofalangealnih zglobova	-	9
Zadebljanje kože prstiju	Otečeni prsti Sklerodaktilija (cijeli prsti distalno od metakarpofalangealnih zglobova)	2 4
Lezije vrška prsta	Digitalne ulceracije Rupičasti ožiljci	2 3
Teleangiektazije	-	2
Patološki nalaz kapilaroskopije	-	2
Oštećenje pluća	PAH ili ILD	2
Raynaudov fenomen	-	3
Autoprotutijela specifična za SSc	ACA, anti-Scl-70, anti RNK polimeraza III	3

*Ukupni rezultat određuje se zbrajanjem maksimalnih rezultata svake kategorije. Ukupni rezultat ≥9 dijagnoza potreban je za postavljanje dijagnoze sistemske skleroze.

Osnovna podjela sistemske skleroze prema zahvaćenosti kože obuhvaća tri podtipa: ograničeni (limitirani) oblik, difuzni oblik i skleroza unutarnjih organa bez zahvaćanja kože (Slika 2).



Slika 2. Podjela sistemske skleroze prema zahvaćenosti kože.

Ograničeni kožni oblik SSc (lcSSc, *od engl. limited cutaneous systemic sclerosis*) se definira ograničenim promjenama kože distalnih dijelova udova (distalno od zapešća i gležnjeva), uz moguću zahvaćenost kože lica i vrata. Ovaj podtip SSc se ranije nazivao CREST sindrom prema akronimu manifestacija kao što su kalcinoza, Raynaudov fenomen, zahvaćanje jednjaka, sklerodaktilija i teleangiektazije (19). U serumu ovih bolesnika se često može utvrditi prisutnost anticentromernih protutijela (20).

Difuzni kožni oblik SSc (dcSSc, *od engl. diffuse cutaneous systemic sclerosis*) je definiran zahvaćanjem kože proksimalno od zapešća i zahvaćenost kože trupa uz poštedu gornjeg dijela leđa (19). Ovi bolesnici često imaju pozitivna autoprotutijela na topoizomerazu I te veći rizik za razvoj značajne bubrežne, plućne i srčane bolesti (20).

Skleroza unutarnjih organa bez zahvaćanja kože (*SSc sine scleroderma*) je rijedak oblik bolesti karakteriziran tipičnim vaskularnim obilježjima sistemske skleroze i promjenama unutarnjih organa, ali bez zahvaćenosti kože (19).

1.1.5. Klinička prezentacija sistemske skleroze

Sistemska skleroza ima raznoliku kliničku prezentaciju kojom dominiraju kožne promjene odakle i potječe naziv skleroderma („tvrda koža“). Radi se ipak o sistemskoj bolesti koja je osim zahvaćanja kože obilježena i općim simptomima, krvožilnim promjenama i promjenama unutarnjih organa.

1.1.5.1. Opći simptomi

Opći simptomi koji se povezuju sa SSc su najčešće nespecifični, a uključuju umor, osjećaj zakočenosti i bolova u zglobovima i mišićima te gubitak snage. Opisani su i poremećaji spavanja, depresija, mučnina, dispepsija i gubitak tjelesne težine (21).

1.1.5.2. Kožne promjene

Promjene kože u obliku gubitka elastičnosti, zadebljanja i otvrdnuća su karakteristična obilježja sistemske skleroze (22). Oticanje mekog tkiva, intenzivan svrbež i osjećaj pečenja su znakovi rane upalne ili „edematozne“ faze, a najčešće su zahvaćeni prsti, šake, distalni dijelovi udova i lice. Često se mogu primjetiti područja hiper i hipopigmentacije kože („sol i papar“). Progresijom bolesti upalna faza prelazi u „fibroznu“ karakteriziranu nakupljanjem kolagena i izvanstanične tvari u koži što rezultira otvrdnućem kože i gubitkom elastičnosti. U fibroznoj fazi koža postaje glatka i sjajna zbog gubitka dlake, lojnih žlijezda i redukcije kožnih masnoća. Postepeno proces zahvaća i potkožno tkivo s posljedičnom atrofijom potkožnog masnog tkiva i fibrozom koja zahvaća fascije, mišiće i ostale meke strukture. Koža otečenih prstiju postaje zadebljana što dovodi do fleksijske kontrakture proksimalnih interfalangealnih zglobova što se naziva sklerodaktilija. Fibroza kože lica dovodi do karakterističnog izgleda sa gubitkom izražajnosti lica, ušiljenja nosa, suženja usnog otvora (mikrostomija) uz pojavu perioralnih, radijalnih brazda i protruziju zubiju (1). Uz navedeno mogu nastati i točkasta udubljenja i ragade koje ponekad progrediraju u ulceracije pogotovo na vršcima prstiju (digitalne ulceracije) te potkožni kalcifikati, posebno u bolesnika sa tzv. sindromom CREST (23, 24).

1.1.5.3. Krvožilne promjene

Najraniji simptom SSc je Raynaudov fenomen (RP) prstiju, uški ili nosa (25). Raynaudov fenomen je prolazni periferni vazospazam obilježen trifazičnim promjenama boje kože okrajina. Uslijed vazospazma arteriola i gubitka krvnog protoka koža postaje blijeda, potom lividna zbog ishemije i protoka venske deoksigenirane krvi, a nakon toga nastupa crvenilo kože zbog reperfuzijske vazodilatacije. Do Raynaudovog fenomena u SSc ne dolazi samo uslijed poremećene ravnoteže vaskularnog tonusa već i uslijed značajnih strukturalnih promjena krvnih žila. Endotelna disfunkcija, poremećaj glatkih mišićnih stanica, disfunkcija autonomnog živčanog sustava, aktivacija citokina i trombocita te stvaranje fibrinskih depozita u SSc ima za posljedicu obliteraciju krvnih žila i ishemiju s razvojem digitalnih ulceracija, infarkta ili gangrene (26). Oštećenja organa uslijed vaskularne disfunkcije nisu ograničena samo na kožu već se javljaju i u probavnom sustavu, plućima, bubrezima i srcu (27).

1.1.5.4. Promjene unutarnjih organa

U sistemskoj sklerozi mogu biti zahvaćeni gotovo svi organi i organski sustavi, a najčešće su zahvaćeni probavni sustav, pluća, bubreg, srce i koštanomišićni sustav (1).

1.1.5.4.1. Probavni sustav

Zahvaćenost probavnog sustava se opisuje u oko 90% bolesnika neovisno o podtipu SSc (28). Najčešće patohistološke promjene su atrofija glatkih mišića i fibroza stijenke crijeva. Smatra se da u patogenezi zahvaćenosti probavnog sustava kao i drugih sustava važnu ulogu imaju promjene malih krvnih žila, autonomnog živčanog i imunološkog sustava, a kao mogući uzrok opisuje se i neuralna disfunkcija.

U SSc svaki dio probavnog sustava, od usta do anusa, može biti zahvaćen i nakon kože je najčešće zahvaćen organski sustav. Zahvaćenost jednjaka se pojavljuje u 75-90% slučajeva, želuca u najmanje 50%, tankog crijeva 40-70%, debelog crijeva u 20-50%, a anorektalna zahvaćenost u 50-70% slučajeva (28). Promjene probavnog sustava u SSc uključuju poremećaj gibljivosti i krvožilne malformacije (watermelon stomach i angiodisplazija crijeva) (29). Najučestalija prezentacija zahvaćenosti probavnog sustava u SSc je poremećaj peristaltike jednjaka i uz gastroezofagealnu refluksnu bolest se pojavljuje u većine oboljelih. Poremećaj funkcije muskulature donje trećine jednjaka dovodi do dilatacije ili stenoze jednjaka. Prezentira

se otežanim gutanjem i epizodama refluksa s razvojem ezofagitisa donjeg dijela jednjaka i simptomima dispepsije, piroze, regurgitacije, rjeđe gingivitisom, kroničnom iritacijom ždrijela i promuklošću. Kao komplikacija ezofagitisa može se razviti Barettov jednjak, potencijalno prekancerozno stanje kod kojeg dolazi do intestinalne metaplazije stanica ezofagealne sluznice. Poremećaj inervacije može dovesti do gastropareze i poremećaja peristaltike tankog crijeva. Simptomi variraju od mučnine, povraćanja, bolova u trbuhu, nadutosti, poremećaja u pražnjenju crijeva i gubitka na težini (29).

Atrofija mišićnog dijela stijenke tankog crijeva dovodi do dilatacije i atonije zbog čega tanko crijevo gubi svoju propulzivnu funkciju. Pod tim uvjetima dolazi do bakterijskog razmnožavanja i oštećenja absorptivne funkcije sluznice, a time i do malapsorpcije masti, ugljikohidrata, proteina i vitamina te razvoja malnutricije (30). U najtežim slučajevima dilatacija crijeva može rezultirati pseudoopstrukcijom. Razvoj atrofije glatkomišićnog sloja stijenke debelog crijeva rezultira poremećajem peristaltike debelog crijeva, njegovom dilatacijom i gubitkom haustracija. Zabilježeni su potencijalni po život opasni slučajevi pseudoopstrukcije i perforacije crijeva. Oboljeli od SSc često pate od proljeva i/ili opstipacije. Bakterijsko prerastanje sluznice tankog crijeva, smanjenje apsorptivne površine, kronična intestinalna ishemija rezultira malapsorpcijom i u konačnici proljevom, dok se opstipacija razvija uslijed poremećaja rada debelog crijeva s produženim vremenom pražnjenja crijeva. Anorektalna disfunkcija je druga po učestalosti gastrointestinalna manifestacija nakon zahvaćanja jednjaka (30). Zbog fibroze unutarnjeg analnog sfinktera kod oboljelih se uslijed poremećaja relaksacije i ograničene dilatacije može razviti konstipacija. Kronična konstipacija uz pojačano odlaganje kolagena u stijenku rektuma ima za posljedicu fekalnu inkontinenciju i prolaps rektuma. Pacijenti se žale na konstipaciju, proljev, osjećaj punoće crijeva i urgenciju (31).

1.1.5.4.2. Pluća

Zahvaćenost plućnog parenhima pridonosi značajnom poboljevanju i vodeći je uzrok smrti oboljelih od SSc. Najčešće plućne manifestacije u SSc su intersticijska bolest pluća i plućna arterijska hipertenzija, a mogu se javiti i aspiracijski pneumonitis, plućna krvarenja, bronhiektazije, obliterirajući bronhiolitis s organizirajućom pneumonijom, pleuritis, pneumotoraks, a povećan je i rizik od nastanka karcinoma pluća (32).

Najčešći histopatološki nalazi u bolesnika s intersticijskom bolesti pluća (ILD) povezanom sa sistemskom sklerozom su nespecifični intersticijski pneumonitis (NSIP, engl. *nonspecific*

interstital pneumonitis) i uobičajeni intersticijski pneumonitis (UIP, engl. *usual interstital pneumonitis)*. Upalni alveolitis i posljedična fibroza uzrokuju restriktivne promjene ventilacije i poremećaj izmjene plinova što se odražava u snižavanju forsiranog vitalnog kapaciteta (FVC, engl. *forced vital capacity*) i difuzijskog kapaciteta za ugljikov monoksid (DLCO, engl. *diffusing capacity of the lung for carbon monoxide*). Smatra se da je smanjenje DLCO rani pokazatelj intersticijske bolesti pluća, ali se nalazi i u plućnoj hipertenziji, tromboembolijskoj bolesti pluća i kod pušača cigareta (33). Najosjetljivija metoda za otkrivanje ranih promjena plućnog parenhima u SSc je kompjuterizirana tomografija visoke rezolucije (HRCT, engl. *high resolution computed tomography*). Prisutnost promjena po tipu „mliječnog stakla" i fibroze na HRCT je znak aktivnosti bolesti i korelira sa sniženjem FVC. Najčešći simptomi koji se povezuju sa intersticijskom bolesti pluća su umor, slabost, zapuha u naporu te suhi neproduktivni kašalj (32).

Plućna arterijska hipertenzija (PAH, engl. *pulmonary arterial hypertension*) koja je povezana sa sistemskom sklerozom definira se kao povećanje srednjeg plućnog arterijskog tlaka iznad 25 mmHg u mirovanju (mjereno kateterizacijom desne strane srca) s plućnim kapilarnim tlakom (PWP, engl. *pulmonary wedge pressure*) jednakim ili manjim od 15 mmHg u bolesnika koji ima SSc bez kronične hipoksemije uzrokovane koegzistirajućom intersticijskom bolesti pluća (34). Javlja se u 8-15% oboljelih od SSc i može se biti jedina plućna prezentacija bolesti ili u kombinaciji s intersticijskom bolesti pluća. Prirodni tijek PAH je izuzetno varijabilan, od asimptomatske faze do uporne zapuhe i hipoksije te desnostranog zatajivanja srca. Rizični čimbenici za nastanak PAH u SSc su starija dob, teški Raynaudov fenomen, brojne teleangiektazije, kapilaroskopske promjene, prisustvo protutijela protiv centromere (ACA), U1 ribonukleoproteina (anti-U1RNP) ili fibrilarina (anti-U3RNP). Procijenjeno trogodišnje preživljenje neliječenih bolesnika sa SSc i PAH je 50%, a prognoza je lošija u bolesnika koji imaju PAH povezanu s ILD, znakovima popuštanja desnog srca i sniženim DLCO (35).

1.1.5.4.3. Srce

Zahvaćenost srca u SSc je uobičajeno, ali često neprepoznato zbog odsustva simptoma sve do razvoja srčanog popuštanja, a tada je prognoza loša. U SSc mogu biti zahvaćene bilo koje srčane strukture, uključujući miokard u kojem nastaje fibroza i upalni proces, mikrožilje i perikard s razvojem perikarditisa (36). Karakterističan je patohistološki nalaz mrljaste („patchy") fibroze miokarda koja može zahvatiti obje klijetke i provodni sustav zbog čega su česte aritmije. Najčešće su zabilježene ventrikulske ekstrasistole i ventrikularna tahikardija čemu uz fibrozu

pridonosi i neuropatija autonomnog živčanog sustava (36). Bolesti srčanih zalistaka nisu uobičajene. Smatra se da do primarne bolesti srca dolazi zbog oštećenja mikrocirkulacije s poremećajem vazoreaktivnosti (miokardijalni Raynaudov fenomen) s ili bez oštećenja krvnih žila. Kliničke manifestacije zahvaćenosti srca u SSc variraju od simptoma zatajivanja srca (zapuha, nepodnošenje napora, oticanje nogu i pojava ascitesa) do akutnog koronarnog sindroma (prsna bol) i aritmija (osjećaj nepravilnog i ubrzanog rada srca). Bolest srca u SSc je uzrok smrti u 20-30% bolesnika i predstavlja nezavisni čimbenik rizika smrti (37).

1.1.5.4.4. Bubrezi

Zahvaćenost bubrega u SSc je često asimptomatska, a može se prezentirati mikroalbuminurijom, proteinurijom, porastom dušičnih spojeva i/ili hipertenzijom i javlja se u do 45% bolesnika (38). Najteži oblik zahvaćenosti bubrega je sklerodermijska bubrežna kriza (SRC, *engl. scleroderma renal crisis*) koja je obilježena naglim porastom arterijskog tlaka i akutnim zatajivanjem bubrežne funkcije. Povećan rizik za nastajanje SRC imaju bolesnici s difuznim brzoprogresivnim zahvaćanjem kože, prisustvom protutijela na RNK polimerazu III te primjena glukokortikoida u dozi većoj od 15 mg dnevno (39). Obično se manifestira kao naglo nastala arterijska hipertenzija praćena glavoboljom, smetnjama vida, napadajima, srčanim zatajivanjem, perikarditisom, mikroangiopatskom hemolitičkom anemijom, trombocitopenijom i oliguričnim zatajivanjem bubrežne funkcije. Uobičajeni patohistološki nalaz je subintimalna fibrinoidna nekroza stijenke arterija i javlja se u 5-20% bolesnika s dcSSc, dok je u bolesnika s lcSSc rjeđa. Liječenjem inhibitorima enzima angiotenzin konvertaze (ACE) značajno se povećalo preživljenje u bolesnika sa SRC. Stopa preživljenja je s 10% jednogodišnjeg preživljenja porasla na 60% petogodišnje preživljenje (40). Vjeruje se da je kronično zatajivanje bubrežne funkcije u odsutnosti sklerodermijske bubrežne krize povezano s vaskulopatijom (visceralnim RP) koja se javlja u bolesnika sa SSc. Ipak, poremećaj bubrežne funkcije kod oboljelih od SSc najčešće je posljedica prerenalnog oštećenja (uslijed zatajenja srca, PAH, hipovolemije), arterijske hipertenzije, toksičnog djelovanja lijekova, a rijetko kao posljedica glomerulonefritisa (39).

1.1.5.5. Koštanomišićni sustav

Koštanomišićni simptomi se pojavljuju kao jedan od najranijih obilježja SSc i značajno pridonose invaliditetu i smanjenju kvalitete života oboljelih. Zglobne manifestacije se javljaju u do 90% bolesnika sa SSc. Najčešći simptomi su bolovi u zglobovima, a mogu se prezentirati akutnom ili kroničnom, oligoartikularnom ili poliartikularnom upalom zglobova. Najčešće su zahvaćeni distalni interfalangealni zglobovi, s ili bez koštanih erozija (41). Zahvaćenost tetiva nije neuobičajena, a češće se javlja u dcSSc i na početku bolesti. Manifestira se kao palpabilno čujno trenje tetiva (TFR, engl. *tendon friction rubs*) u području koljena, prstiju, ručnih zglobova i gležnjeva prilikom pokreta, a posljedica je fibroze tetiva i okolnih zglobnih struktura. Smatra se da je trenje tetiva biljeg agresivnijeg tijeka bolesti i predskazatelj zahvaćanja unutarnjih organa (42). Jedno od obilježja SSc su i potkožni kalcifikati koji se mogu javiti na stopalima, koljenima i nogama odnosno na mjestima podložnim pritisku i traumi. Koštana resorpcija je česta manifestacija SSc, a akroosteoliza (resorpcija distalnih falangi) se javlja u oko 20% bolesnika. Kalcinoza i digitalne ulceracije su nezavisni predskazatelji radiografske progresije i akroosteolize što je vjerojatno posljedica oštećenja i spazma krvnih žila (41).
Miopatija povezana sa SSc je česta i javlja se u do 80% bolesnika. Obično je blaga, s blažom slabošću proksimalnih mišića i normalnom ili blago povećanom vrijednosti kreatin kinaze (CK) (43). Rjeđe se javlja miozitis sa značajnom slabošću proksimalnih mišića, povećanom vrijednosti CK, tipičnim promjenama u elektromiogramu (EMG) te histološkim nalazom upalnog infiltrata u bioptatu mišića.

1.1.6. Dijagnoza

Dijagnoza sistemske skleroze se postavlja na temelju dobre anamneze i kliničke slike uz pomoć laboratorijskih i drugih dijagnostičkih postupaka.

1.1.6.1. Laboratorijski testovi

U laboratorijskim nalazima može se utvrditi anemija zbog malapsorpcije željeza te gubitka krvi putem probavnog sustava ili anemija kronične bolesti. Od ostalih laboratorijskih pokazatelja često je prisutna hipergamaglobulinemija, reumatoidni faktor, krioglobulini i cirkulirajući imunokompleksi. Povišene razine vrijednosti kreatin kinaze upućuju na moguće postojanje miozitisa u sklopu sindroma preklapanja (22).

Prisutnost pojedinih protutijela u bolesnika sa SSc predstavlja veliki značaj za potvrdu dijagnoze, ali i za procjenu prognoze i progresije bolesti. ANA su pozitivna u oko 95% bolesnika sa SSc. U bolesnika s dcSSc su češća anti-Scl-70 koja su povezana s većim rizikom od razvoja intersticijske bolesti pluća (16). U bolesnika s lcSSc češća su ACA, dok su protutijela na RNK polimerazu III češća u bolesnika s dcSSc-om i povezana su s većim rizikom razvoja progresivnog zahvaćanja kože te sklerodemijske bubrežne krize (44).

1.1.6.2. Dodatne pretrage

Za potvrdu dijagnoze i određivanje stupnja proširenosti bolesti koriste se dodatne pretrage. Dodatne pretrage uključuju radiološku snimku srca i pluća i/ili kompjuteriziranu tomografiju visoke rezolucije (HRCT) pluća, testove plućne funkcije i dopler ehokardiografiju u svrhu dijagnosticiranja intersticijske bolesti pluća i plućne hipertenzije te ovisno o simptomima i dijagnostičku obradu probavnog sustava kao što su manometrija, scintigrafija i/ili pasaža jednjaka (21). Ezofagogastroskopija se preporučuje u bolesnika s progresivnim i perzistirajućim simptomima disfagije i dispepsije koji su otporni na liječenje inhibitorima protonske crpke (IPP) kao i u bolesnika s mogućim komplikacijama (45).
Videokapilaroskopija je neinvazivna, jednostavna metoda kojom se uz povećanje od 100 do čak 1000 puta promatraju kapilare ležišta noktiju i protok eritrocita kroz lumen kapilara uz mogućnost snimanja i spremanja slika. Kapilare ležišta noktiju bolesnika sa SSc pokazuju najranije promjene i imaju karakterističan morfološki uzorak (tzv. *scleroderma pattern*): uvećane kapilare (megakapilare), hemoragije i avaskularne zone bez kapilara. Uzorak se dijeli na rani, aktivni i kasni uzorak ovisno o stadiju bolesti (27).

1.1.7. Liječenje

S obzirom da nije poznat jasan uzrok sistemske skleroze ne postoji niti učinkovito etiološko liječenje pa se bolesnici uglavnom liječe simptomatski. Pristup liječenju ovisi o zahvaćenosti organa ili organskih sustava. EULAR-EUSTAR (Europska skleroderma istraživačka skupina) su 2009. godine objavili preporuke za liječenje sistemske skleroze koje su obnovljene 2017. godine (Tablica 2.) (46, 47).
U slučaju zahvaćenosti kože u ranoj fazi dcSSc EULAR-EUSTAR preporučuje primjenu metotreksata, a u refraktornih bolesnika ili u slučaju progresivnih kožnih promjena preporučena je primjena ciklofosfamida. Za liječenje Raynaudovog fenomena u SSc lijek prvog izbora su

dihidropiridinski blokatori kalcijevih kanala (nifedipin), a za teške oblike RP-a predložena je intravenska primjena analoga prostaciklina (iloprost). Iloprost se preporučuje i za liječenje aktivnih digitalnih ulceracija, dok se bosentan (antagonist endotelinskih receptora) preporučuje u prevenciji ulceracija nakon neuspjelog liječenja blokatorima kalcijevih kanala i analozima prostaciklina (46, 47).

