

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Milica Z. Grujić

IMUNOREAKTIVNOST NA PROTEINE HRANE
KOD PACIJENATA SA RANIM REUMATOIDNIM
ARTRITISOM

Doktorska disertacija

Beograd, 2017. godine

UNIVERSITY OF BELGRADE

SCHOOL OF MEDICINE

Milica Z. Grujic

IMMUNOREACTIVITY TO FOOD ANTIGENS IN
PATIENTS WITH EARLY RHEUMATOID
ARTHRITIS

Doctoral dissertation

Belgrade, 2017.

MENTOR:

Prof dr sci med Nemanja Damjanov, redovni profesor interne medicine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, Institut za reumatologiju

KOMENTOR:

Dr sci Zorica Juranić, naučni savetnik u penziji, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

ČLANOVI KOMISIJE:

1. **Prof dr sci med Marija Radak Perović**, profesor interne medicine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, Institut za reumatologiju
2. **Doc dr sci med Mirjana Šefik Bukilica**, docent interne medicine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, Institut za reumatologiju
3. **Doc dr sci med Bojana Stamenković**, docent interne medicine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Nišu, Institut Niška Banja

Datum odbrane:

majci Zorici,

koja je moj „vetar u ledja“ i koja je bezrezervno verovala u mene i moj put

Ova doktorska disertacija uradjena je na Institutu za reumatologiju pod rukovodstvom Prof Nemanje Damjanova. Eksperimentalni deo istraživanja uradjena je na Institutu za radiologiju i onkologiju Srbije, u Laboratoriji za modifikatore biološkog odgovora, pod rukovodstvom naučnog savetnika dr sci Zorice Juranić, u okviru projekta 175011 Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije. Ovom prilikom bih želela svima srdačno da se zahvalim.

Mom mentoru, **Prof Nemanji Damjanovu**, na podršci i ukazanom poverenju, na velikoj pomoći i važnim savetima u ključnim trenucima izrade ove disertacije.

Komentoru, **dr sci Zorici Juranić**, koja mi je prva ukazala priliku i uvela u fantastični svet nauke, od koje sam naučila prve korake u istraživanju i pisanju radova. Veliko hvala joj na bezrezervnoj pomoći, razumevanju, profesionalnim savetima i sjajnim idejama tokom izrade ovog rada, ali i van okvira disertacije, na poverenju, prijateljstvu i podršci koje mi je ukazala.

Veliku zahvalnost dugujem lekarima i sestrama Instituta za reumatologiju koji su nesebično pomagali u odabiru pacijenata, vadjanju krvi, prikupljanju i obradi podataka. Posebno hvala mojoj prijateljici **dr Maji Zlatanović** na važnim i praktičnim savetima, na podršci i upornosti u svim fazama izrade ove disertacije, počevši od prikupljanja do finalnog oblikovanja teze. Hvala **dr Slavici Prodanović** na velikoj pomoći pri odabiru pacijenata i obradi podataka.

Svim kolegama iz Eksperimentalne laboratorije Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije veliko hvala na nebrojenim savetima tokom eksperimenata, pogotovo **dr sci Ivani Matić** koja je strpljivo i uporno bila uz mene i koja mi je svojim znanjem i iskustvom nebrojeno puta pomogla tokom izrade ove disertacije. Neizmerno hvala laboratorijskom tehničaru **Tatjani Petrović** koja me je naučila osnovama laboratorijskih tehnika i koja je bila tu za mene za svaku sitnicu, u svako doba dana i noći.

Mojoj velikoj prijateljici **dr Irini Besu Žižak**, dugujem neizmernu zahvalnost za sve što je učinila za mene, uz nju sam savladala prve korake ELISA i MTT testova. Hvala joj na prisustvu u svakoj fazi moga života, na toploj prijateljskoj reči. Podrška i razumevanje koje je nesebično pružala učinili su moj put lakšim.

Najviše hvala onima koji su moj najveći oslonac: **suprugu Milošu, roditeljima Zorici i Zoranu, sestri Ivani**. Hvala za nebrojene sate pomoći, podrške, strpljenja, inspiracije, ljubavi, topline, motivacije, na dobroj energiji koju su mi nesebično pružali. Zbog njih sam danas na ovom sjajnom putu.

IMUNOREAKTIVNOST NA PROTEINE HRANE KOD PACIJENATA SA RANIM REUMATOIDNIM ARTRITISOM

REZIME

Uloga izmenjene crevne mukoze kao osnove nastanka autoimunosti u reumatoidnom artritisu (RA) još uvek nije razjašnjena. Kod bolesnika sa poodmaklim RA se mogu otkriti antitela na različite antigene iz hrane. Poseban značaj pridaje se IgG klasi ovih antitela jer aktivacija njihovih receptora (CD16/ FcγIIIR) na ćelijama imunskog sistema može imati veoma raznovrsne efekte. Nije poznato zašto postoji povišena imunoreaktivnost na antigene hrane kod bolesnika sa RA. Kao jedan od mogućih uzroka povišene imunoreaktivnosti na svakodnevne antigene iz hrane spominje se i enzim dipeptidil peptidaza IV (DPPIV). Ovaj enzim menja aktivnost biološki aktivnih peptida, a kao jedna od najvažnijih uloga ove peptidaze navodi se njen doprinos aktivaciji T limfocita i pokretanje imunskog odgovora. Brojna literatura opisuje serumsku aktivnost i ekspresiju DPPIV u hroničnom reumatoidnom artritisu, ali nema puno podataka o ulozi ovog enzima u patogenezi ranog RA.