Tablica 2. Preporuke za liječenje sistemske skleroze

Klinička manifestacija SSc	Liječenje
Koža	metotreksat
Raynaudov fenomen	blokator kalcijevih kanala (nifedipin) analog prostaciklina (iloprost)
Digitalne ulceracije	antagonist endotelinskih receptora (bosentan) analog prostaciklina (iloprost)
Probavni sustav	inhibitori protonske crpke, prokinetici, antibiotici
Pluća	ciklofosfamid (ILD) bosentan, macicentan, sildenafil, epoprosterenol (PH)
Bubreg	ACE inhibitori

U slučaju zahvaćenosti probavnog sustava liječenje ovisi o lokalizaciji i simptomima, a ono uključuje preporuke o higijeni usne šupljine, uzimanja više manjih obroka dnevno, izbjegavanje ležećeg položaja nakon obroka, vježbe mišića lica i primjenu umjetne sline. Uz navedeno preporučuje se upotreba inhibitora protonske crpke u prevenciji želučanog refluksa, ulkusa i striktura, uporaba prokinetika u slučaju poremećaja motiliteta crijeva te antibiotska terapija i probiotici u slučaju poremećaja crijevne bakterijske flore i prekomjernog rasta bakterija (46, 47). Ciklofosfamid se preporučuje za liječenje plućne fibroze, a za liječenje PAH povezane sa SSc koriste se bosentan, macicentan, sildenafil i intravenski agonist prostaciklina epoprosterenol (46, 47). U slučaju teškog oblika bolesti i lošeg odgovora na liječenje bolesnici mogu biti kandidati za transplantaciju pluća i koštane srži (46, 47). ACE inhibitori imaju svoju

ulogu u prevenciji i liječenju sklerodermijske bubrežne krize (46, 47). Budući da glukokortikoidi u dozi većoj od 15 mg dnevno povećavaju rizik razvoja sklerodermijske bubrežne krize njihova primjena trebala bi se izbjegavati u bolesnika sa SSc ili bi se trebali primjenjivati u dozi manjoj od 15 mg dnevno (46, 47). Učinkovitost i sigurnost imunosupresivnih lijekova kao što su mikofenolat mofetil (MMF), azatioprin i rituksimab (antiCD-20 protutijelo) u liječenju sistemske skleroze se još uvijek ispituje. Pokazalo se da nintedanib, inhibitor tirozin kinaze, ima antifibrotički i protuupalni učinak u pretkliničkim modelima sistemske skleroze i intersticijske bolesti pluća, a pokazuje i povoljne rezultate u kliničkim ispitivanjima (48, 49).

1.1.8. Tijek i prognoza bolesti

Tijek bolesti je kroničan i progresivan, a prognoza bolesti ovisi o podtipu i stupnju zahvaćenosti unutarnjih organa. Međunarodnom metaanalizom utvrđena je veća smrtnost u osoba oboljelih od sistemske skleroze u odnosu na opću populaciju s tim da je smrtnost veća u bolesnika s dcSSc te zahvaćanjem bubrega, pluća i srca, i to osobito unutar prve godine (50). Starija istraživanja su pokazala visoku razinu stope smrtnosti među bolesnicima sa SSc, između 1,05 i 7,2, a i novija istraživanja provedena diljem svijeta bilježe veći standardizirani omjer smrtnosti u rasponu od 1,39 do 5,10 (51). Premda nema dugoročnog učinkovitog liječenja, brojnim mjerama i boljom skrbi o bolesnicima uspjela se smanjiti smrtnost te je desetogodišnja kumulativna stopa preživljenja porasla s 54% u sedamdesetim na 66% u devedesetim godinama prošlog stoljeća (50). Postojanje kardiorespiratornih manifestacija povezano je s lošijom prognozom te se kao glavni uzroci smrti u bolesnika sa SSc navode intersticijska bolest pluća i plućna arterijska hipertenzija (52).

1.2. APOPTOZA

Apoptoza je oblik programirane stanične smrti u kojem dolazi do aktivacije kontroliranih biokemijskih procesa i morfoloških promjena u stanici koji završavaju smrću stanice (53). Karakteristične morfološke značajke apoptoze su odvajanje stanica od zdravih stanica, DNK i stanična fragmentacija, oblikovanje apoptotskih tjelešaca te zgrušavanje kromatina (54). Tim procesom nastaju apoptotska tjelešca koje makrofazi odstranjuju procesom fagocitoze i razgrađuju bez aktivacije imunološkog odgovora (53). Apoptoza je zaslužna za pravilan embrionalni razvoj i predstavlja važan obrambeni mehanizam višestaničnih organizama jer sprječava nakupljanje nefunkcionalnih stanica. Poznato je da poremećaji u signalnom putu apoptoze mogu uzrokovati različite bolesti, od raka do neurodegenerativnih bolesti (55). Apoptozu prati aktivacija skupine proteaza zvane kaspaze koje u svom aktivnom mjestu sadrže cistein (cistein aspartat-specifične proteaze). Signal za pokretanje kaskadne reakcije kaspaza može doći izvana (vanjski put) ili iz same stanice (unutrašnji put) (53, 55). Postoji ukupno 15 kaspaza od kojih 7 sudjeluje u apoptozi, a ostale sudjeluju u upalnim i drugim procesima. Apoptotske kaspaze se prema funkciji dijele u dvije skupine: inicijatorske i izvršne kaspaze i odgovorne su za uništenje stanice u procesu programirane stanične smrti. Sve kaspaze se aktiviraju kaskadno i to na način da aktivirana kaspaza cijepa sljedeću prokaspazu u njen aktivni oblik. Sam proces se odvija u 4 faze od početnog signala, preko prijenosa i integracije signala nakon čega nastupa izvršna faza i uklanjanje staničnih fragmenata (56). Inicijatorske kaspaze su kaspaza-2, -8, -9 i -10, a izvršne su kaspaza-3, -6 i -7 (53). Pokusi supresije gena za ove kaspaze pokazali su da glavnu ulogu ima kaspaza-3 jer u slučaju njene supresije, apoptoza nije moguća. Utvrđeno je da kaspaza-3 sudjeluje i kod unutrašnjeg i vanjskog puta stanične smrti. Stoga kaspaza-3 predstavlja izvrstan biljeg za apopotozu. Apoptoza je strogo regulirana proapoptotskim i antiapoptotskim čimbenicima. Do povećane apoptotske aktivnosti dovode oksidativni stres, oštećenja mitohondrija i mitohondrijske DNK te nakupljene greške u genomu starih stanica, uz neke promjene u signalnim putevima zbog čega stanice postaju sklonije upalama i podložnije stresu (57). Apoptoza je ključni proces koji regulira razvoj imunoloških stanica i održavanje periferne imunološke ravnoteže (58).

1.2.1. Uloga apoptoze u SSc

Iako je fibroza glavno obilježje sistemske skleroze, promjene u SSc mogu biti podijeljene na ranu i kasnu fazu bolesti. Najnovija istraživanja svrstavaju apoptozu u najranije patološke

promjene u SSc, koje mogu dovesti do endotelno-mezenhimske tranzicije, poremećaja angiogeneze i fibroze. U ranoj patogenezi SSc, infiltrati aktiviranih T limfocita proizvode upalne citokine koji izazivaju oštećenje tkiva citotoksičnim posredovanjem ili apoptozom stanica (59). Smatra se da je apoptoza inducirana infekcijom, imunosupresivnom citotoksičnosti, antiendotelijalnim protutijelima i ishemijsko-reperfuzijskom ozljedom povezana s nastankom početne ozljede endotelnih stanica krvnih žila, premda nije poznat točan mehanizam (60, 61). Brojna istraživanja podupiru stajalište da apoptoza ima važnu ulogu u razvoju autoimunosti (58), a da je fibroza rezultat otpornosti fibroblasta na apoptozu (62-65). Santiago i sur. su utvrdili proliferaciju kožnih fibroblasta i predložili rezistenciju kožnih fibroblasta na apoptozu kao mogući patogenetski mehanizam progresivne fibroze u SSc (66). Utvrđeno je da su T limfociti bolesnika sa SSc manje podložni apoptozi nakon anti-Fas stimulacije uz značajno smanjenje aktivnosti kaspaze-3 (64). Chabaud i ostali pokazali su da je otpornost fibroblasta na apoptozu važna karakteristika sistemske skleroze, ali njenog kasnog stadija (67). Stoga se danas smatra da je otpornost fibroblasta na apoptozu karakteristična za kasnu fazu sistemske skleroze (67-70). U SSc apoptoza je istraživana uglavnom na koži i staničnim kulturama te životinjskim modelima. Yamamoto i suradnici su na životinjskom modelu sklerodermijske kože izazvane bleomicinom utvrdili da prekomjerna apoptoza mononuklearnih stanica koje infiltriraju kožu može izazvati upalni proces, a kasnije i fibrozu. Na temelju navedenog ispitivanja autori sugeriraju da je prekomjerna apoptoza koja je posredovana putem Fas/Fas liganda i aktivacije kaspaze-3 uključena u patogenezu sklerodermije izazvane bleomicinom (71). Razina kaspaze-1 i sFas liganda u serumu korelira sa zahvaćenosti kože, pluća, promjenama zglobova i kostiju (72). Prisustvo autoprotutijela protiv kaspaze-3 u SSc povezano je s težinom plućne fibroze, oštećenjem krvnih žila i upalom (73). Utvrđen je porast apoptoze u cirkulirajućim kulturama limfocitima SSc bolesnika s pozitivnom anti-RNK polimerazom (70). Distler i suradnici su predložili teoriju da mikročestice dobivene iz aktiviranih ili apoptotičkih endotelnih stanica induciraju apoptozu u cirkulirajućim angiogenim stanicama (74). S druge strane Laplante i suradnici postuliraju da kronični porast endotelne apoptoze i/ili povećana osjetljivost fibroblasta na posrednike proizvedene unutar apoptotskih endotelnih stanica mogu činiti osnovu fibrotičkog odgovora karakteriziranog trajnom indukcijom antiapoptotskog fenotipa u fibroblastima i upornom diferencijacijom miofibroblasta (68).

1.3. PROLIFERACIJA

Proliferacija je uzastopno stvaranje ili umnožavanje novih stanica ubrzanim mitotičkim diobama tijekom stvaranja novoga tkiva. Fiziološka proliferacija javlja se tijekom embrionalnoga razvoja ali i u stanjima u kojima je potrebno ubrzano umnožavanje stanica, kao kod upale ili obnavljanja tkiva. Patološka proliferacija javlja se kod bujanja malignih tumorskih stanica. Opseg proliferacije može se procijeniti različitim citološkim i histološkim postupcima. Od imunohistokemijskih metoda najviše se koristi određivanje antigena jezgre Ki-67 (Ki-67 prema Kiel University, a 67 prema rednom broju u mikrotitarskim pločicama kada je otkriven). Ki-67 je nehistonska jezgrina bjelančevina (75) koja se nalazi u stanicama u svim fazama staničnog ciklusa (G1, S, M i G2 faza staničnog ciklusa), dok u fazi mirovanja stanice (G0 fazi) nije prisutna. Stoga je izvrstan biljeg stanične proliferacije (76-78). Istraživanja su pokazala da je bjelančevina Ki-67 neophodna za staničnu proliferaciju i da ima ulogu u sintezi jezgrine rRNK ovisne o RNK polimerazi I (79). U regulaciji proliferacije, međudjelovanja stanica, stanica i izvanstanične tvari, upali i zacjeljivanju rana važnu ulogu imaju sindekani (80). Sindekani (od grčke riječi vezati zajedno) su dio velike obitelji transmembranskih bjelančevina koje imaju sposobnost vezanja lanaca heparin-sulfata i hondroitin-sulfata, a najviše su izraženi u tkivima mezenhimskog i epitelnog porijekla (81). Sindekani su preko svojih heparin-sulfatnih lanaca u međudjelovanju s brojnim molekulama kao što su čimbenici rasta fibroblasta (FGF), endotelni čimbenici rasta krvnih žila (VEGF), transformirajući čimbenici rasta (TGF), trombocitni čimbenici rasta (PDGF), citokini, proteinaze, adhezijski receptori i dijelovi međustanične tvari (82, 83). Njihova uloga je regulacija odnosa stanica i međustanične tvari, kao i stanične adhezije i proliferacije (84). Time ne reguliraju samo ključne događaje u razvoju i homeostazi, nego i ključne mehanizme upalnog odgovora domaćina uglavnom reguliranjem funkcije citokina i prodiranja leukocita iz krvnih žila u tkiva. Postoje četiri gena koja kodiraju sindekane (83), od kojih je sindekan-1 uglavnom izražen u stanicama epitela i plazma stanicama, a u manjoj mjeri u drugima stanicama kao što su endotelne stanice, monociti i fibroblasti. Sindekan-2 je izražen u stanicama mezenhimskog podrijetla i endotelnim stanicama, sindekan-3 u neuronalnim i koštanomišićnim tkivima, a sindekan-4 u skoro svim vrstama stanica, ali je slabije izražen od ostalih sindekana (81, 85). Sindekan-1 i sindekan-4 su uključeni u epitelno-mezenhimsku transformaciju za vrijeme razvoja i cijeljenja rana uglavnom kroz svoju sposobnost vezanja čimbenika rasta i podešavanja nizvodne signalizacije (84, 86, 87). Kao rezultat ovih međudjelovanja, sindekani pokreću niz događaja biološke signalizacije

bitnih za staničnu adheziju, angiogenezu, upalu i obnavljanje tkiva. Ranije je objavljeno da je razina sindekana u serumu životinja izravno povezana s težinom upale (27, 28). Druga izvješća sugeriraju da gubitak sindekana iz stanica („shedding“) regulira upalne reakcije. Nakon izraženijeg prijanjanja leukocita na endotel posredovanjem molekula integrina i adhezije (npr. ICAM-1, VCAM-1) dolazi do prodiranja leukocita izvan krvnih žila. Pretpostavlja se da se sindekan-1 može suprotstaviti integrinima vjerojatno nadmetanjem za isto vezno mjesto, stoga njegova odsutnost može potaknuti snažnu, integrinom posredovanu, adheziju leukocita na endotel (38).

1.3.1. Uloga proliferacije u sistemskoj sklerozi

Proliferacija je apoptozi kompenzatorni mehanizam, a studije stanične proliferacije u SSc pokazale su proturječne rezultate, od onih koje dokazuju veći proliferacijski potencijal (88), do onih koje ne pokazuju značajniju razliku proliferacijskog potencijala (89, 90). Nedavno su u studiji na kožnim endotelnim stanicama bolesnika sa SSc Mazzotta i sur. utvrdili značajno smanjen izražaj proliferacijskog biljega Ki-67 uz povećan izražaj apoptotskog biljega kaspaze-3 u usporedbi sa zdravim kožnim endotelnim stanicama. Također je u koži oboljelih od SSc utvrđena snižena aktivnost microRNK-125b, epigenetskog regulatornog čimbenika, čime se objašnjava povećana apoptoza te snižena proliferacija u kožnim fibroblastima oboljelih od SSc (91).

Wu i sur. dokazali su da su razine sindekana-1 u serumu značajno veće u bolesnika sa SSc i to dominantno u bolesnika s dcSSc u kasnom stadiju te da su više razine serumskog sindekana-1 povezane s većom prevalencijom telangiektazija, povišenim sistoličkim tlakom desnog ventrikula i smanjenim difuznim kapacitetom pluća za ugljikov monoksid (92). Chen i sur. su dokazali da kožne lezije u dcSSc pokazuju povišenu ekspresiju sindekana 2 i 4, proteina koji reguliraju sposobnost fibroblasta za prijanjanje i skraćivanje izvanstanične tvari (93). Za razliku od njih Tanino i sur. su na mišjem modelu SSc dokazali da se smanjenjem sindekana-4 povećala TGF-β potaknuta Smad3 aktivacija i povećao izražaj kolagena i α-SMA. Na temelju ovih nalaza autori su postulirali da sindekan-4 inhibira razvoj plućne fibroze, barem dijelom, prigušivanjem TGF-β signalizacije (94).

1.4. ČIMBENIK RASTA VEZIVNOG TKIVA

Čimbenik rasta vezivnog tkiva CTGF (*engl. connective tissue growth factor)* je mitogeni profibrotički citokin i promotor Endo-MT koji modificira različite čimbenike rasta i citokine, a potaknut je u fibroblastima nakon aktivacije transformirajućim čimbenikom rasta ß (TGF-ß) (95). Svoje funkcije obavlja vezanjem na različite stanične receptore uključujući receptore za integrin i sindekane, a također veže čimbenike rasta i proteine međustanične tvari. Smatra se da međudjelovanje CTGF s različitim molekulama uključujući citokine i čimbenike rasta, receptore i proteine ECM mijenja putove provođenja signala u kojima oni sudjeluju što rezultira promjenama staničnog odgovora. Rezultat ove promjene signalizacije je promjena u staničnom prijanjanju i migraciji, angiogenezi i vaskularnoj propusnosti, diferencijaciji, uključujući formiranje i aktiviranje miofibroblasta, taloženje i pregradnju međustanične tvari, što zajedno dovodi do remodeliranja tkiva i promjenu u strukturi organa. Također potiče stvaranje miofibroblasta transdiferencijacijom iz drugih stanica, uključujući epitelne stanice (preko EMT, epitelno-mezenhimska transdiferencijacija), endotelne stanice (Endo-MT, endotelno-mezenhimska transdiferencijacija), fibroblaste ili fibrocite (iz koštane srži, mezenhimske matične stanice) (96). Time dovodi do remodeliranja tkiva i fibroze. Smatra se da CTGF sudjeluje s TGF-β u induciranju održane fibroze (97) i u povećanoj proizvodnji međustanične tvari (98). Remodeliranje tkiva u krvnim žilama može dovesti do lokalne hipertenzije i hipoksije koja ponovo izaziva pojačan izražaj CTGF (99), a time se uspostavlja pozitivna povratna veza koja dovodi do sve većeg remodeliranja tkiva. Osim navedenog CTGF potiče izražaj raznih citokina poput TGF-ß i VEGF, koji potiču veći izražaj CTGF (97, 100). Prekomjerni izražaj CTGF u fibroblastima potiče fibrozu u dermisu, bubrezima i plućima (99), a blokiranje CTGF u fibroblastima i stanicama glatkih mišića u velikoj mjeri smanjuje fibrozu kože izazvanu bleomicinom. CTGF u fiziološkim uvjetima ima ulogu u proliferaciji, regulaciji staničnog ciklusa, migraciji, adheziji, taloženju matriksa i remodeliranju tijekom hondrogeneze i angiogeneze, a u patološkim uvjetima CTGF rano inducira izražaj upalnih posrednika, aktivaciju miofibroblasta, akumulaciju međustanične tvari, potiče staničnu adheziju i ključni je čimbenik u remodeliranju podložne početne fibroze (96). Istraživanja CTGF u dermalnim fibroblastima SSc ukazuju na njegovu značajnu ulogu u održavanju fibroze izazvane TGF-ß (101).

1.4.1. Uloga čimbenika rasta vezivnog tkiva u sistemskoj sklerozi

Pored snažnog profibrotičkog učinka, CTGF sudjeluje u angiogenezi, razvoju mišićno-koštanog sustava, strukturnoj organizaciji vezivnog tkiva i implantaciji embrija. TGF-β potiče sintezu CTGF u fibroblastima, glatkim mišićnim stanicama krvnih žila i endotelnim stanicama te su brojna istraživanja dokazala da predstavlja snažnog posrednika fibrogenih učinaka TGF-β. Doista, CTGF proizveden kao odgovor na stimulaciju TGF-β zauzvrat potiče sintezu komponenata ECM kao što su tip I kolagen i fibronektin u dermalnim i plućnim fibroblastima a vrlo vjerojatno i u endotelnim stanicama (102). Također i hipoksija, uzrokovana mikrovaskularnim promjenama, pojačava izražaj CTGF. (94, 103). Ova zapažanja su potakla velik broj istraživanja koje ispituju ulogu CTGF u patogenezi SSc. Dokazano je da je CTGF u SSc povišen u serumu i fibrotičkoj koži, a povezan je sa fibrozom i u drugim organima (104). U interakciji s TGF-ß izaziva postojanu fibrozu i potiče transdiferencijaciju endotelnih stanica u miofibroblaste (11). Kontinuirano je potaknut u koži bolesnika sa SSc, a selektivno prekomjeran izražaj CTGF u fibroblastima dovodi do fibrotičkog fenotipa (102). U njegovom odsustvu nestaje kožna fibroza, a liječenje anti-CTGF protutijelima s ciljem postizanja antifibrotskog učinka pokazalo se učinkovito u životinjskom modelu SSc (102). Dokazan je snažan izražaj CTGF u svim slojevima stijenke želuca oboljelih od SSc (105). U bolesnika s intersticijskom bolesti pluća povezanom sa SSc (SSc-ILD) utvrđena je viša serumska razina CTGF u odnosu na ostale bolesnike sa SSc uz pozitivnu povezanost između razine u serumu i težine bolesti (niži FVC i niži DLCO) (106). Također se čini da su neki polimorfizmi CTGF gena povezani sa češćim razvojem SSc-ILD (107).

1.5. ALFA-AKTIN GLATKIH MIŠIĆNIH STANICA

Vjeruje se da su aktivirani miofibroblasti, koji ispoljavaju α-aktin glatkog mišića (α-SMA) odgovorni za povećano stvaranje međustanične tvari što je svojstveno sistemskoj sklerozi. Alfa-aktin glatkih mišićnih stanica je bjelančevina staničnog skeleta, aktinska izoforma, koja prevladava u glatkim mišićnim stanicama i igra važnu ulogu u fibrogenezi (108). Aktini su obitelj globularnih multifunkcionalnih proteina koji oblikuju mikrofilamente. Promjene u aktinskim filamentima povezuju se s preživljenjem stanice, staničnom diferencijacijom te staničnom polarnošću (109). Miofibroblasti ispoljavaju α-SMA i imaju kontraktilna i sekretorna svojstva koja su ključna za kontrolu građe tkiva. Taj citoskeletni protein smješten je u glatkim mišićnim stanicama krvnih žila, služi za prikazivanje mišićne stijenke krvnih žila, ukazujući na razinu prokrvljenosti tkiva, a također je i biljeg miofibroblasta pronađenih tijekom zacjeljivanja tkiva (110).

Smatra se da su miofibroblasti metabolički i morfološki oblik fibroblasta koji su se djelomično diferencirali prema fenotipu glatkih mišića i izražavaju α-SMA (108). Njihova aktivacija igra ključnu ulogu u nastanku fibroze. Aktivirani miofibroblasti izražavaju molekule stanične adhezije omogućujući specifično međudjelovanje s imunološkim i upalnim stanicama, uključujući limfocite, mastocite i neutrofile. Općenito je prihvaćeno mišljenje da diferencijacija fibroblasta u miofibroblast predstavlja ključni događaj tijekom zarastanja rana i obnavljanja tkiva. Velika kontraktilna sila koju stvaraju miofibroblasti povoljno djeluje na fiziološku pregradnju tkiva, ali kad postane prekomjerna štetno djeluje na tkivo, poput nastajanja hipertrofičnih ožiljaka i kod gotovo svih bolesti obilježenih fibrozom (111). U aktiviranom stanju miofibroblasti se prestaju umnožavati i počinju sintetizirati velike količine proteina izvanstanične tvari, a s aktivacijom miofibroblasta korelira izražaj α-SMA. Miofibroblasti koji sudjeluju u zacjeljivanju rana i obnavljanju tkiva se nakon zacjeljivanja gube apoptozom. Pretpostavlja se da ovaj mehanizam ne djeluje kod fibrotičkih procesa, što dovodi do opstanka miofibroblasta i posljedičnog nakupljanja međustanične tvari (112).