Rad je imao za cilj da se prouči moguća povezanost između humoralne i ćelijske imunoreaktivnosti na antigene prisutne u namirnicama (gljadin, proteini kravljeg mleka i fitohemaglutinin) sa aktivnošću bolesti u obolelih od ranog, nelečenog RA. Dodatno, cilj je bio i da se odredi serumska aktivnost i ekspresija DPPIV na mononuklearnim ćelijama krvi kod pacijenata sa RA i da se utvrdi njihova moguća povezanost sa kliničkim pokazateljima bolesti. Ispitivana je i ekspresija IgG receptora na površini imunokompetentnih ćelija.

Studija preseka obuhvatila je 50 bolesnika sa ranim, nelečenim RA, kao i 100 osoba u tri kontrolne grupe. U prvoj kontrolnoj grupi bilo je 30 obolelih od degenerativnih bolesti zglobova i kičme, uskladjениh po polu i po starosti sa obolelima od RA. Drugu kontrolnu grupu je činilo 40 zdravih ispitanika, a treću 30 bolesnika sa dugotrajnim RA (bolest trajala duže od 5 god) koja je učestvovala samo u ispitivanju ekspresije i serumске aktivnosti DPPIV. Sadržaj antitela na proteine iz hrane određivan je ELISA metodom, stimulacija proliferacije limfocita u prisustvu antigena iz hrane MTT testom, ekspresija

DPPIV ispitivana je metodom protočne citometrije, dok je aktivnost DPPIV u serumu merena direktnom fotometrijskom metodom.

Značajno viši nivoi IgG antitela na glijadin uočeni su kod pacijenata sa ranim RA u odnosu na zdrave osobe ($p=0.014$). Nivoi IgA i IgM antitela na proteine kravljeg mleka bili su takodje viši kod pacijenata sa ranim RA u poredjenju sa kontrolnom grupom zdravih osoba ($p=0.0308$), dok nije uočena značajna razlika sa grupom bolesnika sa degenerativnim oboljenjima zglobova. Stimulacija proliferacije limfocita u prisustvu glijadina/mleka nije se značajno razlikovala izmedju ispitivanih grupa pacijenata sa rRA, zdravih kontrola i bolesnika sa degenerativnim reumatizmom, ali je uočena značajno niža stimulacija proliferacije limfocita kod bolesnika sa ranim RA u prisustvu samo PHA ($p< 0.0001$), ali i u kombinaciji PHA i glijadina/mleka ($p< 0.0001/ p< 0.0001$) u odnosu na zdrave kontrole i osobe sa degenerativnim reumatizmom. DAS28 nije pokazao značajnu povezanost sa nivoima antitela na proteine iz hrane, ali je nivo anti-glijadinskih IgA antitela korelirao sa brojem otečenih zglobova i nivoom CRP-a. Gustina receptora za IgG na limfocitima i granulocitima je bila povezana sa nivoom IgG antitela na glijadin. Serumska aktivnost DPPIV je bila značajno niža kod pacijenata sa ranim RA ($p=0.024$), kod hroničnih RA ($p< 0.0001$) i kod bolesnika sa degenerativnim reumatskim bolestima ($p< 0.0001$) u odnosu na zdrave kontrole. Iako je procenat ukupnih CD26+ leukocita bio značajno snižen kod bolesnika sa ranim RA, procenat CD26+ limfocita i monocita, kao i gustina CD26 na ovim ćelijama kod ovih pacijenata se nisu razlikovali u odnosu na zdrave osobe. DAS28 nije bio povezan sa ekspresijom ili serumskom aktivnošću DPPIV, ali je uočena značajna negativna povezanost izmedju dužine bolesti (od pojave prvih simptoma do uključivanja u ispitivanje) i serumske aktivnosti DPPIV.

Povišeni nivoi antitela na glijadin i mleko su prisutni kod bolesnika sa ranim RA i mogu imati ulogu u ranoj fazi ove bolesti aktivišući IgG receptore na površini imunokompetentnih ćelija. Smanjena serumska aktivnost DPPIV, ali ne i njena ekspresija, upućuju na moguću ulogu ovog enzima veoma rano u patogenezi RA i kao takva može imati klinički značaj u ranoj dijagnozi ove bolesti.