Specifične molekularne osobine miofibroblasta kao i čimbenici koji kontroliraju diferencijaciju miofibroblasta potencijalni su ciljevi za sprječavanje njihovog razvoja, funkcioniranja i preživljavanja. Takve ciljne molekule uključuju α-SMA i novije otkrivene biljege miofibroblastnog citoskeleta, površinske membranske proteine i proteine međustanične tvari. Štoviše, djelovanje na prepoznavanje i prenošenje signala aktivacije miofibroblasta nudi nove mogućnosti djelovanja na smanjenje kontrakcije tkiva čime se postiže gubitak kontrakcije i potiče apoptoza (113, 114).

1.5.1. Uloga alfa-aktina glatkih mišića u sistemskoj sklerozi

Karakteristika SSc je povećana sinteza kolagena i izvanstanične tvari potaknuta aktivacijom fibroblasta i transformacijom fibroblasta u miofibroblaste što se fenotipski otkriva povećanim izražajem α-SMA.

Prisutnost miofobroblasta u SSc dokazana je u koži te korelira s količinom kolagena i kožnim parametrima povezanim s fibrozom kao što su zategnutost, tvrdoća i krutost. U plućima bolesnika sa SSc prisutnost miofibroblasta u intersticijskom prostoru se može primijetiti već u ranom tijeku fibrotičkog procesa, a s napredovanjem intersticijske bolesti pluća mogu se dokazati i u bronhoalveolarnom lavatu (115). Prisutnost patoloških miofibroblasta negativno utječe na rad pluća. Njihova sposobnost stvaranja izvanstanične tvari uništava alveolarnu građu i povećava debljinu međualveolarnog prostora, što oboje dovodi do smetnji disanja. Prisustvo miofibroblasta može izazvati prekomjerno sužavanje krvnih žila koje je dodatno pojačano i utjecajem endotelina-1 (ET-1), snažnog vazokonstriktora oslobođenog iz miofibroblasta. Navedene promjene dovode do otežanog protoka krvi u plućima što uzrokuje naprezanje desne srčane klijetke. Miofibroblasti se u SSc osim u koži i plućima mogu otkriti i u jednjaku i želučanoj stijenci bolesnika s teškom fibrozom (105). Ovdje prisutnost miofibroblasta dovodi do gubitka mišićne funkcije i kontraktilnosti što za posljedicu ima povrat želučane kiseline u jednjak i razvoj gastroezofagealne refluksne bolesti. I organi poput bubrega, crijeva i miokarda u SSc mogu biti pod utjecajem fibroze posredovane miofibroblastima (116). No, u kasnoj fazi SSc kada dominiraju fibrotičke i atrofičke promjene ove se stanice više ne mogu dokazati i one najvjerojatnije nestaju apoptozom (117).

Dosadašnjim istraživanjima na želucu oboljelih od SSc utvrđeno je nakupljanje kolagena, povećana prisutnost miofibroblasta te povećana izraženost profibrotičkih čimbenika TGF-ß, CTGF i ET-1 (105, 118) dok proliferacija i apoptoza nisu istraživane. Jedina ispitivanja odnosa apoptoze i proliferacije u oboljelih od SSc provedena su na kožnim endotelnim stanicama i utvrđena je izražajnija apoptoza, uz smanjenu proliferaciju u usporedbi s kontrolnim tkivom (91, 119). Istraživanjem izražaja apoptotskih i proliferacijskih čimbenika u želučanoj sluznici, profibrotičkog citokina CTGF kao pokazatelja Endo-MT s pojačanim izražajem biljega miofibroblasta može se pridonijeti razumijevanju nedovoljno poznatih patogenetskih procesa unutar probavnog sustava oboljelih od sistemske skleroze.

2. HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA

Zbog značajne fibroze koja je svojstvena sistemskoj sklerozi biljezi za apoptozu (kaspaza-3), miofibroblaste (α-SMA) te čimbenik rasta vezivnog tkiva (CTGF) u želučanoj sluznici oboljelih od sistemske skleroze pokazat će veću izražajnost u odnosu na kontrolnu skupinu, uz smanjen izražaj biljega za staničnu proliferaciju (Ki-67), što će biti praćeno većim oštećenjem epitela (sindekan-1) i nakupljanjem kolagena.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja je primjenom imunohistokemijskih i imunofluorescentnih metoda u želučanoj sluznici oboljelih od sistemske skleroze i ispitanika bez SSc usporediti prostornu raspodjelu i moguću ulogu proliferacijskih i apoptotskih čimbenika u razvoju bolesti tako da će se između ispitivane i kontrolne skupine te unutar ispitivane skupine ovisno o obliku i težini bolesti analizirati slijedeće:

1) Usporediti prostornu raspodjelu i broj (postotak) apoptotskih (kaspaza-3) i proliferacijskih (Ki-67) stanica te biljega miofibroblasta (α-SMA).
2) Primjenom dvostrukog bojanja (imunofluorescencije) analizirati prostornu raspodjelu pojavljivanja biljega miofibroblasta (α-SMA) i proliferacijskih (Ki-67) stanica.
3) Primjenom imunofluorescencije analizirati prostornu izražajnost biljega epitela (sindekan-1) i čimbenika rasta vezivnog tkiva (CTGF).
4) Usporediti postotak i raspodjelu istraživanih čimbenika s kliničkim stadijima sistemske skleroze

4. METODE ISTRAŽIVANJA

4.1. Ispitanici

U istraživanje je uključeno 15 ispitanika sa SSc, starijih od 18 godina kojima je dijagnoza postavljena temeljem kriterija Američkog reumatološkog društva/Europske lige protiv reumatizma (18), s trajanjem bolesti duljim od 6 mjeseci, koji se liječe u Zavodu za reumatologiju i kliničku imunologiju KBC Split i 5 ispitanika koji ne boluju od sistemske skleroze, a koji odgovaraju po dobi i spolu. Kriteriji isključivanja su sindromi preklapanja, maligna bolest, terapija sa potencijalno citotoksičnim učinkom (metotreksat, ciklofosfamid, mikofenolat mofetil), doza glukokortikoida veća od 10 mg na dan, kronična aktivna ili akutna infekcija i *Helicobacter pylori* infekcija. Ispitivanje je provedeno uz odobrenje Etičkog povjerenstva KBC Split i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu uz strogo poštivanje etičkih i bioetičkih principa u skladu s Nürnberškim kodeksom i najnovijom revizijom Helsinške deklaracije. Svi ispitanici su prije početka istraživanja potpisali informirani pristanak u kojem je objašnjen postupak i tijek istraživanja.

4.2. Postupci

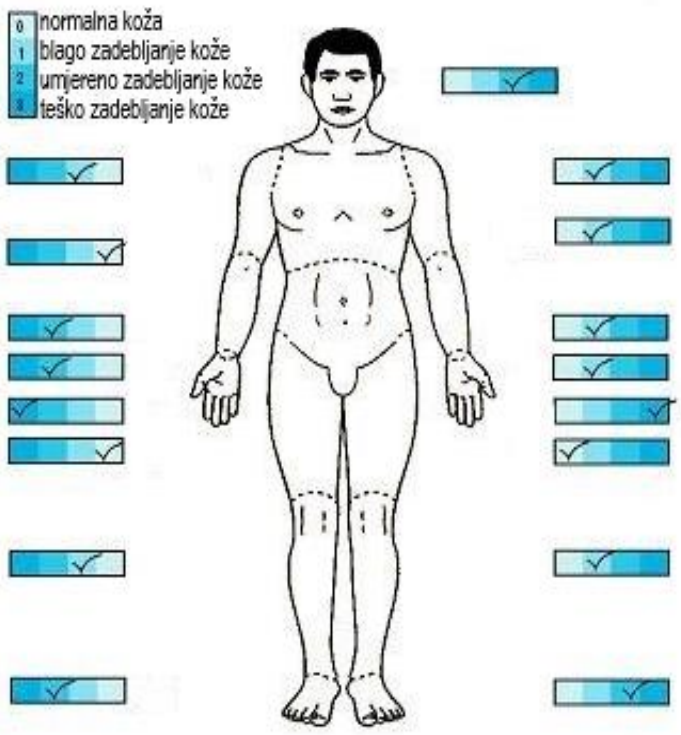
Svi ispitanici oboljeli od SSc su u trenutku uključivanja u istraživanje prošli fizikalni pregled i laboratorijsku analizu, uključujući kompletnu krvnu sliku (KKS), mjerenje brzine sedimentacije eritrocita (SE), testove funkcije bubrega (kreatinin, urea) i jetre (AST, ALT, GGT) i razinu komplementa (C3, C4), prisutnost ANA, ACA i anti-Scl-70. Procijenjen je stupanj fibroze kože pomoću modificiranog kožnog testa po Rodnanu (120) te određen podtip SSc (difuzna ili ograničena SSc) prema LeRoy-u (19).

Osim navedenog, u vrijeme uzimanja tkiva prikupljene su slijedeće karakteristike bolesnika: spol, dob, trajanje bolesti mjereno od pojave prvih simptoma u skladu sa SSc, prisutnost digitalnih ulceracija, zahvaćenost zglobova/tetiva, mišića, bubrega, krvožilnog, srčanog i probavnog sustava.

U svrhu procjene zahvaćenosti pluća napravljena je spirometrija s određivanjem difuzijskog kapaciteta za ugljikov monoksid (DLCO) izražen kao postotak predviđenih vrijednosti, a kardiovaskularnog sustava elektrokardiogram (EKG) i Doppler ehokardiografija (UZV srca) s određivanjem sistoličke funkcije lijeve komore (EFLV) i procjenom sistoličkog tlaka plućne arterije (sPAP).

Iz medicinske dokumentacije bolesnika, ali ne starije od godine dana, prikupljeni su podaci o prisutnosti intersticijske bolesti pluća (ILD) potvrđene kompjuteriziranom tomografijom (CT) pluća. Iz dobivenih podataka procijenjen je stupanj zahvaćenosti pojedinih organskih sustava prema Medsger-ovoj ljestvici (121).

Prema Medsger-ovoj ljestvici po pet pacijenata je klasificirano u grupu s blagom, umjerenom ili teškom bolešću.



Slika 3. Testna lista za određivanje modificiranog Rodnanovog kožnog testa (122).

Modificirani Rodnanov kožni test (Slika 3.) izvodi se se jednostavnom kliničkom palpacijom kože na 17 anatomskih područja tijela: lice, prednji dio prsnog koša, trbušna stijenka (na desnoj i lijevoj strani), nadlaktice, podlaktice, dorzum šaka, prsti, natkoljenice, potkoljenice i dorzum stopala.

Koža se opisuje na ljestvici od nula do tri gdje je:

0 – normalna koža

1 – blago zadebljanje kože

2 – umjereno zadebljanje kože

3 – teško zadebljanje kože

Svako od 17 navedenih područja se zasebno vrednuje i zbroj svih područja predstavlja ukupan broj bodova (120).

Težina kliničke slike procjenjuje se prema modificiranoj Medsger-ovoj ljestvici (Tablica 3.) koji objedinjuje devet organskih sustava (121). Zahvaćenost pojedinog organskog sustava se prikazuje u rasponu od urednog nalaza (0) do terminalne zahvaćenosti (4). Pristranost mjeritelja umanjena je uključenjem dva reumatologa u procjenu stupnja težine bolesti i mRSS.

Tablica 3. Testna lista za procjenu težine kliničke slike SSc u skladu s modificiranom Medsger-ovom ljestvicom

	Uredan nalaz	Blaga (1)	Umjerena (2)	Teška (3)	Terminalna (4)
opći status	gubitak TT <5% Htc >0,37 l/l Hgb >123 g/l	gubitak TT 5,0-9,9% Htc 0,330-0,369 l/l Hgb 110-122 g/l	gubitak TT 10,0-14,9% Htc 0,290-0,329 l/l Hgb 97-109 g/l	gubitak TT 15,0-19,9% Htc 0,250-0,289 l/l Hgb 83-96 g/l	gubitak TT >20% Htc<0,250 l/l Hgb<83 g/l
periferne krvne žile	Bez Raynaudovog fenomena ili Raynaudov fenomen koji ne zahtijeva liječenje	Raynaudov fenomen koji zahtijeva liječenje	ožiljci kože prstiju	ulceracije na vršcima prstiju	gangrena
koža	mRSS 0	mRSS 1-14	mRSS 15-29	mRSS 30-39	mRSS >40
zglobovi/ tetive	udaljenost vršak prsta-dlan pri fleksiji 0-0,9 cm	udaljenost vršak prsta-dlan pri fleksiji 1,0-1,9 cm	udaljenost vršak prsta-dlan pri fleksiji 2,0-3,9 cm	udaljenost vršak prsta-dlan pri fleksiji 4,0-4,9 cm	udaljenost vršak prsta-dlan pri fleksiji >5 cm
mišići	uredna snaga proksimalnih mišića	blaga slabost proksimalnih mišića	umjerena slabost proksimalnih mišića	značajna slabost proksimalnih mišića	neophodna tuđa pomoć
probavni sustav	uredna pasaža jednjaka i/ili tankog crijeva	hipoperistaltika distalnog dijela jednjaka i/ili tankog crijeva	Bakterijsko prerastanje koje zahtjeva antibiotsko liječenje	malapsorpcija pseudo-opstrukcija	parenteralna prehrana
pluća	DLCO >80% FVC >80% RTG bez fibroze sPAP <35mmHg	DLCO 70-79% FVC 70-79% RTG fibroza sPAP 35-49 mmHg	DLCO 50-69% FVC 50-69% sPAP 50-64 mmHg	DLCO <50% FVC<50% sPAP>65mm Hg	potreban kisik
srce	EKG: normalan LVEF >50%	EKG: smetnje provođenja LVEF 45-49%	EKG: aritmije LVEF 40-44%	EKG: aritmije LVEF 30-40%	srčano zatajenje LVEF <30%
bubreg	bez podatka o SRC, kreatinin <115 µmmol	SRC u anamnezi kreatinin <130 µmmol	SRC u anamnezi kreatinin 130-210 µmmol	SRC u anamnezi kreatinin 210-440 µmmol	SRC u anamnezi kreatinin >440 µmmol /dijaliza

TT: tjelesna težina, Htc: hematokrit, Hgb: hemoglobin, mRSS: modificirani kožni test po Rodnanu, DLCO: difuzijski kapacitet za ugljikov monoksid, FVC: forsirani vitalni kapacitet, RTG: radiogram, sPAP: procijenjeni sistolički tlak plućne arterije, mmHg: milimetar žive, EKG: elektrokardiogram, EF: ejekcijska frakcija lijevog ventrikula, SRC: sklerodermijska renalna kriza.
*samo je jedna stavka potrebna da bi se bolesniku dodjelila procjena određenog stupnja težine bolesti.

4.2.1. Laboratorijsko testiranje

Rutinski hematološki i biokemijski parametri uključujući SE (Westergren metodom), KKS, CRP, kreatinin, urea, AST, ALT, GGT mjereni su natašte u Zavodu za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Split.
Antinuklearna autoprotutijela određivana su metodom indirektne imunofluorescencije koja koristi Hep-2 stanice kao supstrat, a kozji anti-humani IgG obilježen fluorescein-izocijanatom kao konjugat (Inova Diagnostics, San Diego, SAD). Titar ≥1:160 smatran je pozitivnim nalazom. Za polukvantitativno određivanje autoprotutijela usmjerenih na različite antigene, među kojima su topoizomeraza I (Scl-70) i centromerni protein B (CENP-B), korištena je metoda mnogostrukog određivanja autoprotutijela (multiplex imunoanaliza na mikrokuglicama, MIA). Analiza je provedena korištenjem testa Fidis Connective profile 14 (Theradiag, Marne La Vallee, Francuska). Rezultati su očitani na analizatoru Luminex 100/200 (Austin, SAD) metodom mjerenja temeljenom na protočnoj citometriji. Rezultati su izraženi u AU/ml, a rezultat ≥ 40 AU/ml se smatra pozitivnim nalazom.

4.2.2. Ezofagogastroduodenoskopija

Svi su ispitanici podvrgnuti ezofagogastroduodenoskopiji radi biopsije želučane sluznice. Ezofagogastroduodenoskopija se izvodila standardnom tehnikom, a biopsija želučane sluznice u području korpusa želuca je napravljena kliještima (Olympus Medical Systems Co Ltd, Tokyo, Japan). U sklopu pripreme bolesnika za ezofagogastroduodenoskopiju primijenjena je lokalna anestezija ždrijela ksilokainim u spreju.

4.2.3. Uklapanje tkiva

Komadići tkiva želučane sluznice fiksirani su u 4% formaldehidu tijekom 24 sata te su nakon ispiranja fosfatnim puferom dehidrirani u uzlaznim koncentracijama alkohola. Nakon ispiranja ksilolom, uklopljeni su u parafin na 56^0C. Serijski su izrezani na uzdužne rezove debljine 7 μm te postavljeni na predmetna stakla. Napravljeno je orijentacijsko bojanje svakog 10. stakla hemalaunom i eozinom kako bi se provjerila razina reza i očuvanost tkiva.
Za bojanje po Mallory-u, rezovi su inkubirani hematoksilinom 5 minuta, isprani vodom iz slavine, zatim inkubirani kiselim fuksinom 1 minutu, isprani destiliranom vodom i potom

diferencirani 1 minutu s 1% fosfomolibdenskom kiselinom. Rezovi su 15 minuta inkubirani u anilinskom modrilu, isprani destiliranom vodom, diferencirani 1-5 minuta 1% octenom kiselinom i dehidrirani u etanolu i ksilolu.
Analiza se provela na fluorescentnom mikroskopu (Olympus BX61, Tokio, Japan) opremljenim digitalnim fotoaparatom DP71 (Olympus, Tokio, Japan). Računalni programi ImageJ Software i Adobe Photoshop su korišteni za daljnju analizu slike.

4.2.4. Imunohistokemijsko bojanje

U ovom radu korištene su dvije tehnike dokazivanja prisutnosti biljega u tkivu: imunohistokemijska metoda u kojoj je primarno protutijelo na pojedini biljeg vizualizirano primjenom diaminobenzidina (DAB) te imunofluorescencija u kojoj su se primarna protutijela na pojedine biljege vizualizirala odgovarajućim sekundarnim fluorescentnim protutijelom. Oba postupka su započeta deparafiniranjem rezova u ksilolu, a zatim su se rezovi rehidrirali u alkoholima sve nižih koncentracija. Slijedila je inkubacija u 3% H_2O_2 (15 minuta pri sobnoj temperaturi), čime se inaktivirala endogena peroksidaza. Nakon toga su se rezovi kuhali u citratnom puferu (radi otkrivanja antigenskih mjesta) u mikrovalnoj pećnici na 95^0C kroz 17 minuta i isprali PBS-om (eng. *phosphate buffer saline*). Daljnji postupci su ovisili o uputama proizvođača za uporabu protutijela i o referentnim metodama laboratorija. Preparati su se inkubirali sa primarnim protutijelom – zečje monoklonalno protutijelo na kaspazu-3 (1:1500; AF835, R&D Systems Inc., Minneapolis, MI, SAD), isprali u PBS, inkubirali 30 min na sobnoj temperaturi s biotiniziranim sekundarnim protutijelom (UniTect ABC Kit, Oncogene, Boston, MA, SAD). Nakon ispiranja u PBS-u obojali su se diaminobenzidinskim (DAB) supstratom 10 minuta, ponovo isprali u destiliranoj vodi, prebojali hematoksilinom, dehidrirali u etanolu i ksilolu i prekrili pokrovnim stakalcem.
Stanice koje reagiraju na kaspaza-3 primarno protutijelo imale su smeđe obojane jezgre ili njihove apoptotičke fragmente. Rezovi inkubirani bez primarnih protutijela koristili su se kao negativne kontrole.
Slike su snimljene digitalnim fotoaparatom (SPOT Insight, Diagnostic Instruments, USA) montiranim na mikroskopu Olympus BX51 pomoću softvera SPOT.

4.2.5. Imunofluorescentno i dvostruko imunofluorescentno bojanje

Nakon deparafinizacije i rehidracije rezova kako je ranije opisano, za pojedinačno imunofluorescentno bojanje, rezovi su se inkubirali preko noći u vlažnoj komori s primarnim protutijelom - mišjim monoklonalnim protutijelom na humani sindekan-1 (1:100; B-A38, Abcam, Cambridge, Velika Britanija), a u nastavku studije koristilo se kozje poliklonalno protutijelo na CTGF (1:100, L-20, SC-14939, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, SAD).

Kombinacija primarnih protutijela za dvostruko imunofluorescentno obojenje je bilo zečje monoklonalno anti-humano Ki-67 protutijelo (1:500; ab16667, Abcam, Cambridge, Velika Britanija) i mišje monoklonalno anti-humano α-SMA protutijelo (1:100; M0851, DAKO, Glostrup, Danska).

Preparati su isprani u PBS-u i inkubirani 1 sat kombinacijom sekundarnih protutijela: magareće poliklonalno protutijelo na mišje IgG H&L Alexa Fluor 488 (1:500, ab150105, Abcam, Cambridge, Velika Britanija), magareće poliklonalno protutijelo na zečje IgG H&L Alexa Fluor 488 (1:500, ab150073, Abcam, Cambridge, Velika Britanija), magareće poliklonalno protutijelo na ovčje IgG H&L Alexa Fluor 488 (1:400, Molecular Probes Life Technologies, Oregon, USA) i kozje poliklonalno protutijelo na mišje IgG H&L TRITC (1: 400, ab6786, Abcam, Cambridge, Velika Britanija). Nakon ispiranja u PBS-u, rezovi su prebojani s DAPI dvije minute, ponovo isprani u PBS-u, uklopljeni u medij za uklapanje (Immuno-mount, Shandon Inc, Pittsburgh, PA, SAD) i prekriveni pokrovnim stakalcem. Preparati su pregledani fluorescencijskim mikroskopom Olympus BX51 (Olympus, Tokyo, Japan) i slikani DP71 digitalnom kamerom. Za analizu Ki-67 i α-SMA dobiveni su mikrofotografski snimci pomoću fluorescentnog mikroskopa i softvera DP-SOFT Verzije 3.1. Dva neovisna istraživača su kvantitativno procijenili broj stanica i klasificirali ih kao negativne (neobojane) ili pozitivne (obojane) stanice.

4.3. Materijali

U istraživanju su korištena slijedeća primarna protutijela: zečje monoklonalno protutijelo na kaspazu-3 (AF835, R&D Systems Inc., Minneapolis, MI, SAD), mišje monoklonalno protutijelo na sindekan-1 (B-A38, Abcam, Cambridge, Velika Britanija), mišje monoklonalno protutijelo na α-SMA (M0851, DAKO, Glostrup, Danska), zečje monoklonalno protutijelo na Ki-67 (ab16667, Abcam, Cambridge, Velika Britanija), kozje poliklonalno protutijelo na CTGF (L-20, SC-14939, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, SAD) te slijedeća sekundarna protutijela: magareće poliklonalno protutijelo na mišje IgG H&L Alexa Fluor 488 (ab150105, Abcam, Cambridge, Velika Britanija), magareće poliklonalno protutijelo na zečje IgG H&L Alexa Fluor 488 (ab150073 , Abcam, Cambridge, Velika Britanija), magareće poliklonalno protutijelo na ovčje IgG H&L Alexa Fluor 488 (Molecular Probes Life Technologies, Oregon, USA) i kozje poliklonalno protutijelo na mišje IgG H&L TRITC (ab6786, Abcam, Cambridge, Velika Britanija).