Ključne reči: rani reumatoidni artritis, antigeni hrane, glijadin, proteini kravljeg mleka, CD16, DPPIV/CD26

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Molekularna medicina (Reumatologija)

UDK broj:

IMMUNOREACTIVITY TO FOOD ANTIGENS IN PATIENTS WITH EARLY RHEUMATOID ARTHRITIS

SUMMARY

The potential role of changed gut mucosa as a basis for development of autoimmunity in rheumatoid arthritis (RA) has been assessed, but still remains unclear. Antibodies to food antigens were detected in chronic RA, with the special emphasis on IgG class of antibodies, because the activation of their receptors (CD16/Fc γ IIIR) on many different immune cells can result in various effects. As a potential cause of this immunoreactivity to food antigens, the enzyme dipeptidyl peptidase IV (DPPIV/CD26) is mentioned. DPPIV/CD26 changes activity of biologically active peptides, but one of the most important roles of this enzyme is activation of T lymphocytes and immune regulation. The majority of published data deals with chronic, established RA disease. However, little is known about the possible role of DPPIV/CD26 in the pathogenesis of early RA.

The aim of this study was to investigate possible relationship between humoral/cellular immunity to food antigens and disease activity in treatment naive patients with early RA (eRA). Moreover, the aim of this study was to determine the serum activity of DPPIV, its expression on peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and to assess possible correlations with disease activity (DAS28) in untreated patients with eRA. Furthermore, expression of CD16 on immunocompetent cells of peripheral blood and its possible relation to food antigens was examined.

Study included 50 patients with early, untreated RA, and 100 persons in three control groups. First control group consisted of 30 patients with osteoarthritis, matched by age and gender. Second control group included 40 healthy volunteers and third control group consisted of 30 patients with chronic RA (tested only for DPPIV serum activity and expression). ELISA tests were used to determine the levels of IgA, IgG and IgM antibodies to gliadin and cow's milk proteins (CMP), MTT test was used for the determination of the stimulation of lymphocyte proliferation. Determination of subpopulations (CD16, CD56, CD26) of immunocompetent cells was performed by flow cytometry. Serum activity of DPPIV was determined by the direct photometric method.

Enhanced levels of IgG antibodies to gliadin were detected in patients with eRA in comparison with healthy persons ($p=0.014$). The levels of IgA and IgM antibodies to CMP were significantly higher in patients with eRA compared to the group of healthy volunteers ($p=0.0308$), but no difference was detected in comparison with osteoarthritis patients. Stimulation of lymphocyte proliferation in the presence of food antigens with addition of phytohemagglutinine as mitogen, was significantly lowered in patients' group ($p < 0.0001$ for gliadin and $p < 0.0001$ for CMP) compared to both healthy volunteers and osteoarthritis patients. DAS28 did not show correlation with the levels of antibodies to food antigens, however the number of swollen joints and the concentration of CRP were positively correlated with the levels of IgA anti-gliadin antibodies. Furthermore, mean fluorescence intensity (MFI) of CD16 was directly correlated with the levels of IgG antibodies to gliadin. Serum activity of DPPIV was lower in patients with eRA ($p=0.024$), patients with cRA ($p < 0.0001$) and in osteoarthritis patients ($p < 0.0001$) in comparison with healthy controls. Although, the percentage of overall CD26+ white blood cells was significantly decreased in eRA patients ($p < 0.001$), the percentage of CD26+ lymphocytes and monocytes and MFI of CD26 on these cells in eRA patients showed no significant difference compared to healthy volunteers. DAS28 showed no significant correlation with CD26 expression or DPPIV serum activity, but significant inverse correlation between the duration of symptoms and DPPIV serum activity was observed.

Antibodies to food antigens like gliadin and cow's milk proteins are present in sera of patients with early RA and could have possible role in the early stages of this disease through activating IgG receptors on immunocompetent cells. Decrease of DPPIV serum activity, but not CD26 expression, is present in an early stage of rheumatoid arthritis.

Keywords: early rheumatoid arthritis, food antigens, gliadin, cow's milk proteins, CD16, DPPIV/CD26

Field of research: Medicine

Specific field of research: Molecular medicine (Rheumatology)

UDK number:

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Etiologija reumatoidnog artritisa.....	1
1.1.1. Genetski faktori.....	2
1.1.2. Spoljni faktori.....	3
1.2. Patogeneza reumatoidnog artritisa.....	5
1.2.1. Urođeni imunski odgovor.....	8
1.2.2. Stečeni imunski odgovor.....	9
1.2.3. Inflamacija u zglobovima.....	10
1.2.4. Sistemska inflamacija u reumatoidnom artritisu.....	11
1.2.5. Uloga ishrane u patogenezi reumatoidnog artritisa.....	13
1.2.6. Uloga dipeptidil peptidaze IV u patogenezi reumatoidnog artritisa.....	15
1.3. Klinička slika reumatoidnog artritisa.....	19
1.3.1. Zglobne promene.....	20
1.3.2. Sistemske manifestacije reumatoidnog artritisa.....	21
1.3.2.1. Reumatoidni čvorići.....	21
1.3.2.2. Reumatoidni vaskulitis.....	22
1.3.2.3. Specifične promene u organima.....	22
1.4. Dijagnoza reumatoidnog artritisa.....	23
1.5. Lečenje reumatoidnog artritisa.....	24
1.5.1. Medikamentozna terapija.....	25
1.5.1.1. Lekovi koji modifikuju tok bolesti (LMTB).....	26
1.5.1.1.1. Sintetski lekovi koji modifikuju tok bolesti.....	26
1.5.1.1.2. Biološki lekovi.....	28
1.5.1.2. Glikokortikoidi.....	30
1.5.1.3. Simptomatska terapija.....	31
1.5.2. Rehabilitacija.....	31
1.5.3. Hirurško lečenje.....	31
2. CILJ RADA	32
3. BOLESNICI I METODE	33
3.1. Tip studije.....	33
3.2. Mesto i period istraživanja.....	33
3.3. Izbor ispitanika.....	33
3.3.1. Uključujući i isključujući kriterijumi.....	33
3.4. Studijski protokol.....	35
3.5. Metode.....	36
3.5.1. ELISA testovi za određivanje nivoa antitela IgA, IgG i IgM klase na glijadin i proteine kravljeg mleka.....	36
3.5.2. Test stimulacije proliferacije ćelija na antigene hrane.....	37
3.5.3. Ekspresija receptora za IgG na leukocitima i ekspresija CD26 na površini perifernih mononuklearnih ćelija.....	38
3.5.4. Aktivnost dipeptidil peptidaze 4 (DPPIV/CD26) u serumu.....	39
3.5.5. Statistička obrada podataka.....	40

4. REZULTATI	41
4.1. Određivanje nivoa antitela IgG, IgA i IgM klase na proteine iz hrane u serumu.....	42
4.1.1. Antitela na glijadin.....	42
4.1.2. Antitela na proteine iz kravljeg mleka.....	45
4.2. Stimulacija proliferacije PBMC antigenima hrane.....	47
4.3. Ekspresija IgG receptora na efektorskim ćelijama imunog sistema.....	52
4.3.1. Učestalost i ekspresija CD16 na limfocitima.....	52
4.3.2. Učestalost CD16+CD56+ ćelija.....	54
4.3.3. Učestalost i ekspresija CD16 na granulocitima.....	57
4.3.4. Učestalost limfocita i granulocita u populaciji leukocita.....	59
4.4. Ekspresija dipeptidil peptidaze 4 na površini mononuklearnih ćelija periferne krvi.....	61
4.4.1. Ekspresija CD26 antigena na limfocitima.....	61
4.4.2. Ekspresija CD26 antigena na monocitima.....	65
4.5. Serumska aktivnost dipeptidil peptidaze 4.....	68
4.5.1. Pacijenti sa ranim RA vs pacijenti sa veoma ranim RA.....	70
4.6. Povezanost kliničkih karakterstika ranog reumatoidnog artitisa sa ispitivanim pokazateljima.....	70
4.6.1. Povezanost kliničkih karakterstika bolesti i imunoreaktivnosti na proteine iz hrane.....	70
4.6.2. Povezanost kliničkih karakterstika bolesti i serumske aktivnosti i ekspresije DPPIV/CD26 kod pacijenata sa ranim reumatoidnim artritism.....	71
4.6.3. Povezanost pokazatelja imunoreaktivnosti na proteine hrane sa serumskom aktivnošću i ekspresijom DPPIV/CD26 kod pacijenata sa ranim reumatoidnim artritism.....	72
5. DISKUSIJA	73
6. ZAKLJUČCI	88
7. LITERATURA	90

1. UVOD

Reumatoidni artritis je multisistemsko, hronično zapaljenjsko oboljenje koje se manifestuje kao destruktivni poliartritis uz prisutne serološke pokazatelje autoimunosti. Karakteriše ga hronični bol i destrukcija zglobova, veći mortalitet u odnosu na zdravu populaciju, povećani rizik od invalidnosti sa visokim troškovima lečenja. Prevalencija ove bolesti u svetu iznosi oko 1% (Gibofsky 2014), u severnoj Americi 0.9-1.1% (Helmick i sar, 2008; Bernatsky i sar, 2014), u Kini oko 0.35% (Zeng i sar, 2015), u Japanu između 0.6 i 1% (Yamanaka i sar, 2014), u Evropi 0.31-1.1% (Symmons i sar, 2002; Neovius i sar, 2011; Otsa i sar, 2013; Rossini i sar, 2014). U Srbiji je procenjeno da zahvata oko 0.35% populacije stanovnika (Zlatković-Švenda i sar, 2014). Ovo je najčešće zapaljenjsko oboljenje zglobova i tri puta češće se javlja kod žena. Prvi simptomi se mogu javiti u bilo kom dobu, međutim najveća incidenca bolesti je u periodu od četvrte do šeste decenije života (Abdel-Nasser i sar, 1997). Klinički, reumatoidni artritis je simetrični poliartritis koga karakteriše hronična sistemska inflamacija i limfocitna infiltracija sinovije koji dovode do perzistentnog, progresivnog sinovitisa perifernih zglobova, uz neretko prisutne i brojne ekstraartikularne manifestacije bolesti.