4.4. Statistička analiza

Rezovi tkiva podijeljeni su na područja 50 μm × 50 μm pri povećanju × 40. α-SMA i Ki-67 pozitivne stanice su brojane u najmanje 25 kvadrata. Postotak imunoreaktivnih stanica kaspaze-3 izračunate su iz ukupnog broja stanica u površinskim žlijezdama, površinskom epitelu i u dubokim žlijezdama. Samo se jako smeđe obojani intenzitet smatrao pozitivnim na aktivnu kaspazu-3. Podaci su testirani Kruskall-Wallisovim testom, a zatim Dunnovim post-hoc testom (GraphPad Software, La Jolla, CA, SAD). Razina statističke značajnosti se postavila na $P < 0,05$.

5. REZULTATI

5.1. Klinička obilježja bolesnika sa sistemskom sklerozom

U istraživanju je sudjelovao 15 bolesnika sa SSc i 5 kontrolnih ispitanika bez SSc. Svi ispitanici su bile žene. Prosječna dob SSc bolesnika bila je 54 godine. Deset bolesnika (66,66%) imalo je difuzni (dcSSc), a pet (33,33%) ograničeni kožni (lcSSc) oblik bolesti. Srednje trajanje bolesti bilo je 13 godina dok je mRSS iznosio 15 (4-26). U većine bolesnika (86,66%) bila su pozitivna ANA. Protutijela na centromeru su bila pozitivna u 26,66%, a anti-topoizomeraza I protutijela u 60,00% bolesnika. Deset bolesnika (66,66%) imalo je znakove zahvaćenosti probavnog sustava (Tablica 4.).

Tablica 4. Demografska, klinička i laboratorijska obilježja bolesnika sa SSc

Parametar		Vrijednost
Dob (godine)[a]		54.3±13.60
Spol	ženski	15 (100)
SSc trajanje (godine)[b]		13 (1-35)
SSc podtip	lcSSc	5 (33.33)
	dcSSc	10 (66.66)
Profil autoprotutijela	ANA	13 (86.66)
	ACA	4 (26.66)
	Anti-Scl 70	9 (60.00)
mRSS[b]		15 (4-26)
Zahvaćenost probavnog sustava	DA	10 (66.66)
Zahvaćenost zglobova/tetiva	DA	12 (80.00)
Zahvaćenost mišićnog sustava	DA	10 (66.66)
Digitalne ulceracije	DA	3 (20.00)
Zahvaćenost perif. krvnih žila	DA	12 (80.00)
Intersticijska bolest pluća	DA	8 (53.33)
DLCO[a]		58.4±22.16
Zahvaćenost srca	DA	3 (20.00)

[a]Vrijednosti izražene kao srednja vrijednost±standardna devijacija. [b] Vrijednosti izražene kao medijan s minimum-maksimum rasponom. Vrijednosti izražene kao absolutni broj (%) osim ako nije drugačije navedeno. SSc: sistemska skleroza; lcSSc: ograničena kožna sistemska skleroza; dcSSc: difuzna kožna sistemska skleroza, ANA: antinuklearna protutijela, ACA: anticentromerna protutijela, Anti-Scl-70: protutijela na topoizomerazu I, mRSS: modificirani kožni zbroj po Rodnanu, DLCO: difuzijski kapacitet za ugljikov monoksid (% predviđenog).

5.2. Histokemijsko (hematoksilin i eozin) i imunohistokemijsko bojanje kaspazom-3

a) Kontrolni uzorci

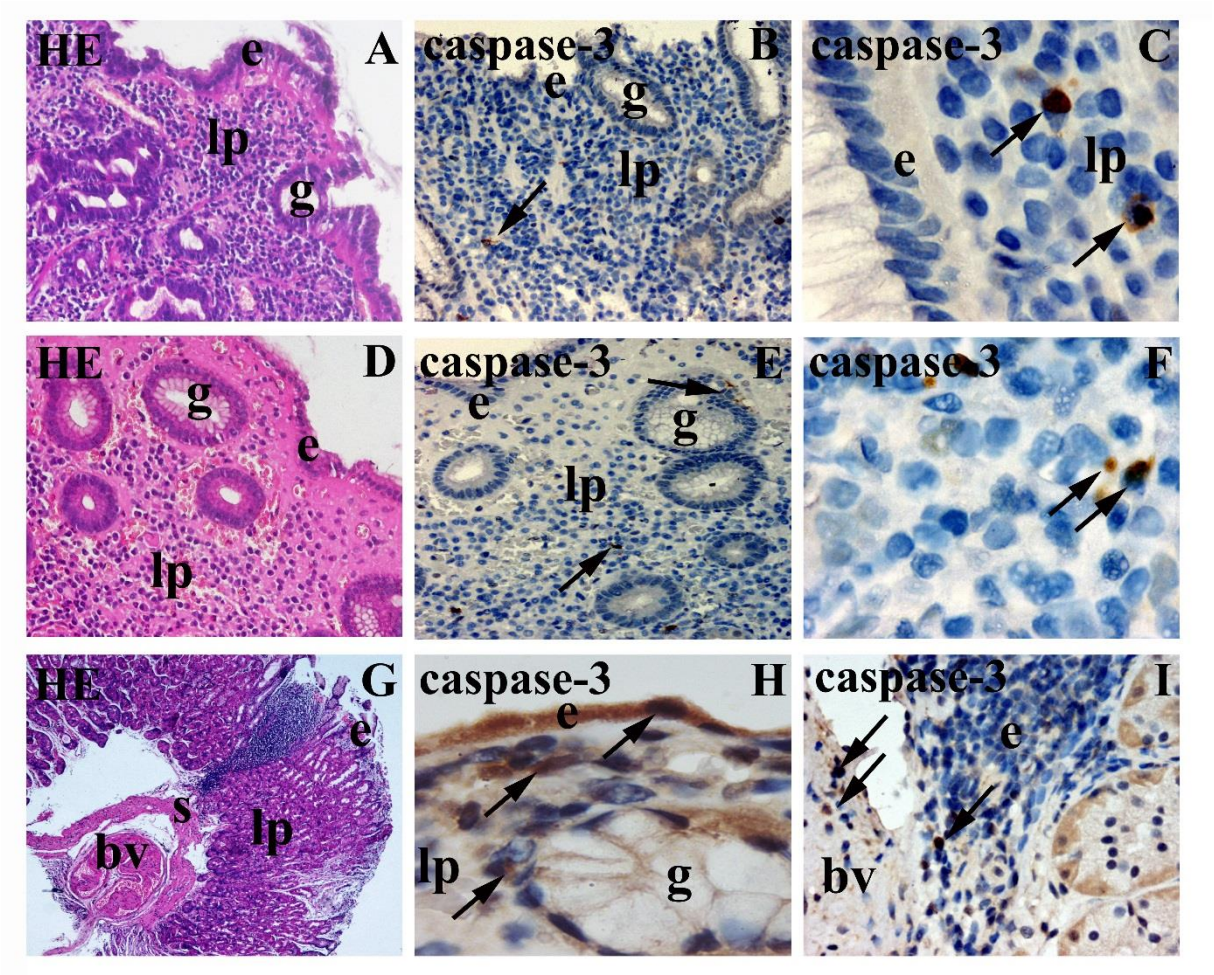
Normalna želučana sluznica kontrolnih uzoraka obojanih hematoksilinom i eozinom (H&E) sastoji se od površinskog cilindričnog epitela i vezivnog tkiva lamine proprije koja sadrži površinske želučane jame i žlijezde prekrivene blijedo obojenim mukoznim stanicama (Sl. 4A) i dubljih dijelova žlijezda prekriveni različitim tipovima stanica uključujući glavne stanice i parijetalne stanice (nisu prikazane). Lamina proprija je rahlo vezivno tkivo, bogato stanicama. Kada se oboji s kaspazom-3, želučana sluznica povremeno pokazuje smeđe obojane jezgre apoptotskih stanica prvenstveno u lamini propriji, a rijetko u površinskom žljezdanom epitelu (Sl. 4B, C).

b) Uzorci bolesnika s ograničenom kožnom sistemskom sklerozom

Želučana sluznica bolesnika s lcSS (bojanje H&E) pokazuje homogeni izgled lamine proprije između površinskog epitela i dijela najpovršnije smještenih žlijezda, sa smanjenjem stanica na zahvaćenom području (Sl. 4D).
Bojanje kaspazom-3 otkriva nekoliko smeđe obojanih jezgara apoptotskih stanica smještenih u lamini propriji i površinskim žlijezdama. Lamina proprija između površinskog epitela i žlijezda ima hijalizirani izgled s apoptotskim stanicama na rubu te zone (Sl. 4E).
Veće povećavanje lamine proprije pokazuju brojne pjenušave (vakuolizirane) stanice, kao i apoptotske stanice i tijela (Sl.4F).

c) Uzorci bolesnika s difuznom kožnom sistemskom sklerozom

Želučana sluznica i submukoza bolesnika s umjerenom, a posebno s teškim oblikom SSc, pokazuju oštećenja površinskog epitela i nakupljanje upalnih stanica (limfocita) koje se protežu kroz cijelu dubinu sluznice. Submukoza sadrži značajno promijenjene krvne žile (Sl. 4G). Bojanje kaspazom-3 otkriva da su stanice površinskog epitela apoptotske, kao i stanice u lamini propriji, površnim i dubokim žlijezdama (Sl. 4H). Brojne apoptotičke stanice opažene su i u području nakupljanja limfocita i u stijenci velikih krvnih žila u submukozi (Sl. 4I).



Slika 4. Histokemijsko (hematoksilin i eozin) i imunohistokemijsko bojanje kaspazom-3.

Želučana sluznica se sastoji od: pokrovnog cilindričnog epitela (e), vezivnog tkiva lamine proprije (lp), želučanih žlijezda (g) i apoptotskih stanica (strelice) (A).

U kontrolnim uzorcima opaženo je nekoliko apoptotskih stanica sa smeđe obojanom citoplazmom u površinskom epitelu, žlijezdama i lamini propriji (B, C).

Sluznica želuca u bolesnika s ograničenom kožnom sistemskom sklerozom (lcSSc) dodatno pokazuje vakuolizirane stanice i hijalinizaciju u lamini propriji, kao i povećani broj apoptotičnih stanica u žlijezdama i vezivnom tkivu (D - F).

Želučana sluznica bolesnika s difuznim kožnim oblikom sistemske skleroze (dcSSc) pokazuje brojne upalne stanice, abnormalne krvne žile (bv) u submukozi (s) i veliki broj apoptotičnih stanica u površinskom epitelu, žlijezdama, lamini propriji i stijenci krvnih žila.

5.3. Trikromno bojanje po Mallory-u

a) Kontrolni uzorci

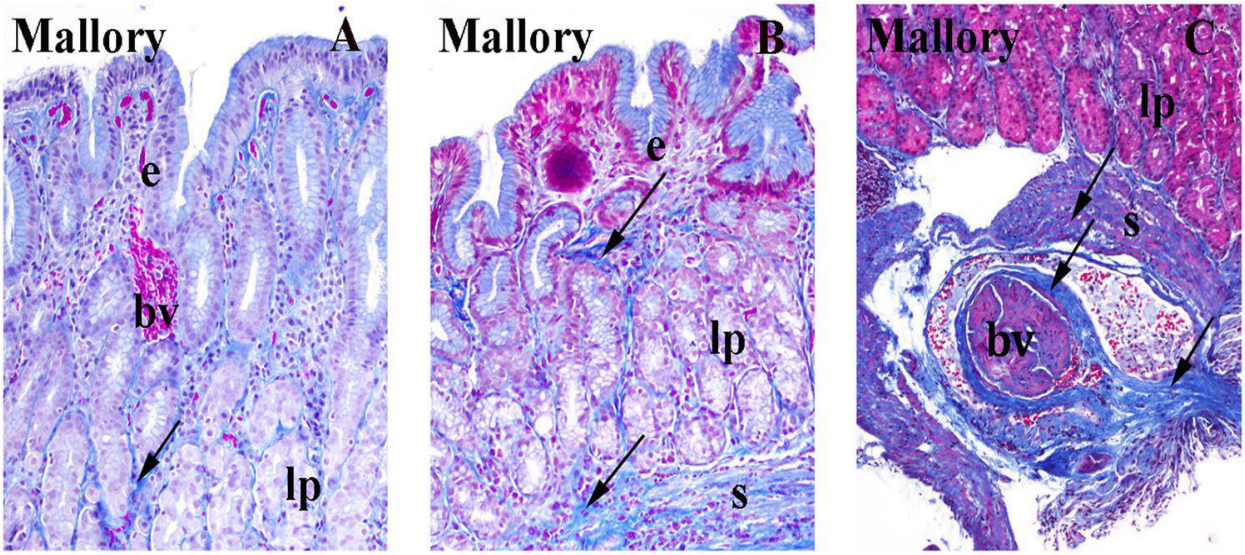
Bojanje po Mallory-u kontrolnih uzoraka pokazuje lagano do umjereno plavo obojenje kolagena vezivnog tkiva u lamini propriji koje također sadrži dijelove površinskih i dubljih žlijezda. Mukozni sadržaj površinskog epitela i žlijezda također je obojen svijetloplavo, dok su eritrociti obojeni crveno (Sl. 5A).

b) Uzorci bolesnika s ograničenom kožnom sistemskom sklerozom

Bojanje po Mallory-u pokazuje umjereno plavo obojenje nakupljenog kolagena u lamini propriji s odjeljcima kroz površinske i duboke žlijezde i jakim bojanjem kolagena u submukozi (Sl. 5B).

c) Uzorci bolesnika s difuznom kožnom sistemskom sklerozom

Bojanje po Mallory-u pokazuje vrlo snažno bojanje kolagena u lamini propriji i submukozi, koja sadrži krvne žile s izraženo zadebljanom intimom (Sl. 5C).



Slika 5. Bojanje po Mallory-u za otkrivanje kolagena (strelice) u želučanoj sluznici kontrole (A), ograničenog kožnog (B) i difuznog (C) kožnog oblika sistemske skleroze: epitel (e), lamina proprija (lp), submukoza (s), krvna žila (bv).

Za istaknuti je porast plavog obojenja kolagena (strelice) u lamini propriji (lp) i submukozi (s) od kontrole prema difuznoj kožnoj sistemskoj sklerozi.

5.4. Imunofluorescentno bojanje sindekanom-1

a) Kontrolni uzorci

Želučana sluznica kontrolnih uzoraka pokazuje imunoreaktivnost na sindekan-1 u površinskom epitelu želuca, površnim žlijezdama i stanicama lamine proprije, dok su duboke žlijezde želučane sluznice negativne na sindekan-1 (Sl. 6A-C).

b) Uzorci bolesnika s ograničenom kožnom sistemskom sklerozom

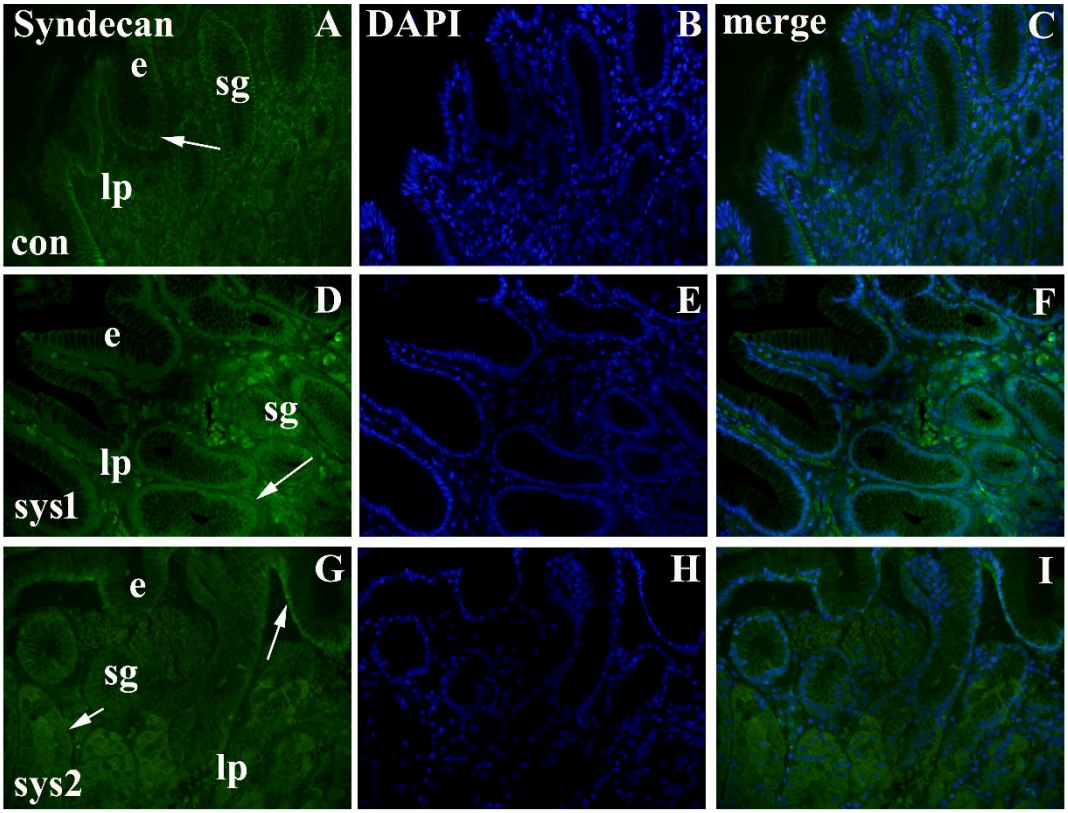
Prikazuje se uzorak bojanja sličan kontrolnoj želučanoj sluznici (nije prikazano).

c) Uzorci bolesnika s umjerenom difuznom kožnom sistemskom sklerozom

U želučanoj sluznici bolesnika s umjerenom dcSSc (sys1) imunoreaktivnost sindekana-1 odsutna je u površinskom epitelu, a slabo prisutna u bazalnim dijelovima nekih stanica. Imunoreaktivnost sindekana-1 samo se povremeno opaža u bazalnim dijelovima površinskih žlijezda i u nekim stanicama lamine proprije (Sl. 6D-F).

d) Uzorci bolesnika s teškom difuznom kožnom sistemskom sklerozom

U želučanoj sluznici bolesnika s teškim oblikom dcSSc (sys2), imunoreaktivnost na sindekan-1 je vrlo slabo prisutna u bazalnom dijelu nekih površinskih epitelnih stanica, a povremeno u stanicama lamine proprije. Izražaj sindekana-1 izostaje u površnim i dubokim žlijezdama želučane sluznice (Sl. 6G-I).



Slika 6. Imunofluorescentno bojanje sindekanom-1.

Sluznica želuca kontrolnih uzoraka (con) (A–C), umjerenog difuznog (sys1) (D-F) i teškog difuznog (sys2) (G-I) kožnog oblika sistemske skleroze: epitel (e), lamina proprija (lp), površinske želučane žlijezde (sg), reaktivnost na sindekan-1 (strelice).

Napomena: smanjenje izražaja sindekana-1 u uzorcima difuzne kožne sistemske skleroze u usporedbi s kontrolnim uzorcima.

5.5. Imunofluorescentno bojanje na CTGF

a) Kontrolni uzorci

Želučana sluznica kontrolnih uzoraka pokazuje povremenu imunoreaktivnost na CTGF u upalnim stanicama koje se nalaze u lamini propriji, dok su površinske i duboke žlijezde želučane sluznice negativne na CTGF (Sl. 7A-C).

b) Uzorci bolesnika s ograničenom kožnom sistemskom sklerozom

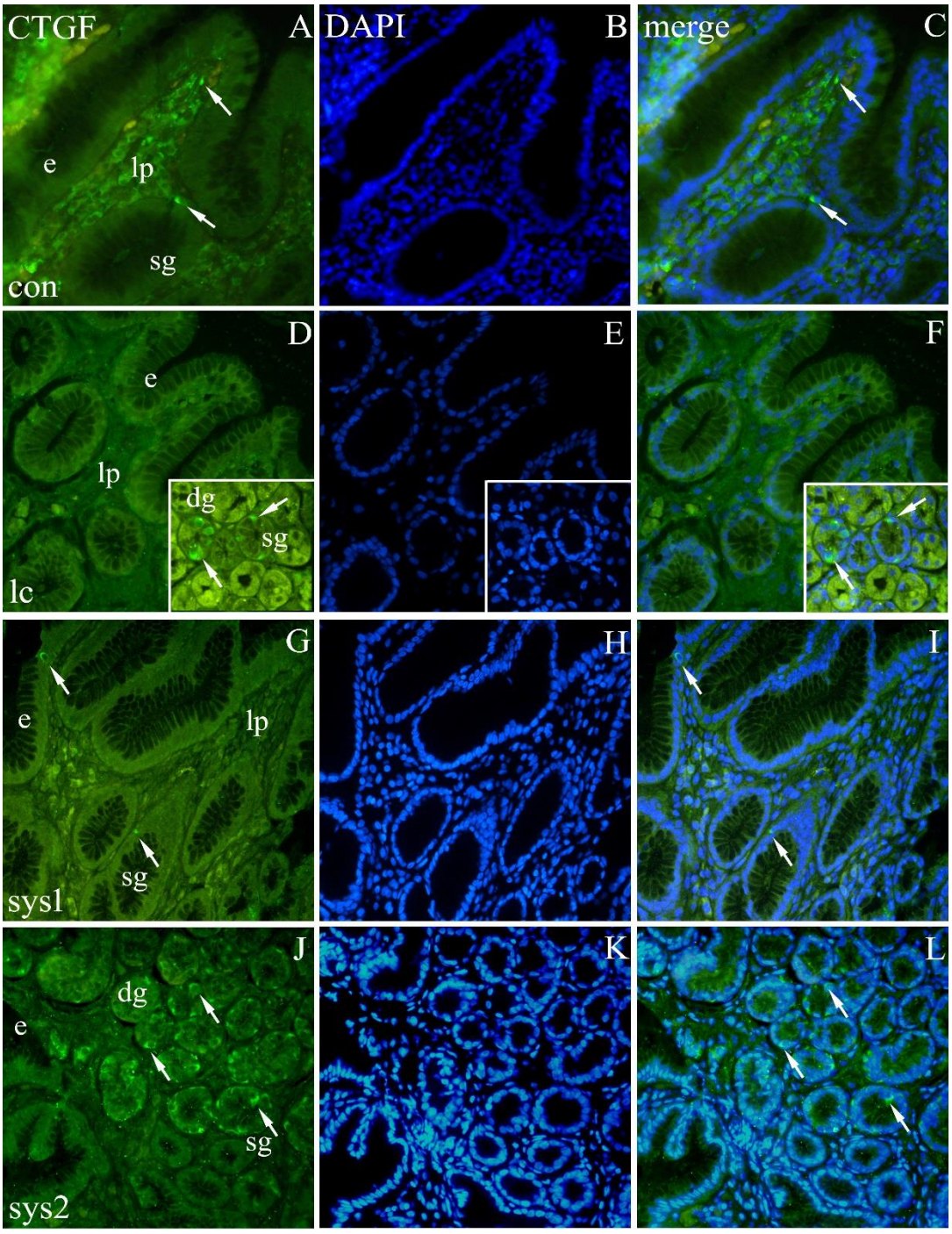
Želučana sluznica bolesnika s ograničenom SSc (lc) prikazuje oskudan uzorak bojanja na CTGF u površinskim i dubokim žlijezdama želučane sluznice, a povremeno se opaža u stanicama lamine proprije (Sl. 7D-F).

c) Uzorci bolesnika s umjerenom difuznom kožnom sistemskom sklerozom

U želučanoj sluznici bolesnika s umjerenom dcSSc (sys1) imunoreaktivnost CTGF prisutna je umjereno u površinskim i dubokim žlijezdama. Imunoreaktivnost na CTGF samo se povremeno opaža u nekim stanicama lamine proprije (Sl. 7G-I).

d) Uzorci bolesnika s teškom difuznom kožnom sistemskom sklerozom

U želučanoj sluznici bolesnika s teškim oblikom dcSSc (sys2), imunoreaktivnost na CTGF prisutna je povremeno u stanicama lamine proprije, a intenzivno u površinskim i dubokim žlijezdama želučane sluznice (Sl. 7J-L).



Slika 7. Imunofluorescentno bojanje na CTGF.

Sluznica želuca kontrolnih uzoraka (con) (A-C), ograničene kožne SSc (lc) (D-F), umjerene dcSSc (sys1) (G-I), teške dcSSc (sys2) (J-L), epitel (e), lamina proprija (lp), površne žlijezde (sg), duboke žlijezde (dg), reaktivnost na CTGF (strelice). U kontrolnim uzorcima pojačano nakupljanje CTGF u upalnim stanicama lamine proprije, a u SSc nakupljanje CTGF u stanicama površinskih i dubokih žlijezda, a najintenzivnije u teškom dcSSc (sys2).

5.6. Dvostruko imunofluorescentno bojanje primjenom protutijela za Ki-67 i α-SMA

a) Kontrolni uzorci

U želučanoj sluznici kontrolnih uzoraka (con), proliferacijske Ki-67 stanice tek se povremeno vide u lamini propriji i površnim žlijezdama (Sl. 8A), dok se u lamini propriji opaža snažno obojenje α-SMA, što odgovara miofibroblastima ili mioblastima krvnih žila (Sl. 8B). DAPI nuklearnim bojanjem obilježene su sve jezgre želučane sluznice, osim proliferirajućih stanica (Sl. 8C). Spajanjem triju bojanja otkriva se da se Ki-67 ne izražava u istim stanicama koje ispoljavaju α-SMA (Sl. 8D), što znači da ni fibroblasti ni mioblasti u zidovima krvnih žila ne proliferiraju u kontrolnoj želučanoj sluznici.

b) Uzorci bolesnika s ograničenom kožnom sistemskom sklerozom

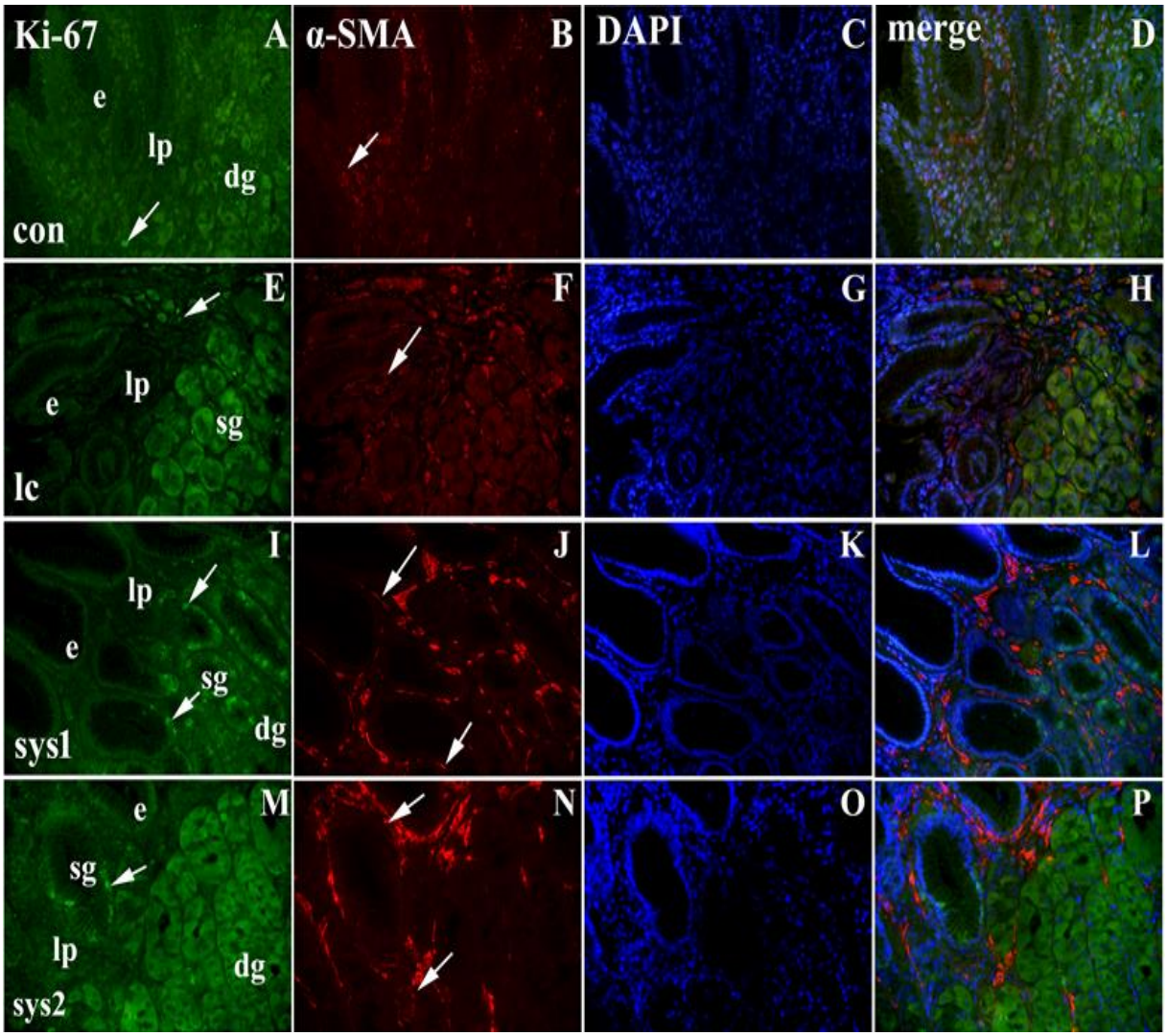
U želučanoj sluznici bolesnika s ograničenom kožnom sistemskom sklerozom (lc) uočen je lagano povećan broj proliferirajućih Ki-67 pozitivnih stanica u lamini propriji i površnim žlijezdama (Sl. 8E). Bojanje α-SMA obilježava povećani broj fibroblasta i mioblasta u stijenkama krvnih žila lokaliziranih u lamini propriji (Sl. 8F). DAPI nuklearnim bojanjem obilježene su sve stanične jezgre, osim onih obojenih Ki-67 (Sl. 8G). Spajanjem triju bojanja otkriva da se većina α-SMA pozitivnih stanica ne umnožava (ne eksprimiraju Ki-67), dok mala populacija stanica u lamini propriji koeksprimira Ki-67 i α-SMA, što ukazuje na moguću proliferaciju miofibroblasta ili mioblasta stijenke krvnih žila (Sl. 8H).

c) Uzorci bolesnika s umjerenom difuznom kožnom sistemskom sklerozom

Brojne proliferirajuće Ki-67 pozitivne stanice uočene su u lamini propriji, površnim i dubokim žlijezdama želučane sluznice bolesnika s umjerenom dcSSc (sys1) (Sl. 8I). Obilje α-SMA pozitivnih stanica vide se u lamini propriji (Sl. 8J), dok plavo DAPI bojanje karakterizira jezgre svih stanica, osim onih koje su Ki-67 pozitivne (Sl. 8K). Spajanje različitih obojenja pokazuje da se Ki-67 uglavnom ne koeksprimira u populaciji stanica pozitivnih na α-SMA (Sl. 8L).

d) Uzorci bolesnika s teškom difuznom kožnom sistemskom sklerozom

U uzorku želučane sluznice bolesnika s teškom difuznom kožnom SSc (sys2) Ki-67 pozitivne stanice su manje brojne nego u uzorku bolesnika s umjerenom dcSSc. Ki-67 pozitivne stanice su pretežno lokalizirane u površnim žlijezdama, dok se opažaju i u dubokim žlijezdama i lamini propriji (Sl. 8M). α-SMA stanice se vide u lamini propriji (Sl. 8N), dok se DAPI obojenje opaža u jezgrama većine stanica, osim Ki-67 pozitivnih (Sl. 8O). Spajanjem različitih bojanja otkriva se izostanak koekspresije Ki-67 i α-SMA, što ukazuje na odsutnost proliferacije miofibroblasta i mioblasta u stijenkama krvnih žila (Sl. 8P).



Slika 8. Dvostruko imunofluorescentno bojanje primjenom protutijela za Ki-67 i α-SMA. Distribucija i ko-ekspresija biljega proliferacije (Ki-67) i miofibroblasta (α-SMA) u želučanoj sluznici kontrolnih uzoraka (con) (A–D), ograničene kožne sistemske skleroze (lc) (E–H), umjerene difuzne kožne sistemske skleroze (sys1) (I–L) i teške difuzne kožne sistemske skleroze (sys2) (M–P): epitel (e), lamina proprija (lp), površinske žlijezde (sg), duboke žlijezde (dg), Ki-67 ili α-SMA pozitivne stanice (strelice).

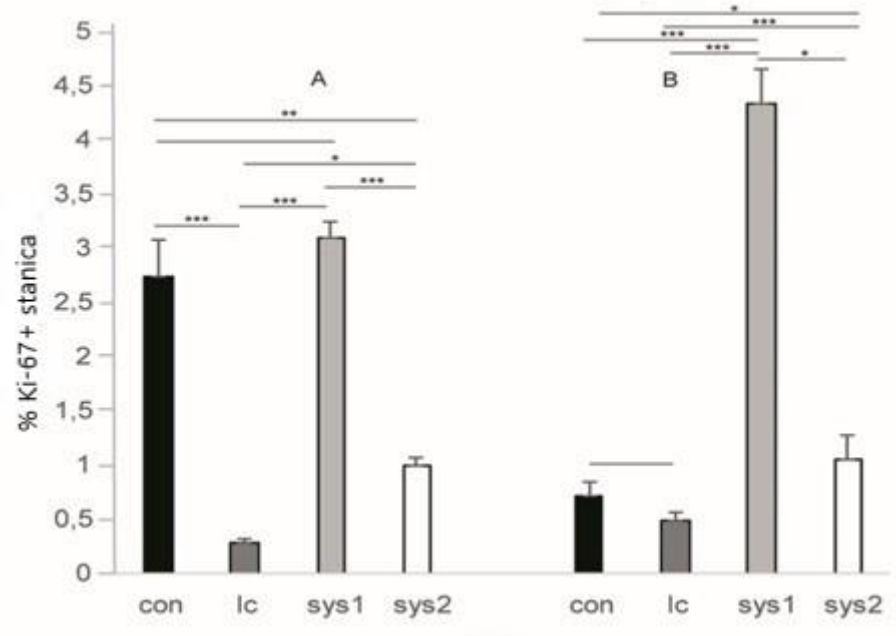
Povećanje ekspresije oba biljega u bolesnika sa sistemskom sklerozom, osobito u umjerenom difuznom kožnom obliku (sys1). Ko-ekspresijom Ki-67 i α-SMA se nije uspjela dokazati proliferacija miofibroblasta.

5.7. Statistička analiza

5.7.1. Postotak Ki-67 pozitivnih stanica

Proliferacija stanica u površinskim dijelovima lamine proprije i površinskim žlijezdama (A) uzoraka kontrolne skupine (con) je 2,7%, dok se u uzorcima bolesnika s lcSSc (lc) uočava samo povremeno (manje od 1%). U uzorcima bolesnika s umjerenom dcSSc (sys1) proliferacija se povećava i u lamini propriji i u površinskim žlijezdama na 3%, dok je u uzorcima bolesnika s teškom dcSS (sys2) pada na 1% (Sl. 9A).

Proliferacija u dubljim dijelovima lamine proprije i dubokim želučanim žlijezdama (B) iznosi 0,6% u uzorcima kontrolne skupine (con), dok u uzorcima bolesnika s lcSSc (lc) iznosi 0,5%. U uzorcima bolesnika s umjerenom dcSSc (sys1) proliferacija se povećava na 4,6% u vezivnom tkivu lamine proprije i dubokim žlijezdama, dok u uzorcima bolesnika s teškom dcSSc (sys2) proliferacija pada na 1% (Sl. 9B).



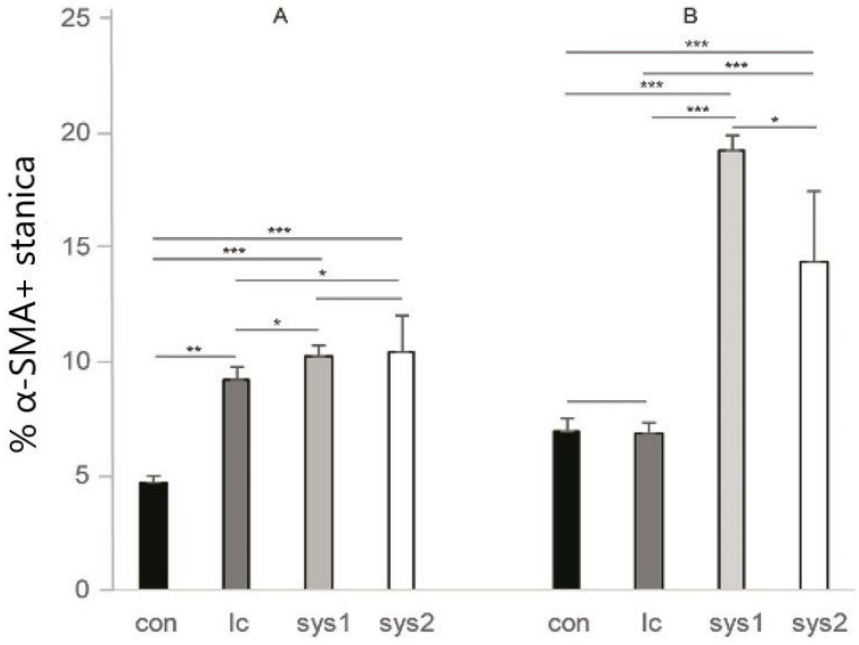
Slika 9. Postotak Ki-67 pozitivnih stanica u površinskim žlijezdama i površinskom epitelu (A) i dubokim žlijezdama (B) želučane sluznice u kontrolnim uzorcima i različitim oblicima sistemske skleroze. Legende: kontrola (con); ograničena kožna (lc); umjerena difuzna kožna (sys1); teška difuzna kožna sistemska skleroza (sys2). Značajne razlike su označene s *p < 0,01, **p < 0,001, ***p < 0,0001 (Kruskall-Wallisov test).

5.7.2. Postotak α-SMA pozitivnih stanica

Lamina proprija želučane sluznice (površinski i dublji dijelovi) analizirana je na pozitivne α-SMA stanice u uzorcima kontrolne skupine i skupina bolesnika s lcSSc, umjerenom i teškom dcSSc. Stanice pozitivne na α-SMA nalaze se uglavnom u stijenkama krvnih žila ili u miofibroblastima.

U površinskom dijelu lamine proprije (A) uzoraka kontrolne skupine (con) postotak α-SMA pozitivnih stanica je između 4 i 5%, dok je u uzorcima bolesnika s lcSSc (lc) 9% α-SMA pozitivnih stanica. U uzorcima bolesnika s dcSSc, i u umjerenoj (sys1) i u teškoj (sys2), postotak stanica pozitivnih na α-SMA je 10% (Sl. 10A).

U dubljem području lamine proprije (B) kontrolnih uzoraka (con) postotak α-SMA pozitivnih stanica je 7%, a isti postotak također karakterizira i uzorke bolesnika s lcSSc (lc). U uzorcima bolesnika s dcSSc dublji dijelovi lamine proprije sadržavaju 19% α-SMA pozitivnih stanica u uzorcima bolesnika s umjerenom dcSSc (sys1), a 14% u uzorcima bolesnika s teškom dcSSc (sys2) (Sl. 10B).



Slika 10. Postotak α-SMA pozitivnih stanica u površinskim dijelovima lamine proprije (A) i dubljim dijelovima lamine proprije sluznice želuca (B) u kontrolnim uzorcima i različitim oblicima sistemske skleroze. Legende: kontrola (con); ograničena kožna (lc); umjerena difuzna kožna (sys1); teška difuzna kožna (sys2) sistemska skleroza. Značajne razlike su označene sa *p < 0,01, **p < 0,001, ***p < 0,0001 (Kruskall-Wallisov test).

5.7.3. Postotak kaspaze-3 pozitivnih stanica

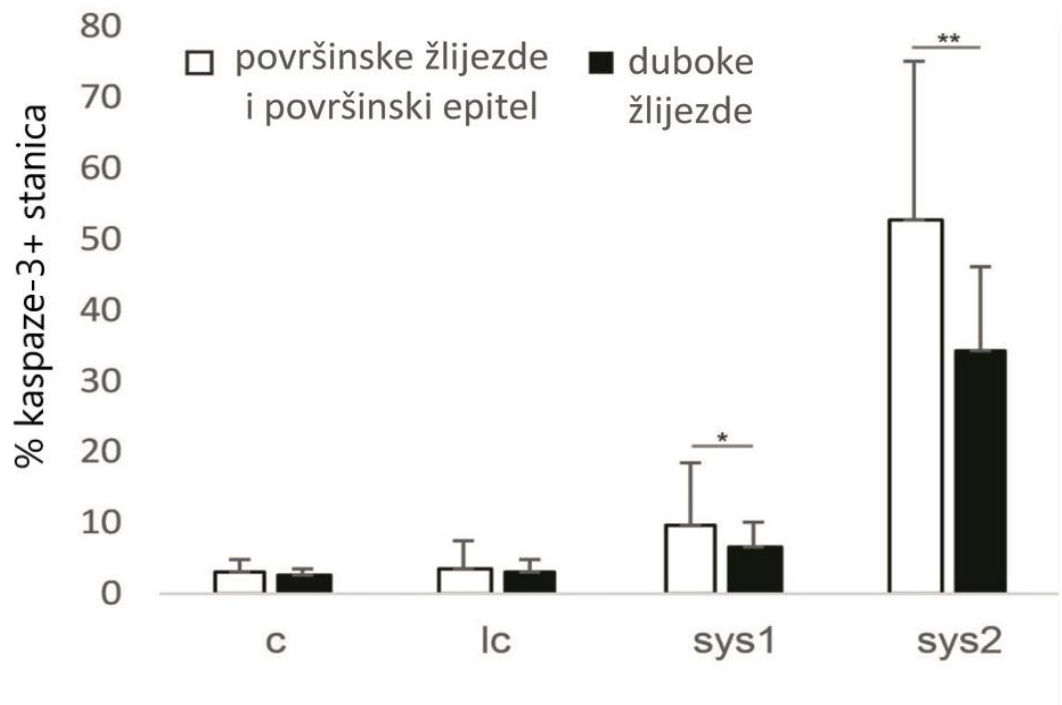
Postotak apoptotskih (kaspaza-3 pozitivnih) stanica analiziran je u epitelnim stanicama pokrovnog epitela, površnim i dubokim žlijezdama i lamini propriji želučane sluznice u kontrolnim uzorcima i u uzorcima bolesnika s ograničenom (lc), umjerenom difuznom (sys1) i teškom difuznom kožnom (sys2) SSc (Slika 11.).

Kontrolni uzorci (c) površnih i dubljih dijelova lamine proprije, pokrovnog epitela i epitela žlijezde sadržavaju nizak broj apoptotskih stanica (1,5-2%).

U želučanoj sluznici bolesnika s ograničenom kožnom SSc (lc) broj apoptotskih stanica porastao je na samo 3% u površnim dijelovima želučane sluznice i na 2% u njenim dubljim dijelovima.

U želučanoj sluznici bolesnika s umjerenom difuznom kožnom SSc (sys1) broj apoptotskih stanica porastao je se na 8% u površnim dijelovima i na 6% u dubljim dijelovima.

U bolesnika s teškom difuznom kožnom SSc (sys2), površinski dijelovi želučane sluznice sadržavaju 50% apoptotskih stanica. Tako velik broj apoptotskih stanica bio je povezan s velikim defektima pokrovnog epitela, koji su, čini se, rezultat opsežne apoptoze cilindričnog obložnog epitela. Dublji dijelovi želučane sluznice sadržavaju 30% apoptotskih stanica, koje su primarno lokalizirane u dubokim žlijezdama (koje pogađaju i glavne i parijetalne stanice).



Slika 11. Postotak kaspaze-3 pozitivnih stanica u površinskim žlijezdama i površinskom epitelu te u dubljim žlijezdama želučane sluznice u kontrolnim uzorcima i različiti oblici sistemske skleroze. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (okomita crta). Značajne razlike označene su s *p < 0,01, **p < 0,001, Kruskall-Wallis. Legende: kontrola (c), ograničena kožna SSc (lc), umjerena difuzna kožna SSc (sys1), teška difuzna kožna SSc (sys2).