1.1 Etiologija reumatoidnog artritisa

Reumatoidni artritis je oboljenje nepoznate etiologije. Smatra se da je ova bolest multifaktorijalna, tj. da važnu ulogu u patogenezi imaju kako genetski tako i faktori spoljne sredine. Pretpostavlja se da polimorfizmi različitih gena rezultuju promenjenom regulacijom ili smanjenim pragom limfocitne aktivacije, a spoljni faktori iniciraju ili pojačavaju aktivnost autoreaktivnih limfocita koji su uspeali da umaknu kontroli imunskog sistema (Rosenblum i sar, 2015) (Figura 1).

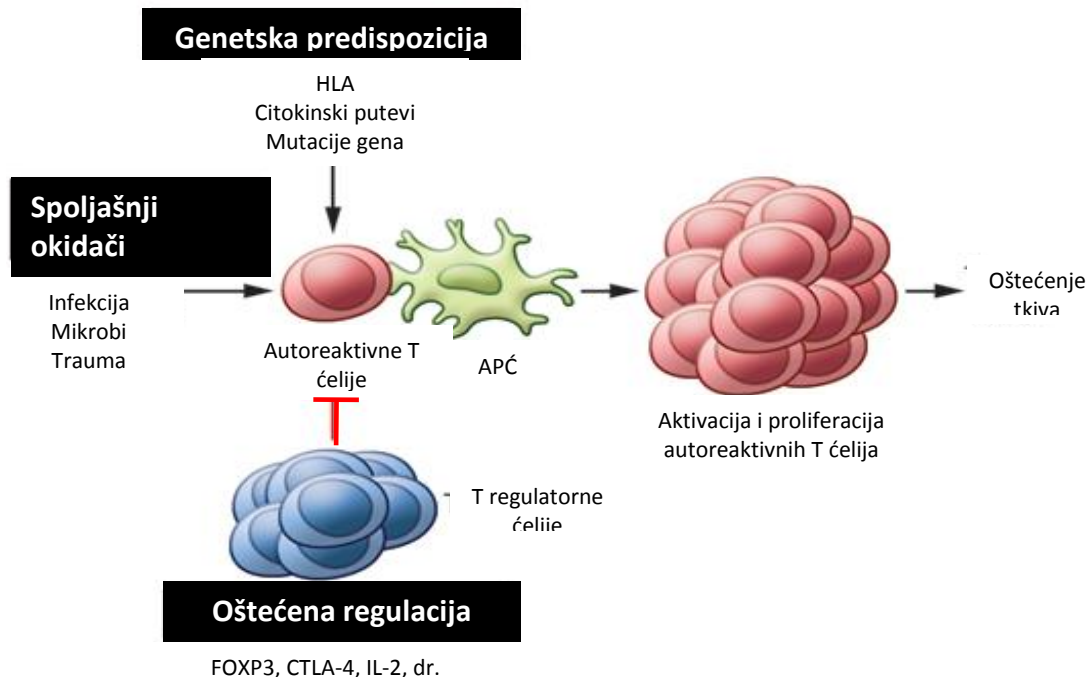


Figura 1. Faktori koji dovode do autoimunosti. HLA- grupa gena, APC- antigen prezentujuće ćelije (preuzeto i modifikovano prema Rosenblum i sar, 2015)

1.1.1 Genetski faktori

Studije (Silman i sar, 1993; MacGregor i sar, 2000) su pokazale da genetski faktori učestvuju u patogenezi reumatoidnog artritisa u oko 50-60% slučajeva, dok su kod ostalih u pitanju kombinacije genetskih i spoljnih faktora.

Danas su poznati brojni genetski faktori koji su u vezi sa reumatoidnim artritisom. Najznačajniji među njima su genski lokusi za HLA gene (HLA-DRB1, HLA-DPB1, HLA-B) koji imaju i najveći doprinos u razvoju ove bolesti. Ovi geni se nalaze na kratkom kraku šestog hromozoma i kodiraju proteine za beta lanac MHC molekula II klase koji učestvuju u prezentaciji antigena pomoćničkim CD4+ T ćelijama. Svakako najznačajniji polimorfizmi HLA-DRB1 su takozvani aleli „podeljenih epitopa“ („shared epitopes - SE“) *0401 i *0404 koji kodiraju visoko konzervirane sekvence aminokiselina unutar vezujućeg dela MHC molekula II klase. Ovi geni su prisutni kod pacijenata sa pozitivnim antitelima na citrulinisane peptide (ACPA) za koje se zna da spadaju u jedan od lošijih prognostičkih faktora u reumatoidnom artritisu (Klareskog i sar, 2006). Pored

spomenuta tri gena, tu su i brojni drugi „non-HLA“ lokusi kakvi su PTPN22, PADI4, CTLA4, PTPN2, STAT4, CD40, IL2, IL21, IL-6R, GATA3, CCR6, IL-2R, IL-7R, CD28 geni za koje je pokazano da imaju ulogu u patogenezi reumatoidnog artritisa, a koji kodiraju proteine koji učestvuju u aktivaciji i međučelijskoj signalizaciji T ćelija (Plenge i Pettersson, 2007; Martínez i sar, 2008; Raychaudhuri i sar, 2008; Barton i sar, 2009; Orozco i sar, 2009; Cobb i sar, 2013). Važnu ulogu u patogenezi ima gen za tirozin fosfatazu PTPN22 na hromozomu 1. Misens (missense) supstitucija nukleotida citozina u timin (C-u-T) na poziciji 1856 dovodi do zamene triptofana za arginin u rezidui 620 proteina koji je produkt ovog gena. Rezultat je pojačana aktivacija T ćelijskog receptora tokom selekcije klonova u timusu koja dozvoljava da autoreaktivne T ćelije izbegnu klonalnu deleciju u timusu, stvarajući tako predispoziciju za autoimunost.

Pored ovih gena, novija istraživanja su otkrila i genetske varijante važnih inflamatornih molekula, citokina i njihovih receptora kakvi su IL-15, receptor za IL4, receptor za IL2, GZMB, Dkk-1, MMP-9, MMP-3, OPG, PTGER4, TRAF1/C5, rs2833522 SNP (single nucleotid polymorphism), a koji su povezani sa radiografskom progresijom i destrukcijom zglobova kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom (Goulielmos i sar, 2016). Genski lokus rs12617656 SNP u intronu gena za enzim dipeptidil peptidazu IV koji ima važnu funkciju u aktivaciji T ćelija, takodje je povezan sa reumatoidnim artritismom.

Pored samih gena, ulogu u patogenezi su pokazale i interakcije između gena. Kao važna interakcija izdvaja se ona između HLA-DRB1 i PTPN22 gena. Smatra se da ova kombinacija vodi razvoju ACPA+ reumatoidnog artritisa, ali se ne javlja kod ACPA-pacijenata koji boluju od ove bolesti (Kallberg i sar, 2007).

1.1.2 Spoljni faktori

Brojni spoljašnji faktori su povezivani sa reumatoidnim artritismom. Pušenje je svakako najispitivaniji spoljašnji faktor za koji se pokazalo da ima učešća u patogenezi ove bolesti kod genetski predisponiranih osoba. Rizik od razvoja reumatoidnog artritisa je dozna zavistan i povećava se sa intenzitetom (Heliövaara i sar, 1993) i trajanjem pušenja (Stolt i sar, 2003; Costenbader i sar, 2006). Meta analiza Taylor-a i sar. (Taylor i sar, 2013) pokazala je da osobe sa polimorfizmom PTPN22 alela koje puše imaju veći rizik za

pojavu ACPA antitela u krvi, a pušači nosioci gena podeljenih epitopa („shared epitopes“) imaju veći rizik od pojave tri autoantitela u reumatoidnom artritisu: reumatoidnog faktora, ACPA i antitela na karbamilisane proteine u krvi (Gan i sar, 2015). Tačan mehanizam po kome pušenje utiče na pojavu reumatoidnog artritisa još uvek nije razjašnjen. Nekoliko hipoteza o uticaju duvana u patogenezi ove bolesti je predloženo (Harel-Meir i sar, 2007; Onozaki 2009; Ruiz-Esquide i Sanmarti, 2012), ali se smatra da duvanski dim preko slobodnih radikala pospešuje oksidativni stres, zatim utiče na apoptozu ćelija, utiče na citrulinaciju proteina pri čemu nastaju ACPA antitela, pa čak utiče i na metilaciju DNK (Chang i sar, 2014).

Uloga mikroorganizama u reumatoidnom artritisu ostaje nerazjašnjena. Ne može se sa sigurnošću reći da je neki mikroorganizam pokretač autoimunske reakcije u ovoj bolesti. Više mikroorganizama se dovodi u vezu sa reumatoidnim artritisom (Tobón i sar, 2010), tabela 1.

Tabela 1. Infektivni agensi koji mogu biti okidači reumatoidnog artritisa.

Humani parvovirus B19	Borelia burgdorferi	Epstein-Barr virus
Rubella virus	Mycoplasma	Hepatitis B virus
Human Retrovirus 5	Mycobacterium tuberculosis	Proteus mirabilis
Alphavirus	Escherichia coli	Porphyromonas gingivalis

Virusna DNK humanog parvovirusa B19 pronadjena je u sinovijskoj tečnosti i samoj sinoviji pacijenata sa reumatoidnim artritisom. Zapaženi su i visoki titri antitela na EBV u serumu ovih pacijenata (Tobón i sar, 2010). Novija istraživanja povezuju reumatoidni artritis sa parodontopatijom i oralnim infekcijama bakterijom *Porphyromonas gingivalis* (Mikuls i sar, 2014). Ova bakterija poseduje enzim peptidil arginin deiminazu koja vrši citrulinaciju peptida i tako započinje krug stvaranja antitela na citrulisane peptide

(ACPA) (Farquharson i sar, 2012). Pored toga, indukuje i hroničnu inflamaciju i erozivnu destrukciju periodontalne kosti (Rosenstein i sar, 2004).