6. RASPRAVA

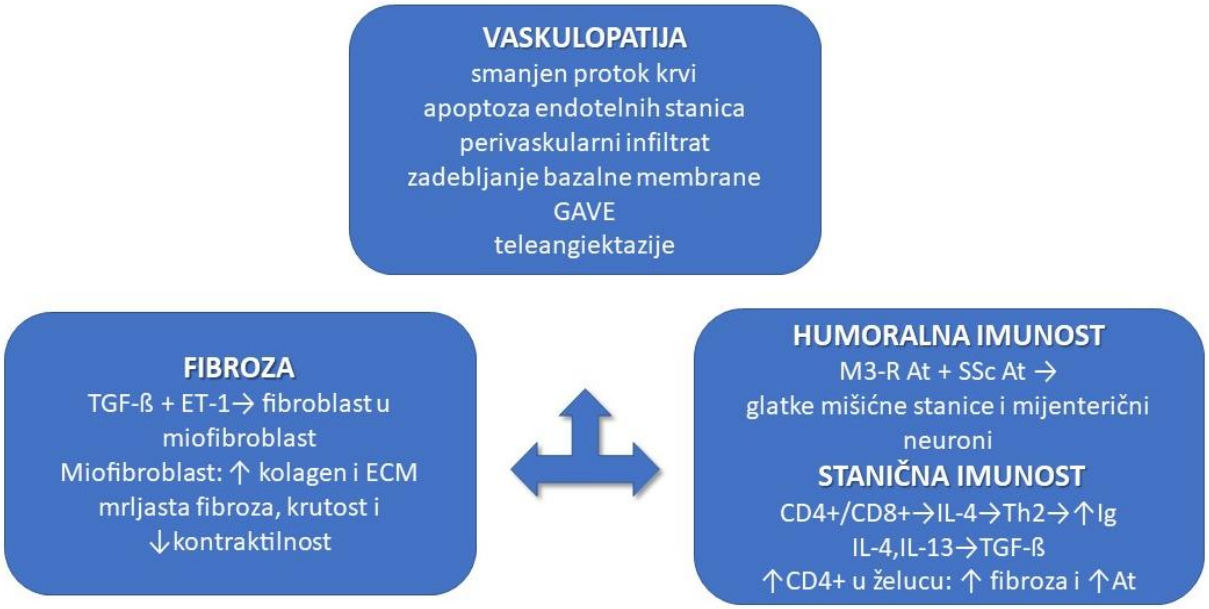
Ovo istraživanje pokazalo je da s napredovanjem sistemske skleroze, neravnoteža u odnosu proliferacije i apoptoze u stanicama epitelnog i vezivnog tkiva, postepeno dovodi do gubitka površinskih i dubokih žlijezda, oštećenja površinskog epitela, nakupljanja kolagena vezivnog tkiva, promjena krvnih žila, kao i smanjenog izražaja sindekana-1 u cijeloj želučanoj sluznici. Želučana bolest uzrokuje značajan pobol u bolesnika sa SSc. Unatoč velikoj učestalosti u SSc, patogeneza zahvaćenosti želuca je slabo poznata vjerojatno zbog činjenice da nije razvijen njen životinjski model, kao i slabe dostupnosti ljudskih uzoraka. Dakle, patogeneza gastrointestinalnih manifestacija u SSc ostaje nepoznata, ali kao i u drugim organskim sustavima karakterizirana je vaskularnim i neuronskim oštećenjima, upalom i fibrozom (123). Iako je jednjak najistraženiji organ, patologija je slična u svim dijelovima probavnog sustava od jednjaka do rektuma (30, 124).

Prethodna istraživanja otkrila su generaliziranu fibrozu koja zahvaća sve slojeve želučane stijenke, izraženo nakupljanje kolagena, prisutnost miofibroblasta i limfocitnih infiltrata kao biljega imunološke aktivacije (105, 118, 125). Endoskopskim ultrazvukom utvrđeno je značajno zadebljanje stijenke gornjeg dijela probavne cijevi u bolesnika sa SSc (126). Pored toga, opisan je i sklerodermijski mišji model fibroze debelog crijeva i potvrđeno je da bi mnoge nepravilnosti u strukturi ili pokretljivosti debelog crijeva mogle biti posljedica atrofije glatkih mišića i disfunkcije fibroblasta povezane s prekomjernom aktivnošću TGF-ß i srodnih fibrogenih putova (127). Taroni i suradnici dokazali su upalni i proliferativni/neupalni izražaj gena ne samo u koži nego i u bioptatima jednjaka bolesnika sa SSc, dokazujući da su sveobuhvatni poremećeni molekularni procesi odgovorni za SSc slični u različitim ciljnim organima (128). Većina manifestacija zahvaćenosti probavnog sustava rezultat su sekundarnog poremećaja peristaltike zbog infiltracije gastrointestinalne stijenke vezivnim tkivom što može uzrokovati po život opasnu malapsorpciju i pothranjenost.

Hipoksija sluznice se opisuje kao mogući prvi vodeći događaj koji dovodi do oštećenja endotela. U malom istraživanju na 3 bolesnika sa SSc, otkrivena je hipoksija sluznice želuca pomoću sonde koja mjeri količinu kisika koji se raspršuje kroz sluznicu (129). Drugo istraživanje potvrdilo je smanjen protok krvi u sluznici želuca i dvanaesnika oboljelih od SSc (130), dok je treće utvrdilo postojanje vaskularne insuficijencije prije pojave atrofije glatkih mišića (131). Vaskularna oštećenja su obilježena zadebljanjem endotela, proliferacijom i fibrozom adventicije.

Mnogi simptomi koji se vide u ranom zahvaćanju probavnog sustava mogu se objasniti i neuralnom disfunkcijom. Oštećenje neurona može nastati sekundarno uslijed ishemije uzrokovane vaskularnim oštećenjem vasa nervorum, kompresije živaca vezivnim tkivom ili drugim nepoznatim procesima (132). Još uvijek je nepoznato je li primarni udarac na glatke mišiće probavnog sustava oštećenje neurona ili vaskularna insuficijencija. Elektronskom mikroskopijom dokazala se citoplazmatska vakuolizacija neurona, uz raspadanje i atrofiju glatkih mišićnih stanica bez povećanja količine kolagena (133). Ovi podaci su u skladu s teorijom da se neuronska lezija događa prije fibroze, ali se ne može sa sigurnošću odrediti da li ranije dolazi do oštećenje krvnih žila ili živaca.

Uloga različitih gastrointestinalnih regulatornih peptida može pružiti dodatne informacije o uzrocima poremećaja motiliteta probavnog sustava u SSc i eventualno ponuditi terapijske opcije, ali su potrebna daljnja ispitivanja sudjelovanja neurotransmitera u neurogenoj teoriji ove bolesti (134).



GAVE-želučana antralna vaskularna ektazija, TGF-β-transformirajući čimbenik rasta-β, ET-endotelin, ECM- izvanstanična tvar, M3-R muskarinski 3 receptor, At- protutijelo, SSc- sistemska skleroza, CD-biljeg limfocita od engl. clusters of differentiation, IL-interleukin, Th-pomagački T limfocit, Ig-imunoglobulin

Slika 12. Patofiziologija zahvaćanja probavnog sustava u SSc (30).

U početnoj fazi zahvaćenosti probavnog sustava u SSc, kada se događa neurološka disfunkcija uporaba prokinetika je još uvijek uspješna. Kasnije su prokinetici manje pouzdani, a u završnoj fazi kada je atrofija glatkih mišića toliko jaka prokinetici nemaju učinka (45). Iako nalazi biopsije probavnog sustava u ranoj fazi bolesti mogu biti normalni, u konačnici dolazi do

atrofije glatkih mišića s raspadanjem i fibrozom duž čitavog probavnog sustava. Općenito, proces je progresivan i uključuje prvo unutarnji kružni mišićni sloj crijeva, a zatim i vanjski uzdužni sloj dok uslijed submukozne fibroze u jednjaku može doći do stvaranja ulceracija i striktura (130).

Za razliku od plućne fibroze i plućne hipertenzije, prevalencija zahvaćenosti probavnog sustava se ne razlikuje između lcSSc i dcSSc i procjenjuje se na oko 80% (135). Također ne postoji niti razlika u prevalenciji zahvaćenosti probavnog sustava između lcSSc i SSc bez zahvaćanja kože (136). Gastropareza ili poremećaj motiliteta želuca se javlja u 50% bolesnika sa SSc (137). U patofiziologiji gastropareze u SSc sudjeluje više čimbenika i pretpostavlja se da se javlja postepeno, započinjući oštećenjem krvnih žila, praćeno neurogenim oštećenjem i na kraju mišićnom disfunkcijom (138). Simptomi gastropareze uključuju ranu sitost, nadutost, mučninu i povraćanje (139). GERB pogoršava gastroparezu i stoga bi kontrola GERB-a trebala biti intenzivirana za bolesnike s gastroparezom (29, 138). Krvarenje iz probavnog sustava u bolesnika sa SSc se prema jednom istraživanju javlja s učestalošću od 15% i povezano je s većom smrtnošću (140). Telangiektazije, pronađene od usne šupljine do debelog crijeva, najčešći su uzrok gubitka krvi iz probavnog sustava u bolesnika sa SSc. Krvarenja iz proširenih krvnih žila antruma želuca (GAVE) se mogu ispoljavati kao kronična anemija uslijed nedostatka željeza ili kao akutna krvarenja (140, 141). Više od 90% bolesnika s GAVE imaju aklorhidriju s ili bez perniciozne anemije, a oko 13% ima dijagnozu SSc kojoj GAVE može slijediti, ali i prethoditi (142). Ne bi se smjeli previdjeti i ostali česti uzroci krvarenja iz probavnog sustava u SSc poput peptičkog vrijeda, erozivnog gastritisa, angiodisplazije debelog crijeva i hemoroida.

Nekoliko istraživanja istaknulo je činjenicu da su se u bolesnika sa SSc utvrdila oštećenja u gornjem dijelu probavnog sustava čak i u odsustvu simptoma i u ranoj fazi bolesti. Petcu i sur. su utvrdili gastroezofagealne simptome u 72,1% slučajeva i u ranoj i u kasnoj fazi bolesti. Endoskopski su utvrđene promjene u jednjaku i želucu kod velikog dijela asimptomatskih bolesnika (72,7%). Fokus istraživanja je bio na prisutnosti znakova gastritisa (upalne plazma stanice, limfociti, neutrofilni infiltrati i intestinalna metaplazija) u bolesnika sa SSc, što je endoskopski utvrđeno, a histopatološki potvrđeno u oko 60% bolesnika. Na temelju ovih rezultata autori su zaključili da bolesnici sa SSc često imaju zahvaćanje jednjaka i želuca tijekom rane faze bolesti i u odsutnosti simptoma (143).

Također je i u retrospektivnom istraživanju Thonhofer i suradnika, više od 90% bolesnika s ranom SSc bez simptoma zahvaćenosti probavnog sustava imalo endoskopske znakove gastritisa dok je u oko 40% dokazano prisustvo bakterije *Helicobacter pylori* (144).

Helicobacter pylori se često povezuje s raznim autoimunim bolestima, ali je njena uloga u njihovom izazivanju kontroverzna (145). Neki podaci sugeriraju da je *Helicobacter pylori* infekcija u korelaciji s aktivnošću SSc i zahvaćenošću kože u SSc (146). Također je više autora povezalo disbiozu u crijevnoj mikroflori oboljelih od SSc s kliničkim dokazima gastrointestinalne bolesti (147).

Nishimagi i sur. su dokazali postojanje podskupine SSc pacijenata sa ozbiljnim zahvaćanjem probavnog sustava u ranoj fazi dcSSc. Također su utvrdili da je zahvaćanje probavnog sustava češće u dcSSc s brzoprogresivnim oblikom kožnog zahvaćanja i uz češće prisustvo autoprotutijela na staničnu jezgru (148). Druga grupa istraživača je izvijestila o mogućoj povezanosti između anticentromernih antitijela (149) i antitijela na M3-muskarinski acetilkolinski receptor i poremećaja motiliteta probavnog sustava (150).

Budući da još nisu identificirani biomarkeri napredovanja bolesti kao niti lijekovi za modificiranje bolesti, izvedena je histološka analiza želučanih bioptata bolesnika sa SSc kako bi se identificirali biomarkeri želučane disfunkcije i proširilo razumijevanje patogeneze zahvaćanja želuca u SSc.

U ovom istraživanju, za razliku od kontrola, u uzorcima oboljelih od SSc pokazana je blaga ili jaka upala unutar površinskih i dubokih dijelova želučane sluznice i submukoze. Ti su nalazi popraćeni povećanom proliferacijom stanica, a u nekim slučajevima i prisutnošću proširenih submukoznih krvnih žila (megakapilara), karakteriziranih zadebljanjem stijenki.

Iako se proliferacija miofibroblasta vezivnog tkiva, kao i stanica glatkih mišića u stijenkama krvnih žila pojavljuje samo povremeno, u uzorcima bolesnika s ograničenom, a posebno s dcSSc, brojne su proliferacijske stanice primarno lokalizirane u žljezdanim stanicama i stanicama vezivnog tkiva. Međutim, u teškoj dcSSc, proliferacija se smanjuje, vjerojatno zbog iscrpljenosti stanica žlijezda i njihove povećane apoptoze. Prethodne studije o staničnoj proliferaciji pokazale su oprečne rezultate. Dok su jedne pokazale veću proliferaciju, druge nisu našle razlike u proliferativnom potencijalu stanica u SSc (61, 88-90).

Mnoge su grupe istraživača postulirale da lezije u SSc proizlaze iz klonalne ekspanzije fibrotičke subpopulacije fibroblasta koje imaju veću sposobnost proliferacije ili imaju veću otpornost na apoptozu (62, 151). Za razliku od ovog istraživanja, Tsujino i suradnici dokazali su na mišjem modelu SSc vaskularno plućno remodeliranje kao rezultat proliferacije miofibroblasta u stijenkama krvnih žila (152). Kumanovic i ostali dokazali su da je povećana proliferacija alveolarnih makrofaga u bronhoalveolarnoj tekućini bolesnika sa SSc mogući predskazatelj alveolitisa (153). U ovom ispitivanju kolokalizacijom α-SMA i Ki-67 nije se

uspjela utvrditi proliferacija miofibroblasta što potvrđuje teoriju da do pojačanog stvaranja ECM ne dolazi zbog proliferacije miofibroblasta nego zbog njihove povećane aktivnosti. Ovi imunohistološki nalazi mogli bi ukazivati da je povećana proliferacija kompenzacijski proces u želučanom tkivu bolesnika sa SSc, ponajprije utjecajem na stanice žlijezda i fibroblaste vezivnog tkiva, koji nakon početnog izbijanja proliferacije podliježu diferencijaciji u miofibroblaste. Također se uspjelo otkriti da promjene u želučanoj sluznici bolesnika sa SSc imaju proliferativnu (aktivnu) i neproliferativnu fazu, što je već opisano u koži i putem videokapilaroskopije (154).

U ovom istraživanju se u želučanoj sluznici oboljelih od ograničene SSc, u usporedbi s kontrolnim uzorcima, dokazan je povećan broj apoptotskih stanica u epitelu, površinskim žlijezdama i lamini propriji, uz znakove pojačane hijalinizacije. U uzorcima bolesnika s dcSSc utvrđena je apoptoza u dubokim žlijezdama, u područjima izražene upale u lamini propriji, kao i u stijenkama krvnih žila. Opisana apoptoza epitela sluznice može biti povezana s oštećenjima na površini i nedostatkom zaštitnog sloja sluzi, što može dovesti do problema s apsorpcijom. Naime, integritet želučane sluznice održavaju dva obrambena mehanizma: kontinuitet sloja površinskog epitela i sluz-bikarbonat-fosfolipidna „barijera“ koja se izlučuje iz površinskih epitelnih stanica. Uz to, mikrocirkulacija sluznice osim što je nužna za obskrbu kisikom i hranjivim tvarima te uklanjanje toksičnih tvari također je nužna i za održavanje integriteta sluznice (155). Budući da duboke žlijezde sadrže stanice koje proizvode klorovodičnu kiselinu i pepsinogen, njihovo oštećenje uzrokovano opsežnom apoptozom i nakupljanjem vezivnog tkiva može biti povezano sa smanjenom kiselosti i nepravilnom proizvodnjom enzima. Činjenica da zahvaćanje probavnog sustava i plućna fibroza često istovremeno postoje u oboljelih od SSc i da ti bolesnici imaju veću učestalost refluksne bolesti, upućuje na to da bi zahvaćenost probavnog sustava mogla doprinijeti razvoju plućne fibroze (156).

U želučanoj sluznici oboljelih od SSc uspjela se dokazati povećana izražajnost CTGF i to dominantno u površinskim i dubokim žlijezdama, dok je u kontrolnim uzorcima CTGF pokazao povećanu izražajnost u stanicama lamine proprije bez zahvaćanja žljezdanih stanica. Navedene promjene tumačimo pojačanim nakupljanjem CTGF u upalnim stanicama lamine proprije uslijed gastritisa. Za uzorke bolesnika sa SSc je uz pojačano nakupljanje CTGF u stanicama lamine proprije karakteristično nakupljanje CTGF i u stanicama površinskih i dubokih žlijezda, a najintenzivnije nakupljanje je utvrđeno u teškoj dcSSc koja je obilježena i najintenzivnijim nakupljanjem vezivnog tkiva. Osim toga, značajno povećanje sadržaja vezivnog tkiva moglo bi biti povezano sa simptomima koji su posljedica želučanog dismotiliteta kao što su žgaravica, mučnina, povraćanje, nadutost, bol, regurgitacija, retrosternalna bol, osjećaj punoće epigastrija

i rana sitost što pridonosi značajnom gubitku kilograma i funkcionalnosti probavnog sustava (157).

Osim što je otkrivena prostorna raspodjela apoptotskih i proliferacijskih stanica u želučanoj sluznici kontrolne skupine i bolesnika sa SSc, ovim je istraživanjem utvrđen i smanjen izražaj sindekana-1 u bolesnika sa SSc u usporedbi s kontrolnom skupinom. Čini se da je sindekan-1 uključen ne samo u kontrolu procesa proliferacije i apoptoze, već i u migraciju, angiogenezu, remodeliranje izvanstanične tvari, regrutiranje upalnih stanica i adheziju mikroorganizama (158). Unatoč važnosti u održavanju i obnavljanju morfologije i integriteta epitelnog sloja, uključenost sindekana-1 u patogenezu SSc izazvalo je tek skromnu pozornost (92). Dakle, različiti oblici SSc, povezani s gubitkom epitela želučane sluznice, karakterizirani su različitim stupnjevima izražaja sindekana-1, u rasponu od blagog slabljenja (stanjivanja) do ozbiljnog gubitka integriteta epitela u različitim oblicima SSc. Opisane promjene u izražaju sindekana-1 koreliraju s gubitkom njegove uloge u kontroli proliferacije i apoptotskih procesa unutar želučanog tkiva.

U ovom istraživanju su u uzorcima želučane sluznice bolesnika sa SSc pronađene apoptotičke stanice u svim slojevima stijenke submukoznih krvnih žila, uključujući endotel, srednji i vanjski sloj. U prethodnim studijama apoptoza endotelnih stanica široko je istraživana u koži i serumu životinjskih modela i bolesnika sa SSc, ali ne i u visceralnim organima (70, 71, 159-162). Sgonc i suradnici pokazali su da apoptoza pilećih endotelnih stanica nije lokalizirana samo na koži, već je prisutna i u drugim pogođenim organima poput jednjaka, pluća i bubrega. Smatra se da apoptoza endotelnih stanica prethodi pojavi perivaskularnih upalnih infiltrata i taloženju kolagena (160). Čini se da je endotelna disfunkcija/ozljeda jedan od ključnih mehanizama u patogenezi SSc. Kao odgovor na infekcije ili štetne podražaje, endotel se može aktivirati i promijeniti funkciju, što dovodi do povećane endotelne propusnosti i stvaranja edema. U edematoznoj fazi skleroderme dominira upala, a značajan broj imunoloških stanica okružuje mikrožilje, uzrokujući oslobađanje TGF-β i drugih citokina i čimbenika rasta, uključujući VEGF (163). Tijekom daljnjeg napredovanja SSc, smanjeni kapilarni protok krvi uzrokuje hipoksiju tkiva, koju dodatno povećava nakupljanje međustanične tvari i fibroza. Konačno, hipoksija tkiva potiče mehanizme koji dovode do aktivacije pro-apoptotskih kaspaza, dok smanjuje anti-apoptotske proteine (164). Iz tih činjenica se može zaključiti da je apoptoza početni i krajnji proces u patogenezi SSc.

U ovom istraživanju također je dokazana izražena fibroza, proširene kapilare i zadebljanje stijenki submukoznih žila u želučanoj sluznici bolesnika sa SSc. Ovdje prikazani obrasci proliferacije i apoptoze nalikuju onima prijavljenim na koži bolesnika sa SSc, gdje je

proliferacija smanjena u kožnim mikrovaskularnom endotelnom stanicama, dok je razina aktivnih kaspaza-3 značajno viša (119). To podrazumijeva sličnu patogenezu procesa SSc u različitim organima.

Ovo istraživanje je pokazalo da je u umjerenoj dcSSc izražen „aktivni“ oblik bolesti povezan s brojnim proliferacijskim stanicama, dok je teška dcSSc obilježena taloženjem kolagena, djelomičnim gubitkom epitelnog sloja, izraženom apoptozom površinskih i dubokih žlijezda i niskom proliferacijom. Stoga se smatra da su apoptoza i proliferacija praćena upalom važne histopatološke karakteristike želučane sluznice u SSc, koje dovode do atrofije i gubitka funkcije.

Zahvaćenost probavnog sustava u SSc je heterogena u svojoj kliničkoj prezentaciji, što predstavlja izazov u dijagnosticiranju i liječenju. Može biti ozbiljno i po život opasno stanje, a morbiditet i smrtnost su značajni. Na preživljavanje u vrlo ranoj SSc utječe ozbiljnost zahvaćanja probavnog sustava. Posljednjih godina nekoliko je ispitivanja procjenjivalo čimbenike rizika i kliničke značajke povezane sa specifičnim gastrointestinalnim komplikacijama u SSc. Ispitivanja usmjerena na novootkrivene čimbenike rizika, novi pristupi dijagnozi i procjeni aktivnosti bolesti, preživljavanja i kvalitete života pokazuju napredak u razumijevanju ovog izazovnog područja. Pri izradi plana praćenja za ovu populaciju bolesnika treba pažljivo razmotriti i druge važne gastrointestinalne podskupine, uključujući bolesnike s bolestima jednjaka i intersticijskom bolesti pluća. Objektivno ispitivanje probavnog sustava može pomoći u identificiranju specifičnih sklerodermijskih gastrointestinalnih podskupina i pružiti dijagnostičku preciznost za usmjeravanje ciljanih metoda liječenja. Podatak o postojanju zahvaćenosti jednjaka i želuca i u asimptomatskih bolesnika i u ranoj fazi bolesti te podjednako i u lcSSc i u dcSSc upućuje na potrebu redovitih endoskopskih pregleda gornjeg dijela probavnog susutava oboljelih od SSc.

Do danas je liječenje manifestacija probavnog sustava u SSc ostalo empirijsko i vođeno simptomima. Iako liječenje specifično za bolest nije dostupno, suportivna terapija koja se temelji na patofiziologiji bolesti može produljiti preživljavanje te je stoga potrebna uska suradnja reumatologa i gastroenterologa.