Više studija ispitivalo je uticaj kofeina kao jedan od mogućih faktora koji utiču na pojavu reumatoidnog artritisa, mada su rezultati diskrepantni (Heliövaara i sar, 2000; Mikuls i sar, 2002; Karlson i sar, 2003). Ipak, pokazano je da velike doze kofeina (preko 10 šolja kafa dnevno) mogu predstavljati povišen rizik za pojavu reumatoidnog artritisa (Pedersen i sar, 2006).

Od spoljašnjih faktora koji se pominju kao mogući pokretači autoimunskog procesa u reumatoidnom artritisu spominju se mineralna ulja (motorno, hidraulično ulje, asfalt,...) (Sverdrup i sar, 2005), silicijum (Stolt i sar, 2010), zagadjivači vazduha (Hart i sar, 2009).

Razvoj reumatoidnog artritisa se povezuje i sa stresnim životnim situacijama. Molekularno objašnjenje za ovaj fenomen se naslućuje iz animalnih modela inflamacije koji pokazuju povezanost hipotalamus-hipofizno-adrenalne osovine i produkcije citokina (Capellino i sar, 2010).

Sve više pažnje se posvećuje ulozi crevne flore kao mogućeg pokretača inflamatornog procesa u patogenezi reumatoidnog artritisa i ishrane (dijete) kao modulatora crevne flore (Vieira i sar, 2014).

Pored opisanih genetskih i spoljnih faktora, smatra se i da starost, pol, prisustvo ženskih hormona, socio-ekonomski status i etnička pripadnost mogu imati ulogu u patogenezi reumatoidnog artritisa (Tobón i sar, 2010).

1.2 Patogeneza reumatoidnog artritisa

Perzistentni sinovitis, sistemska inflamacija i prisustvo nekoliko vrsta auto antitela su glavne karakteristike reumatoidnog artritisa. Reumatoidni faktor, antitela na citrulisane peptide (ACPA), anti-keratinska antitela, kao i antitela na karbamilisane proteine mogu se otkriti u serumu pacijenata sa reumatoidnim artritisom (Kroese i sar, 2014). Od toga, reumatoidni faktor i ACPA antitela su svrstani među klasifikacione kriterijume koji pomažu u postavljanju dijagnoze reumatoidnog artritisa.

Smatra se da u patogenezi ove bolesti složena interakcija između genetskih i spoljnih faktora dovodi do aktivacije urođenog i stečenog imunskog sistema, te do sinovitisa, destrukcije kosti i sistemske inflamacije. Patološka aktivacija imunskog sistema ili „imunološki početak bolesti“ javlja se godinama pre „kliničkog početka bolesti“. Imunološki početak se karakteriše asimptomatskom, tj. prekliničkom fazom bolesti tokom koje se u krvi obolelih mogu detektovati auto-antitela, ali i povišene koncentracije različitih pokazatelja upale (citokina, hemokina, C reaktivnog proteina) (Sokolove i sar, 2012; Hughes-Austin i sar, 2013). Pored toga, sinovitis se u ovoj fazi bolesti histološki može dokazati u klinički asimptomatskim zglobovima (Vossenaar i sar, 2004). Prisustvo perioda asimptomatske aktivacije imunskog sistema dugo pre pojave kliničkih simptoma upućuje na to da klinički manifestovana bolest predstavlja već hroničnu fazu bolesti i da se podsticaj za nastanak autoimunske reakcije u reumatoidnom artritisu ne nalazi u zglobovima. Novija istraživanja pokazuju da bi autoimunost povezana sa reumatoidnim artritisom mogla poticati iz izmenjene funkcije sluznica – sluznice usta, probavnog sistema i/ili pluća (Demoruelle i sar, 2014). Pored toga, biopsija ingvinalnih limfnih čvorova kod pacijenata sa ranim reumatoidnim artritisom ukazuje na drugo mesto aktivacije T ćelija, ne na sinoviju (de Hair i sar, 2012). Smatra se da spoljašnji faktori u vidu stresora plućne (pušenje, silicijum) i drugih mukoznih barijera (crevna flora, parodontopatija) mogu izazvati postranslacione promene (kvantitativne i kvalitativne) u vidu citrulinacije mukoznih proteina putem enzima peptidil arginin deiminaze tip IV (PADI4) (McInnes i Schett, 2011). U genetski predisponiranih osoba, gubitak tolerancije na ovakve epitope započinje ACPA odgovor (Figura 2).