7. ZAKLJUČCI

Primjenom imunohistokemijskih metoda te metodom dvostruke imunofluorescencije na histološkim uzorcima bioptata želučane sluznice oboljelih od sistemske skleroze, kao i u kontrolnim uzorcima, istraživani su broj i raspodjela stanica primjenom protutijela (biljega) za apoptozu (kaspaza-3), proliferaciju (Ki-67), epitelni biljeg sindekan-1, protutijelo glatkih mišićnih stanica (α-SMA) i protutijelo čimbenika rasta vezivnog tkiva (CTGF).
Temeljem analize i usporedbe obojenih histoloških rezova navedenih skupina doneseni su sljedeći zaključci:

1. Želučana sluznica oboljelih od SSc u usporedbi s kontrolnim uzorcima pokazuje povećan broj apoptotskih stanica u epitelu, površinskim žlijezdama i lamini propriji, uz dodatne znakove hijalinizacije. U uzorcima oboljelih od difuznog oblika skleroderme, utvrđena je apoptoza u dubokim žlijezdama, u područjima izražene upale u lamini propriji kao i u stijenkama krvnih žila.
2. U uzorcima oboljelih od SSc uočava se blaga ili jaka upala unutar površinskih i dubokih dijelova želučane sluznice i submukoze. Ti su nalazi popraćeni povećanom proliferacijom stanica, a u nekim slučajevima i prisutnošću proširenih submukoznih krvnih žila (megakapilara), karakteriziranih zadebljanjem stijenki.
3. Iako se proliferacija miofibroblasta vezivnog tkiva, kao i stanica glatkih mišića u stijenkama krvnih žila pojavljuje samo povremeno, u uzorcima bolesnika s ograničenom, a posebno s umjernom difuznom kožnom SSc, brojne su proliferacijske stanice primarno lokalizirane u žljezdanim stanicama i stanicama vezivnog tkiva. Međutim, u uzorcima bolesnika s teškom difuznom kožnom SSc proliferacija se smanjuje.
4. Uzorci bolesnika sa SSc pokazuju pojačano nakupljanje miofibroblasta u odnosu na kontrolne uzorke, a pogotovo je to izraženo u dubljim slojevima lamine proprije u uzorcima bolesnika s umjerenom dcSSc.
5. Uzorci bolesnika s različitim oblicima SSc (povezani s gubitkom epitela želučane sluznice) karakterizirani su različitim stupnjevima izražaja sindekana-1, u rasponu od blagog slabljenja (stanjivanja) do ozbiljnog gubitka integriteta epitela u uzorcima bolesnika s težom SSc.

6. Za uzorke bolesnika sa SSc je uz pojačano nakupljanje CTGF u stanicama lamine proprije karakteristično nakupljanje CTGF i u stanicama površinskih i dubokih žlijezda, a najintenzivnije u uzorcima bolesnika s teškom dcSSc koji je obilježen nakupljanjem vezivnog tkiva.
7. S napretkom sistemske skleroze, neravnoteža u odnosu proliferacije i apoptoze u stanicama epitelnog i vezivnog tkiva, postepeno dovodi do gubitka površinskih i dubokih žlijezda, oštećenja površinskog epitela, nakupljanja kolagena vezivnog tkiva, promjena krvnih žila, kao i smanjenog izražaja sindekana-1 u cijeloj želučanoj sluznici.

8. SAŽETAK

U istraživanju „Izražaj apoptotskih i proliferacijskih čimbenika u želučanoj sluznici oboljelih od sistemske skleroze“ histološki su analizirane razlike u proliferaciji, apoptozi i profibrotičkim čimbenicima u uzorcima želučane sluznice oboljelih od sistemske skleroze (SSc) i kontrolne skupine. U istraživanju je sudjelovao 15 bolesnika sa SSc i 5 kontrolnih ispitanika bez SSc. Bolesnici su sistematizirani s obzirom na oblik i težinu kliničke slike sistemske skleroze. Pet bolesnika je klasificirano u skupinu s ograničenom kožnom SSc (lcSSc) i blagom bolešću, pet s umjerenom difuznom i pet s teškom difuznom kožnom SSc (dcSSc).

Uzorci tkiva su imunohistokemijski obojeni protutijelom Ki-67 (proliferacija), kaspazom-3 (apoptoza), sindekanom-1 (epitelni biljeg), CTGF (profibrotički biljeg) i α-SMA (biljeg miofibroblasta). Istovremena prisutnost (kolokalizacija) Ki-67 pozitivnih stanica s biljegom za miofibroblaste (α-SMA) određena je upotrebom dvostruke imunofluorescentne metode. Postotak reaktivnih stanica analiziran je primjenom Kruskal-Wallis testa i Dunn-ovog post hoc testa, a $P<0.05$ se smatrao statistički značajnim.

Analiza je otkrila da je postotak proliferirajućih (Ki-67 pozitivnih) stanica bio je najveći u uzorcima bolesnika s umjerenom dcSSc (3% u površinskim i 4,6% u dubljim djelovima želučane sluznice, koji je pao na 1% u uzorcima bolesnika s teškom dcSSc). Postotak stanica pozitivnih na α-aktin glatkih mišića (α-SMA) iznosio je 5% u uzorcima kontrola, 9% u površinskim djelovima želučane sluznice bolesnika s lcSSc, dok je u dubljem sloju porastao na 19% u uzorcima bolesnika s umjerenom i 14% s teškom dcSSc, što ukazuje na povećanu populaciju i aktivnost miofibroblasta. Pozitivne apoptotske stanice na kaspazu-3 iznosile su 1,5-2% u kontrolnim uzorcima, 8% u površinskim i 6% u dubljim dijelovima želučane sluznice bolesnika s umjerenom dcSSc. U uzorcima bolesnika s teškom dcSSc, apoptoza je zahvatila 50% površinskih epitelnih i žljezdanih stanica i 30% dubljih žlijezda, a korelirala je s povećanom ekspresijom CTGF i fibrozom te smanjenom ekspresijom sindekana-1.

Ovi podaci pokazuju da je umjerena dcSSc proliferacijski najaktivniji oblik SSc. Tešku dcSSc karakteriziraju taloženje kolagena, defekti površinskog epitela, opsežna apoptoza i snižena proliferacija, atrofija i gubitak funkcije.

9. SUMMARY

In the study "Expression of apoptotic and proliferative factors in the gastric mucosa of patients with systemic sclerosis" differences in proliferation, apoptosis and profibrotic factors were histologically analyzed in samples of gastric mucosa in patients with systemic sclerosis (SSc) and control group. The study included 15 patients with SSc and 5 control subjects without SSc. Patients were systematized with respect to the type and severity of systemic sclerosis. Five patients were classified into the group with limited cutaneous SSc (lcSSc) and mild disease, five with moderate diffuse, and five with severe diffuse cutaneous SSc (dcSSc).

Tissue samples were immunohistochemically stained with Ki-67 antibody (proliferation), caspase-3 (apoptosis), syndecan-1 (epithelial marker), CTGF (profibrotic marker), and α-SMA (myofibroblast marker). The simultaneous presence (colocalization) of Ki-67 positive cells with α-SMA was determined using double immunofluorescence method. The percentage of reactive cells was analyzed by a Kruskal-Wallis test and the Dunn post hoc test. $P<0.05$ was considered statistically significant.

The analysis revealed that the percentage of proliferating (Ki-67 positive) cells was highest in samples of patients with moderate dcSSc (3% in superficial and 4.6% in deeper parts of the gastric mucosa, which dropped to 1% in samples of patients with severe dcSSc). The percentage of α-smooth muscle actin (α-SMA) positive cells was 5% in control samples, 9% in superficial gastric mucosa of patients with lcSSc, while in the deeper layer it increased to 19% in samples of patients with moderate and 14% with severe dcSSc, indicating increased myofibroblast population and activity. Apoptotic cells positive on caspase-3 account for 1.5–2% in control samples, 8% in superficial, and 6% in deeper parts of the gastric mucosa of patients with moderate dcSSc. In samples of patients with severe dcSSc, apoptosis involved 50% of superficial epithelial and glandular cells and 30% of deeper glands, and correlated with increased CTGF expression and fibrosis, and decreased syndecan-1 expression.

This data show that moderate dcSSc is the most proliferatively active form of SSc. Severe dcSSc is characterized by collagen deposition, surface epithelial defects, extensive apoptosis and decreased proliferation, atrophy and loss of function.

10. LITERATURA

1. Allanore Y, Simms R, Distler O, Trojanowska M, Pope J, Denton CP, et al. Systemic sclerosis. Nat Rev Dis Primers. 2015;1:15002.
2. Chifflot H, Fautrel B, Sordet C, Chatelus E, Sibilia J. Incidence and prevalence of systemic sclerosis: a systematic literature review. Seminars in arthritis and rheumatism. 2008;37(4):223-35.
3. Ranque B, Mouthon L. Geoepidemiology of systemic sclerosis. Autoimmun Rev. 2010;9(5):A311-8.
4. Radic M, Martinovic Kaliterna D, Fabijanic D, Radic J. Prevalence of systemic sclerosis in Split-Dalmatia county in Southern Croatia. Clinical rheumatology. 2010;29(4):419-21.
5. Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. J Clin Invest. 2007;117(3):557-67.
6. Wucherpfennig KW. Mechanisms for the induction of autoimmunity by infectious agents. J Clin Invest. 2001;108(8):1097-104.
7. Scaletti C, Vultaggio A, Maggi E, Romagnani S, Piccinni MP. Microchimerism and systemic sclerosis. Int Arch Allergy Immunol. 2001;125(3):196-202.
8. Mayes MD, Bossini-Castillo L, Gorlova O, Martin JE, Zhou X, Chen WV, et al. Immunochip analysis identifies multiple susceptibility loci for systemic sclerosis. American journal of human genetics. 2014;94(1):47-61.
9. Altorok N, Tsou PS, Coit P, Khanna D, Sawalha AH. Genome-wide DNA methylation analysis in dermal fibroblasts from patients with diffuse and limited systemic sclerosis reveals common and subset-specific DNA methylation aberrancies. Ann Rheum Dis. 2015;74(8):1612-20.
10. Stern EP, Denton CP. The Pathogenesis of Systemic Sclerosis. Rheumatic diseases clinics of North America. 2015;41(3):367-82.
11. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. J Clin Invest. 2009;119(6):1420-8.
12. Gyftaki-Venieri DA, Abraham DJ, Ponticos M. Insights into myofibroblasts and their activation in scleroderma: opportunities for therapy? Curr Opin Rheumatol. 2018;30(6):581-7.
13. Abraham D, Distler O. How does endothelial cell injury start? The role of endothelin in systemic sclerosis. Arthritis Res Ther. 2007;9 Suppl 2:S2.

14. Korman B. Evolving insights into the cellular and molecular pathogenesis of fibrosis in systemic sclerosis. Translational research: the journal of laboratory and clinical medicine. 2019;209:77-89.
15. Abraham DJ, Krieg T, Distler J, Distler O. Overview of pathogenesis of systemic sclerosis. Rheumatology (Oxford). 2009;48 Suppl 3:iii3-7.
16. Choi MY, Fritzler MJ. Progress in understanding the diagnostic and pathogenic role of autoantibodies associated with systemic sclerosis. Curr Opin Rheumatol. 2016;28(6):586-94.
17. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Arthritis Rheum. 1980;23(5):581-90.
18. van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A, et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American College of Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative. Arthritis Rheum. 2013;65(11):2737-47.
19. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA, Jr., et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. J Rheumatol. 1988;15(2):202-5.
20. Cepeda EJ, Reveille JD. Autoantibodies in systemic sclerosis and fibrosing syndromes: clinical indications and relevance. Curr Opin Rheumatol. 2004;16(6):723-32.
21. Denton CP, Khanna D. Systemic sclerosis. Lancet. 2017;390(10103):1685-99.
22. Hughes M, Herrick AL. Systemic sclerosis. British journal of hospital medicine. 2019;80(9):530-6.
23. Krieg T, Takehara K. Skin disease: a cardinal feature of systemic sclerosis. Rheumatology (Oxford). 2009;48 Suppl 3:iii14-8.
24. Velayos EE, Masi AT, Stevens MB, Shulman LE. The 'CREST' syndrome. Comparison with systemic sclerosis (scleroderma). Archives of internal medicine. 1979;139(11):1240-4.
25. Cutolo M, Smith V, Furst DE, Khanna D, Herrick AL. Points to consider-Raynaud's phenomenon in systemic sclerosis. Rheumatology (Oxford). 2017;56(suppl_5):v45-v8.
26. Mostmans Y, Cutolo M, Giddelo C, Decuman S, Melsens K, Declercq H, et al. The role of endothelial cells in the vasculopathy of systemic sclerosis: A systematic review. Autoimmun Rev. 2017;16(8):774-86.
27. Cutolo M, Grassi W, Matucci Cerinic M. Raynaud's phenomenon and the role of capillaroscopy. Arthritis Rheum. 2003;48(11):3023-30.
28. Shreiner AB, Murray C, Denton C, Khanna D. Gastrointestinal Manifestations of Systemic Sclerosis. J Scleroderma Relat Disord. 2016;1(3):247-56.

29. Kumar S, Singh J, Rattan S, DiMarino AJ, Cohen S, Jimenez SA. Review article: pathogenesis and clinical manifestations of gastrointestinal involvement in systemic sclerosis. Aliment Pharmacol Ther. 2017;45(7):883-98.
30. McFarlane IM, Bhamra MS, Kreps A, Iqbal S, Al-Ani F, Saladini-Aponte C, et al. Gastrointestinal Manifestations of Systemic Sclerosis. Rheumatology. 2018;8(1).
31. Forbes A, Marie I. Gastrointestinal complications: the most frequent internal complications of systemic sclerosis. Rheumatology (Oxford). 2009;48 Suppl 3:iii36-9.
32. Cottin V, Brown KK. Interstitial lung disease associated with systemic sclerosis (SSc-ILD). Respiratory research. 2019;20(1):13.
33. Khanna D, Tashkin DP, Denton CP, Renzoni EA, Desai SR, Varga J. Etiology, Risk Factors, and Biomarkers in Systemic Sclerosis with Interstitial Lung Disease. American journal of respiratory and critical care medicine. 2020;201(6):650-60.
34. Launay D, Sobanski V, Hachulla E, Humbert M. Pulmonary hypertension in systemic sclerosis: different phenotypes. European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society. 2017;26(145).
35. Chung L, Domsic RT, Lingala B, Alkassab F, Bolster M, Csuka ME, et al. Survival and predictors of mortality in systemic sclerosis-associated pulmonary arterial hypertension: outcomes from the pulmonary hypertension assessment and recognition of outcomes in scleroderma registry. Arthritis Care Res (Hoboken). 2014;66(3):489-95.
36. Allanore Y, Meune C. Primary myocardial involvement in systemic sclerosis: evidence for a microvascular origin. Clin Exp Rheumatol. 2010;28(5 Suppl 62):S48-53.
37. Chu SY, Chen YJ, Liu CJ, Tseng WC, Lin MW, Hwang CY, et al. Increased risk of acute myocardial infarction in systemic sclerosis: a nationwide population-based study. The American journal of medicine. 2013;126(11):982-8.
38. Lee S, Lee S, Sharma K. The pathogenesis of fibrosis and renal disease in scleroderma: recent insights from glomerulosclerosis. Curr Rheumatol Rep. 2004;6(2):141-8.
39. Woodworth TG, Suliman YA, Li W, Furst DE, Clements P. Scleroderma renal crisis and renal involvement in systemic sclerosis. Nature reviews Nephrology. 2018;14(2):137.
40. Steen VD, Costantino JP, Shapiro AP, Medsger TA, Jr. Outcome of renal crisis in systemic sclerosis: relation to availability of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors. Annals of internal medicine. 1990;113(5):352-7.
41. Sandler RD, Matucci-Cerinic M, Hughes M. Musculoskeletal hand involvement in systemic sclerosis. Seminars in arthritis and rheumatism. 2020;50(2):329-34.

42. Dore A, Lucas M, Ivanco D, Medsger TA, Jr., Domsic RT. Significance of palpable tendon friction rubs in early diffuse cutaneous systemic sclerosis. Arthritis Care Res (Hoboken). 2013;65(8):1385-9.

43. Olsen NJ, King LE, Jr., Park JH. Muscle abnormalities in scleroderma. Rheumatic diseases clinics of North America. 1996;22(4):783-96.

44. Gordon SM, Stitt RS, Nee R, Bailey WT, Little DJ, Knight KR, et al. Risk Factors for Future Scleroderma Renal Crisis at Systemic Sclerosis Diagnosis. J Rheumatol. 2019;46(1):85-92.

45. Clements PJ, Becvar R, Drosos AA, Ghattas L, Gabrielli A. Assessment of gastrointestinal involvement. Clin Exp Rheumatol. 2003;21(3 Suppl 29):S15-8.

46. Kowal-Bielecka O, Landewe R, Avouac J, Chwiesko S, Miniati I, Czirjak L, et al. EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis: a report from the EULAR Scleroderma Trials and Research group (EUSTAR). Ann Rheum Dis. 2009;68(5):620-8.

47. Kowal-Bielecka O, Fransen J, Avouac J, Becker M, Kulak A, Allanore Y, et al. Update of EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis. Ann Rheum Dis. 2017;76(8):1327-39.

48. Distler O, Highland KB, Gahlemann M, Azuma A, Fischer A, Mayes MD, et al. Nintedanib for Systemic Sclerosis-Associated Interstitial Lung Disease. The New England journal of medicine. 2019;380(26):2518-28.

49. Seibold JR, Maher TM, Highland KB, Assassi S, Azuma A, Hummers LK, et al. Safety and tolerability of nintedanib in patients with systemic sclerosis-associated interstitial lung disease: data from the SENSCIS trial. Ann Rheum Dis. 2020.

50. Ioannidis JP, Vlachoyiannopoulos PG, Haidich AB, Medsger TA, Jr., Lucas M, Michet CJ, et al. Mortality in systemic sclerosis: an international meta-analysis of individual patient data. The American journal of medicine. 2005;118(1):2-10.

51. Poudel DR, Derk CT. Mortality and survival in systemic sclerosis: a review of recent literature. Curr Opin Rheumatol. 2018;30(6):588-93.

52. Bergamasco A, Hartmann N, Wallace L, Verpillat P. Epidemiology of systemic sclerosis and systemic sclerosis-associated interstitial lung disease. Clin Epidemiol. 2019;11:257-73.

53. Green DR, Llambi F. Cell Death Signaling. Cold Spring Harbor perspectives in biology. 2015;7(12).

54. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer. 1972;26(4):239-57.

55. Kiraz Y, Adan A, Kartal Yandim M, Baran Y. Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine. 2016;37(7):8471-86.
56. Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. Cell death and differentiation. 1999;6(11):1028-42.
57. Tower J. Programmed cell death in aging. Ageing research reviews. 2015;23(Pt A):90-100.
58. Gugliesi F, De Andrea M, Mondini M, Cappello P, Giovarelli M, Shoenfeld Y, et al. The proapoptotic activity of the Interferon-inducible gene IFI16 provides new insights into its etiopathogenetic role in autoimmunity. J Autoimmun. 2010;35(2):114-23.
59. Trojanowska M. Cellular and molecular aspects of vascular dysfunction in systemic sclerosis. Nat Rev Rheumatol. 2010;6(8):453-60.
60. Matucci-Cerinic M, Manetti M, Bruni C, Chora I, Bellando-Randone S, Lepri G, et al. The "myth" of loss of angiogenesis in systemic sclerosis: a pivotal early pathogenetic process or just a late unavoidable event? Arthritis Res Ther. 2017;19(1):162.
61. Kahaleh B. Vascular disease in scleroderma: mechanisms of vascular injury. Rheum Dis Clin North Am. 2008;34(1):57-71; vi.
62. Jelaska A, Korn JH. Role of apoptosis and transforming growth factor beta1 in fibroblast selection and activation in systemic sclerosis. Arthritis Rheum. 2000;43(10):2230-9.
63. Kissin E, Korn JH. Apoptosis and myofibroblasts in the pathogenesis of systemic sclerosis. Curr Rheumatol Rep. 2002;4(2):129-35.
64. Cipriani P, Fulminis A, Pingiotti E, Marrelli A, Liakouli V, Perricone R, et al. Resistance to apoptosis in circulating alpha/beta and gamma/delta T lymphocytes from patients with systemic sclerosis. J Rheumatol. 2006;33(10):2003-14.
65. Karimizadeh E, Gharibdoost F, Motamed N, Jafarinejad-Farsangi S, Jamshidi A, Mahmoudi M. c-Abl silencing reduced the inhibitory effects of TGF-beta1 on apoptosis in systemic sclerosis dermal fibroblasts. Mol Cell Biochem. 2015;405(1-2):169-76.
66. Santiago B, Galindo M, Rivero M, Pablos JL. Decreased susceptibility to Fas-induced apoptosis of systemic sclerosis dermal fibroblasts. Arthritis Rheum. 2001;44(7):1667-76.
67. Chabaud S, Corriveau MP, Grodzicky T, Senecal JL, Chartier S, Raymond Y, et al. Decreased secretion of MMP by non-lesional late-stage scleroderma fibroblasts after selection via activation of the apoptotic Fas-pathway. J Cell Physiol. 2011;226(7):1907-14.

68. Laplante P, Raymond MA, Gagnon G, Vigneault N, Sasseville AM, Langelier Y, et al. Novel fibrogenic pathways are activated in response to endothelial apoptosis: implications in the pathophysiology of systemic sclerosis. J Immunol. 2005;174(9):5740-9.

69. Bordron A, Dueymes M, Levy Y, Jamin C, Leroy JP, Piette JC, et al. The binding of some human antiendothelial cell antibodies induces endothelial cell apoptosis. J Clin Invest. 1998;101(10):2029-35.

70. Majone F, Olivieri S, Cozzi F, Montaldi A, Tonello M, Visentin MS, et al. Increased apoptosis in circulating lymphocyte cultures of anti-RNA polymerase III positive patients with systemic sclerosis. Rheumatol Int. 2009;29(8):891-5.

71. Yamamoto T, Nishioka K. Possible role of apoptosis in the pathogenesis of bleomycin-induced scleroderma. J Invest Dermatol. 2004;122(1):44-50.

72. Dziankowska-Bartkowiak B, Waszczykowska E, Zalewska A, Sysa-Jedrzejowska A. Evaluation of caspase 1 and sFas serum levels in patients with systemic sclerosis: correlation with lung dysfunction, joint and bone involvement. Mediators of inflammation. 2003;12(6):339-43.

73. Okazaki S, Ogawa F, Iwata Y, Hara T, Muroi E, Komura K, et al. Autoantibody against caspase-3, an executioner of apoptosis, in patients with systemic sclerosis. Rheumatol Int. 2010;30(7):871-8.

74. Distler JH, Akhmetshina A, Dees C, Jungel A, Sturzl M, Gay S, et al. Induction of apoptosis in circulating angiogenic cells by microparticles. Arthritis Rheum. 2011;63(7):2067-77.

75. Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, et al. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. The American journal of pathology. 1991;138(4):867-73.

76. Okano J, Suzuki S, Shiota K. Involvement of apoptotic cell death and cell cycle perturbation in retinoic acid-induced cleft palate in mice. Toxicology and applied pharmacology. 2007;221(1):42-56.

77. Citterio HL, Gaillard DA. Expression of transforming growth factor alpha (TGF alpha), epidermal growth factor receptor (EGF-R) and cell proliferation during human palatogenesis: an immunohistochemical study. The International journal of developmental biology. 1994;38(3):499-505.

78. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. Journal of cellular physiology. 2000;182(3):311-22.

79. Schluter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MH, Key G, Flad HD, et al. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. The Journal of cell biology. 1993;123(3):513-22.
80. Bartlett AH, Hayashida K, Park PW. Molecular and cellular mechanisms of syndecans in tissue injury and inflammation. Mol Cells. 2007;24(2):153-66.
81. Couchman JR. Syndecans: proteoglycan regulators of cell-surface microdomains? Nature reviews Molecular cell biology. 2003;4(12):926-37.
82. Bernfield M, Gotte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J, et al. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. Annual review of biochemistry. 1999;68:729-77.
83. Tkachenko E, Rhodes JM, Simons M. Syndecans: new kids on the signaling block. Circulation research. 2005;96(5):488-500.
84. Couchman JR, Chen L, Woods A. Syndecans and cell adhesion. International review of cytology. 2001;207:113-50.
85. Muto T, Miyoshi K, Munesue S, Nakada H, Okayama M, Matsuo T, et al. Differential expression of syndecan isoforms during mouse incisor amelogenesis. The journal of medical investigation : JMI. 2007;54(3-4):331-9.
86. Gallo R, Kim C, Kokenyesi R, Adzick NS, Bernfield M. Syndecans-1 and -4 are induced during wound repair of neonatal but not fetal skin. The Journal of investigative dermatology. 1996;107(5):676-83.
87. Oksala O, Salo T, Tammi R, Hakkinen L, Jalkanen M, Inki P, et al. Expression of proteoglycans and hyaluronan during wound healing. The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society. 1995;43(2):125-35.
88. Dumoitier N, Chaigne B, Regent A, Lofek S, Mhibik M, Dorfmuller P, et al. Scleroderma Peripheral B Lymphocytes Secrete Interleukin-6 and Transforming Growth Factor beta and Activate Fibroblasts. Arthritis & rheumatology. 2017;69(5):1078-89.
89. Muro Y, Kano T, Sugiura K, Hagiwara M. Low frequency of autoantibodies against Ki-67 antigen in Japanese patients with systemic autoimmune diseases. J Autoimmun. 1997;10(5):499-503.
90. Corriveau MP, Boufaied I, Lessard J, Chabaud S, Senecal JL, Grodzicky T, et al. The fibrotic phenotype of systemic sclerosis fibroblasts varies with disease duration and severity of skin involvement: reconstitution of skin fibrosis development using a tissue engineering approach. J Pathol. 2009;217(4):534-42.

91. Kozlova A, Pachera E, Maurer B, Jungel A, Distler JHW, Kania G, et al. Regulation of Fibroblast Apoptosis and Proliferation by MicroRNA-125b in Systemic Sclerosis. Arthritis & rheumatology. 2019;71(12):2068-80.
92. Wu CY, Asano Y, Taniguchi T, Sato S, Yu HS. Serum level of circulating syndecan-1: A possible association with proliferative vasculopathy in systemic sclerosis. J Dermatol. 2016;43(1):63-6.
93. Chen Y, Leask A, Abraham DJ, Pala D, Shiwen X, Khan K, et al. Heparan sulfate-dependent ERK activation contributes to the overexpression of fibrotic proteins and enhanced contraction by scleroderma fibroblasts. Arthritis Rheum. 2008;58(2):577-85.
94. Tanino Y, Wang X, Nikaido T, Misa K, Sato Y, Togawa R, et al. Syndecan-4 Inhibits the Development of Pulmonary Fibrosis by Attenuating TGF-beta Signaling. International journal of molecular sciences. 2019;20(20).
95. Chujo S, Shirasaki F, Kawara S, Inagaki Y, Kinbara T, Inaoki M, et al. Connective tissue growth factor causes persistent proalpha2(I) collagen gene expression induced by transforming growth factor-beta in a mouse fibrosis model. J Cell Physiol. 2005;203(2):447-56.
96. Lipson KE, Wong C, Teng Y, Spong S. CTGF is a central mediator of tissue remodeling and fibrosis and its inhibition can reverse the process of fibrosis. Fibrogenesis & tissue repair. 2012;5(Suppl 1):S24.
97. Mori T, Kawara S, Shinozaki M, Hayashi N, Kakinuma T, Igarashi A, et al. Role and interaction of connective tissue growth factor with transforming growth factor-beta in persistent fibrosis: A mouse fibrosis model. J Cell Physiol. 1999;181(1):153-9.
98. Brigstock DR. Connective tissue growth factor (CCN2, CTGF) and organ fibrosis: lessons from transgenic animals. Journal of cell communication and signaling. 2010;4(1):1-4.
99. Sonnylal S, Shi-Wen X, Leoni P, Naff K, Van Pelt CS, Nakamura H, et al. Selective expression of connective tissue growth factor in fibroblasts in vivo promotes systemic tissue fibrosis. Arthritis Rheum. 2010;62(5):1523-32.
100. Hashimoto G, Inoki I, Fujii Y, Aoki T, Ikeda E, Okada Y. Matrix metalloproteinases cleave connective tissue growth factor and reactivate angiogenic activity of vascular endothelial growth factor 165. The Journal of biological chemistry. 2002;277(39):36288-95.
101. Leask A. Transcriptional profiling of the scleroderma fibroblast reveals a potential role for connective tissue growth factor (CTGF) in pathological fibrosis. The Keio journal of medicine. 2004;53(2):74-7.

102. Jimenez SA, Castro SV, Piera-Velazquez S. Role of growth factors in the pathogenesis of tissue fibrosis in systemic sclerosis. Current rheumatology reviews. 2010;6(4):283-94.
103. Yamamoto T. Autoimmune mechanisms of scleroderma and a role of oxidative stress. Self/nonself. 2011;2(1):4-10.
104. Ibba-Manneschi L, Manetti M, Milia AF, Miniati I, Benelli G, Guiducci S, et al. Severe fibrotic changes and altered expression of angiogenic factors in maternal scleroderma: placental findings. Ann Rheum Dis. 2010;69(2):458-61.
105. Manetti M, Neumann E, Milia AF, Tarner IH, Bechi P, Matucci-Cerinic M, et al. Severe fibrosis and increased expression of fibrogenic cytokines in the gastric wall of systemic sclerosis patients. Arthritis Rheum. 2007;56(10):3442-7.
106. Sato S, Nagaoka T, Hasegawa M, Tamatani T, Nakanishi T, Takigawa M, et al. Serum levels of connective tissue growth factor are elevated in patients with systemic sclerosis: association with extent of skin sclerosis and severity of pulmonary fibrosis. J Rheumatol. 2000;27(1):149-54.
107. Zhang X, Nie S, Si X, Luo Y, Tang W. Association between the CTGF -945C/G polymorphism and systemic sclerosis: a meta-analysis. Gene. 2012;509(1):1-6.
108. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. J Pathol. 2008;214(2):199-210.
109. Bertelli E, Regoli M, Fonzi L, Occhini R, Mannucci S, Ermini L, et al. Nestin expression in adult and developing human kidney. The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society. 2007;55(4):411-21.
110. Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. J Pathol. 2003;200(4):500-3.
111. Wynn TA. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. J Clin Invest. 2007;117(3):524-9.
112. Darby IA, Hewitson TD. Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis. International review of cytology. 2007;257:143-79.
113. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G. The myofibroblast: one function, multiple origins. The American journal of pathology. 2007;170(6):1807-16.
114. Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. Nat Med. 2012;18(7):1028-40.

115. Beon M, Harley RA, Wessels A, Silver RM, Ludwicka-Bradley A. Myofibroblast induction and microvascular alteration in scleroderma lung fibrosis. Clin Exp Rheumatol. 2004;22(6):733-42.
116. Gilbane AJ, Denton CP, Holmes AM. Scleroderma pathogenesis: a pivotal role for fibroblasts as effector cells. Arthritis Res Ther. 2013;15(3):215.
117. Rajkumar VS, Howell K, Csiszar K, Denton CP, Black CM, Abraham DJ. Shared expression of phenotypic markers in systemic sclerosis indicates a convergence of pericytes and fibroblasts to a myofibroblast lineage in fibrosis. Arthritis Res Ther. 2005;7(5):R1113-23.
118. Manetti M, Neumann E, Muller A, Schmeiser T, Saar P, Milia AF, et al. Endothelial/lymphocyte activation leads to prominent CD4+ T cell infiltration in the gastric mucosa of patients with systemic sclerosis. Arthritis Rheum. 2008;58(9):2866-73.
119. Mazzotta C, Manetti M, Rosa I, Romano E, Blagojevic J, Bellando-Randone S, et al. Proangiogenic effects of soluble alpha-Klotho on systemic sclerosis dermal microvascular endothelial cells. Arthritis Res Ther. 2017;19(1):27.
120. Khanna D, Furst DE, Clements PJ, Allanore Y, Baron M, Czirjak L, et al. Standardization of the modified Rodnan skin score for use in clinical trials of systemic sclerosis. J Scleroderma Relat Disord. 2017;2(1):11-8.
121. Medsger TA, Jr., Bombardieri S, Czirjak L, Scorza R, Della Rossa A, Bencivelli W. Assessment of disease severity and prognosis. Clin Exp Rheumatol. 2003;21(3 Suppl 29):S42-6.
122. Clements PJ, Lachenbruch PA, Seibold JR, Zee B, Steen VD, Brennan P, et al. Skin thickness score in systemic sclerosis: an assessment of interobserver variability in 3 independent studies. J Rheumatol. 1993;20(11):1892-6.
123. Kawaguchi Y, Nakamura Y, Matsumoto I, Nishimagi E, Satoh T, Kuwana M, et al. Muscarinic-3 acetylcholine receptor autoantibody in patients with systemic sclerosis: contribution to severe gastrointestinal tract dysmotility. Ann Rheum Dis. 2009;68(5):710-4.
124. Sallam H, McNearney TA, Chen JD. Systematic review: pathophysiology and management of gastrointestinal dysmotility in systemic sclerosis (scleroderma). Aliment Pharmacol Ther. 2006;23(6):691-712.
125. Manetti M, Milia AF, Benelli G, Messerini L, Matucci-Cerinic M, Ibba-Manneschi L. The gastric wall in systemic sclerosis patients: a morphological study. Ital J Anat Embryol. 2010;115(1-2):115-21.
126. Zuber-Jerger I, Muller A, Kullmann F, Gelbmann CM, Endlicher E, Muller-Ladner U, et al. Gastrointestinal manifestation of systemic sclerosis--thickening of the upper

gastrointestinal wall detected by endoscopic ultrasound is a valid sign. Rheumatology (Oxford). 2010;49(2):368-72.

127. Thoua NM, Derrett-Smith EC, Khan K, Dooley A, Shi-Wen X, Denton CP. Gut fibrosis with altered colonic contractility in a mouse model of scleroderma. Rheumatology (Oxford). 2012;51(11):1989-98.

128. Taroni JN, Martyanov V, Huang CC, Mahoney JM, Hirano I, Shetuni B, et al. Molecular characterization of systemic sclerosis esophageal pathology identifies inflammatory and proliferative signatures. Arthritis Res Ther. 2015;17:194.

129. Piasecki C, Chin J, Greenslade L, McIntyre N, Burroughs AK, McCormick PA. Endoscopic detection of ischaemia with a new probe indicates low oxygenation of gastric epithelium in portal hypertensive gastropathy. Gut. 1995;36(5):654-6.

130. Kaye SA, Seifalian AM, Lim SG, Hamilton G, Black CM. Ischaemia of the small intestine in patients with systemic sclerosis: Raynaud's phenomenon or chronic vasculopathy? QJM : monthly journal of the Association of Physicians. 1994;87(8):495-500.

131. Russell ML, Friesen D, Henderson RD, Hanna WM. Ultrastructure of the esophagus in scleroderma. Arthritis Rheum. 1982;25(9):1117-23.

132. Rose S, Young MA, Reynolds JC. Gastrointestinal manifestations of scleroderma. Gastroenterology clinics of North America. 1998;27(3):563-94.

133. Malandrini A, Selvi E, Villanova M, Berti G, Sabadini L, Salvadori C, et al. Autonomic nervous system and smooth muscle cell involvement in systemic sclerosis: ultrastructural study of 3 cases. J Rheumatol. 2000;27(5):1203-6.

134. Akesson A, Ekman R, Prytz H, Sundler F. Tissue concentrations of gastrointestinal regulatory peptides in the duodenal mucosa in systemic sclerosis. Clin Exp Rheumatol. 1998;16(2):141-8.

135. Della Rossa A, Valentini G, Bombardieri S, Bencivelli W, Silman AJ, D'Angelo S, et al. European multicentre study to define disease activity criteria for systemic sclerosis. I. Clinical and epidemiological features of 290 patients from 19 centres. Ann Rheum Dis. 2001;60(6):585-91.

136. Poormoghim H, Lucas M, Fertig N, Medsger TA, Jr. Systemic sclerosis sine scleroderma: demographic, clinical, and serologic features and survival in forty-eight patients. Arthritis Rheum. 2000;43(2):444-51.

137. Domsic R, Fasanella K, Bielefeldt K. Gastrointestinal manifestations of systemic sclerosis. Digestive diseases and sciences. 2008;53(5):1163-74.

138. Nagaraja V, McMahan ZH, Getzug T, Khanna D. Management of gastrointestinal involvement in scleroderma. Current treatment options in rheumatology. 2015;1(1):82-105.
139. Savarino E, Furnari M, de Bortoli N, Martinucci I, Bodini G, Ghio M, et al. Gastrointestinal involvement in systemic sclerosis. Presse Med. 2014;43(10 Pt 2):e279-91.
140. Duchini A, Sessoms SL. Gastrointestinal hemorrhage in patients with systemic sclerosis and CREST syndrome. Am J Gastroenterol. 1998;93(9):1453-6.
141. Marie I, Levesque H, Ducrotte P, Denis P, Hellot MF, Benichou J, et al. Gastric involvement in systemic sclerosis: a prospective study. Am J Gastroenterol. 2001;96(1):77-83.
142. Elkayam O, Oumanski M, Yaron M, Caspi D. Watermelon stomach following and preceding systemic sclerosis. Seminars in arthritis and rheumatism. 2000;30(2):127-31.
143. Petcu A, Ghib LJ, Grad SM, Popovici C, Rogojan L, Rednic NV, et al. Upper gastrointestinal involvement in systemic sclerosis: Findings in a real-life setting. Experimental and therapeutic medicine. 2019;18(6):5095-100.
144. Thonhofer R, Siegel C, Trummer M, Graninger W. Early endoscopy in systemic sclerosis without gastrointestinal symptoms. Rheumatol Int. 2012;32(1):165-8.
145. Radic M. Role of Helicobacter pylori infection in autoimmune systemic rheumatic diseases. World journal of gastroenterology. 2014;20(36):12839-46.
146. Radic M, Kaliterna DM, Radic J. Helicobacter pylori infection and systemic sclerosis-is there a link? Joint Bone Spine. 2011;78(4):337-40.
147. Natalello G, Bosello SL, Paroni Sterbini F, Posteraro B, De Lorenzis E, Canestrari GB, et al. Gut microbiota analysis in systemic sclerosis according to disease characteristics and nutritional status. Clin Exp Rheumatol. 2020;38 Suppl 125(3):73-84.
148. Nishimagi E, Tochimoto A, Kawaguchi Y, Satoh T, Kuwana M, Takagi K, et al. Characteristics of patients with early systemic sclerosis and severe gastrointestinal tract involvement. J Rheumatol. 2007;34(10):2050-5.
149. Gonzalez R, Storr M, Bloching H, Seige M, Ott R, Allescher HD. Autoantibody profile in progressive systemic sclerosis as markers for esophageal involvement. J Clin Gastroenterol. 2001;32(2):123-7.
150. Goldblatt F, Gordon TP, Waterman SA. Antibody-mediated gastrointestinal dysmotility in scleroderma. Gastroenterology. 2002;123(4):1144-50.
151. Jun JB, Kuechle M, Harlan JM, Elkon KB. Fibroblast and endothelial apoptosis in systemic sclerosis. Curr Opin Rheumatol. 2003;15(6):756-60.

152. Tsujino K, Reed NI, Atakilit A, Ren X, Sheppard D. Transforming growth factor-beta plays divergent roles in modulating vascular remodeling, inflammation, and pulmonary fibrosis in a murine model of scleroderma. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2017;312(1):L22-L31.
153. Kumanovics G, Magyarlaki T, Komocsi A, Szekeres G, Czirjak L. Simultaneous presence of neutrophil alveolitis and Ki-67 positivity of alveolar macrophages in dermato-/polymyositis and systemic sclerosis. Rheumatol Int. 2003;23(1):6-10.
154. Cutolo M, Sulli A, Smith V. Assessing microvascular changes in systemic sclerosis diagnosis and management. Nature reviews Rheumatology. 2010;6(10):578-87.
155. Laine L, Takeuchi K, Tarnawski A. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. Gastroenterology. 2008;135(1):41-60.
156. Marie I, Dominique S, Levesque H, Ducrotte P, Denis P, Hellot MF, et al. Esophageal involvement and pulmonary manifestations in systemic sclerosis. Arthritis Rheum. 2001;45(4):346-54.
157. Weston S, Thumshirn M, Wiste J, Camilleri M. Clinical and upper gastrointestinal motility features in systemic sclerosis and related disorders. Am J Gastroenterol. 1998;93(7):1085-9.
158. Cubela M, Soljic V, Kero D, Vukojevic K, Govorko DK, Saraga-Babic M. Comparison of proliferation, apoptosis and expression of syndecan-1 and alpha-SMA in edentulous ridge oral mucosa of successful and early failed submerged dental implants--An immunohistochemical study. Arch Oral Biol. 2016;66:155-64.
159. Worda M, Sgonc R, Dietrich H, Niederegger H, Sundick RS, Gershwin ME, et al. In vivo analysis of the apoptosis-inducing effect of anti-endothelial cell antibodies in systemic sclerosis by the chorionallantoic membrane assay. Arthritis Rheum. 2003;48(9):2605-14.
160. Sgonc R, Gruschwitz MS, Dietrich H, Recheis H, Gershwin ME, Wick G. Endothelial cell apoptosis is a primary pathogenetic event underlying skin lesions in avian and human scleroderma. J Clin Invest. 1996;98(3):785-92.
161. Sgonc R, Dietrich H, Sieberer C, Wick G, Christner PJ, Jimenez SA. Lack of endothelial cell apoptosis in the dermis of tight skin 1 and tight skin 2 mice. Arthritis Rheum. 1999;42(3):581-4.
162. Sgonc R, Gruschwitz MS, Boeck G, Sepp N, Gruber J, Wick G. Endothelial cell apoptosis in systemic sclerosis is induced by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity via CD95. Arthritis Rheum. 2000;43(11):2550-62.
163. Matucci-Cerinic M, Kahaleh B, Wigley FM. Review: evidence that systemic sclerosis is a vascular disease. Arthritis Rheum. 2013;65(8):1953-62.

164. Tarnawski A, Pai R, Deng X, Ahluwalia A, Khomenko T, Tanigawa T, et al. Aging gastropathy-novel mechanisms: hypoxia, up-regulation of multifunctional phosphatase PTEN, and proapoptotic factors. Gastroenterology. 2007;133(6):1938-47.

11. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODATCI:

Ime i prezime: Katarina Borić
Mjesto rođenja: Split, Hrvatska
Datum rođenja: 23.04.1975. god.
Državljanstvo: hrvatsko
Narodnost: Hrvatica

OBRAZOVANJE

1981. - 1989. Osnovna škola "Vinko Paić Ožić" u Splitu
1989. - 1993. Zdravstveni obrazovni centar Split, smjer laboratorijski tehničar
1993. - 1999. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, studij u Splitu
2010. Poslijediplomski studij: "Translacijska istraživanja u biomedicini", Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

RADNO ISKUSTVO:

1999.- 2002. liječnik pripravnik u Kliničkom bolničkom centru Split
2002.- 2004. liječnik opće medicine u primarnoj zdravstvenoj zaštiti
2004.- 2009. liječnik na specijalizaciji iz interne medicine, Poliklinika za internu medicinu, ginekologiju i psihijatriju „J&J Medici", Split
2009.- 2012. specijalist interne medicine, Poliklinika „dr Obad", Split
2012.- specijalist interne medicine, Zavod za reumatologiju i kliničku imunologiju, Klinika za unutarnje bolesti, KBC Split
2012.- vanjski suradnik u nastavi pri katedri Interna medicina Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu
2016.- specijalist interne medicine s užom specijalizacijom iz reumatologije
2016.- suradnik u nastavi pri katedri Kliničke vještine Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu

2020.- specijalist interne medicine s užom specijalizacijom iz kliničke imunologije i alergologije

JEZICI:

- Hrvatski jezik (materinski jezik)
- Engleski jezik (aktivno korištenje u govoru i pisanju)
- Njemački jezik (bazično korištenje u govoru i pisanju)
- Talijanski jezik (bazično korištenje u govoru i pisanju)

ZNANSTVENI INTERESI: interna medicina, reumatologija i klinička imunologija, sistemska skleroza, patogeneza imunoloških oboljenja.

TEHNIČKE VJEŠTINE: poznavanje ultrazvučnog pregleda trbuha, muskuloskeletnog sustava, kapilaroskopija.

POZNAVANJE RAČUNALNIH PROGRAMA: Microsoft Office paket (Word, Excel, Power Point, Outlook), EndNote, Adobe Photoshop, ImageJ.

ČLANSTVO U PROFESIONALNIM ORGANIZACIJAMA:

2002. Hrvatska liječnička komora
2012. Hrvatski liječnički zbor
2012. Hrvatsko reumatološko društvo
2020. Hrvatsko imunološko društvo

IZVORNI ZNANSTVENI I PREGLEDNI RADOVI U INDEXIRANIM ČASOPISIMA:

1. Vrazic H, Sikic J, Lucijanic T, Milosevic M, Boric K, Udovicic M, et al. The prevalence of smoking among Croatian hospitalized coronary heart disease patients. Coll Antropol. 2012;36 Suppl 1:229-33.

2. Perkovic D, Mihaljevic S, Krstulovic DM, Boric K, Kaliterna DM. [Paraneoplastic hypertrophic osteoarthropathy]. Reumatizam. 2013;60(1):29-31.

3. Kaliterna DM, Perkovic D, Radic M, Krstulovic DM, Boric K, Marinovic I. [Sex hormones, immune disorders, and inflammatory rheumatic diseases]. Reumatizam. 2014;61(1):17-22.

4. Perkovic D, Kaliterna DM, Krstulovic DM, Bozic I, Boric K, Radic M. [Clinical approach to a patient with rheumatoid arthritis]. Reumatizam. 2014;61(2):24-30.

5. Bozic I, Bozic D, Petric M, Boric K, Kaliterna DM. [Long-term glucocorticoid therapy and the rapid development of squamous cell carcinoma in systemic sclerosis: Is there a connection?]. Reumatizam. 2016;63(1):14-9.

6. Parat K, Radic M, Boric K, Perkovic D, Biocina Lukenda D, Martinovic Kaliterna D. Association of low socioeconomic status and physician assessment of disease severity with oral health-related quality of life in patients with systemic sclerosis: a pilot study from Croatia, a country in transition. J Int Med Res. 2018;46(12):5127-36.

7. Boric K, Mardesic S, Martinovic Kaliterna D, Radic M, Tadin Hadjina I, Vukojevic K, et al. Expression of apoptotic and proliferation factors in gastric mucosa of patients with systemic sclerosis correlates with form of the disease. Scientific reports. 2019;9(1):18461.

8. Perkovic D, Petric M, Bozic I, Boric K, Marasovic Krstulovic D, Radic M, et al. Low dose intravenous immunoglobulin in addition to cyclophosphamide in systemic sclerosis: Single centre experience. Wien Klin Wochenschr. 2020.