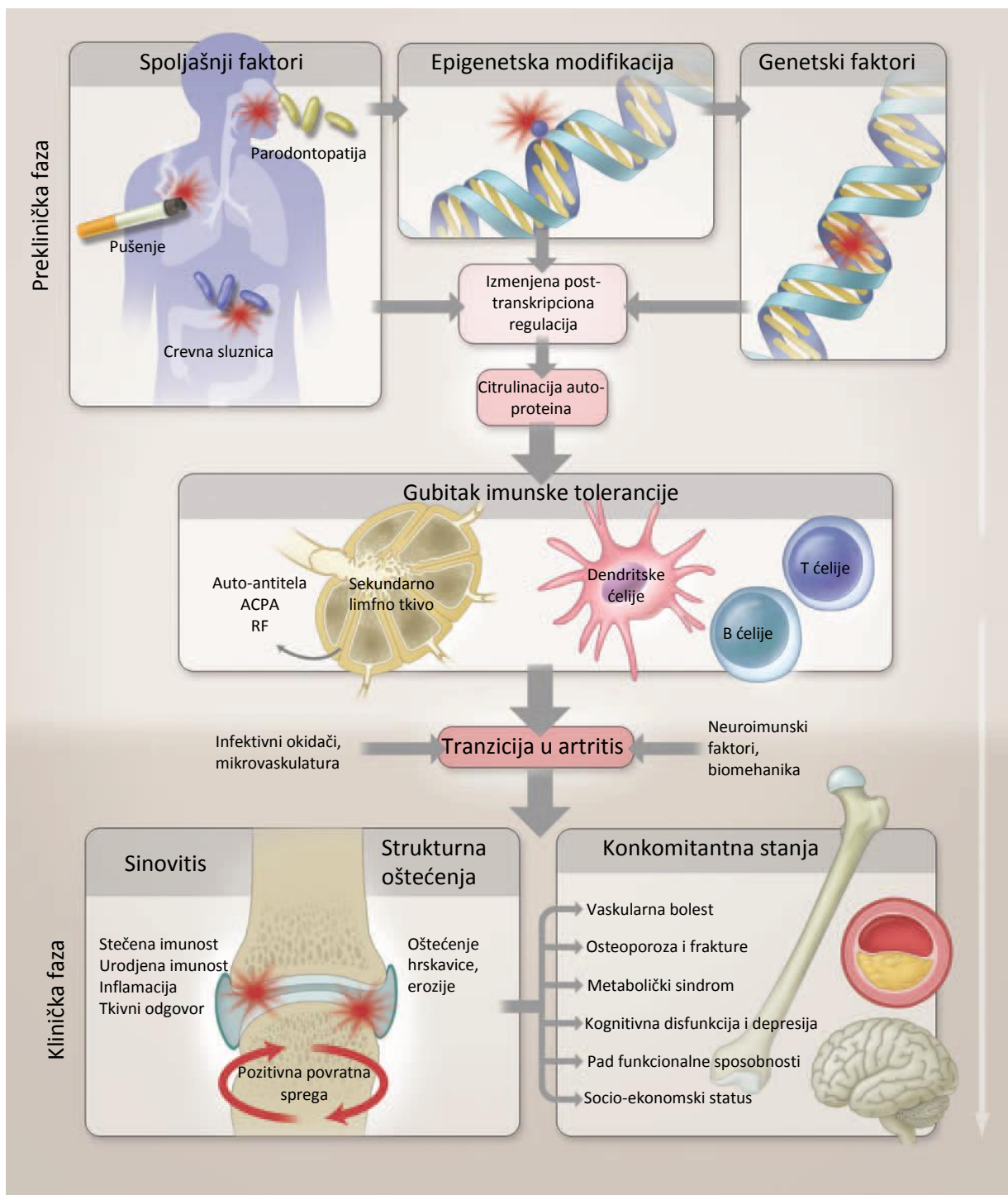


Figura 2. Patogeneza reumatoidnog artritisa (preuzeto i modifikovano iz McInnes i Schett, 2011)

1.2.1 Urođeni imunski sistem u reumatoidnom artritisu

Prirodne barijere i ćelije urođenog imunskog sistema kao što su makrofagi/monociti, dendritske ćelije i polimorfonuklearni leukociti čine prvu liniju odbrane i imaju važnu ulogu u održavanju mukoznog ekvilibrijuma (Abbas 2014). Različiti spoljašnji faktori (pušenje, bakterije, stres, trauma) mogu dovesti do poremećaja tog ekvilibrijuma, gde upravo ćelije urođene imunosti reaguju prve tako što dolazi do njihove aktivacije. Aktivirani makrofagi i dendritske ćelije luče proinflamatorne citokine (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-21, IL-23) i hemokine. Pored toga, makrofagi su i izvor kiseoničnih i azotnih radikala, produkuju prostanoide i enzime koji razgrađuju matriks, vrše fagocitozu i prezentuju antigene. Makrofagi pomoću površinskih receptora kakvi su *Toll-like Receptor*-i (TLR) i nukleotid vezujućih oligomerizacijskih domena (*nucleotid-binding oligomerization domain* - NOD) mogu prepoznati veoma veliki i različit spektar antigena, kako egzogenih (virusnih, bakterijskih) tako i mogućih endogenih (sopstvenih) antigena. Aktivacija makrofaga moguća je i putem citokina, zatim specifičnih interakcija sa T ćelijama, imunskim kompleksima, lipoproteinskim partikulama (McInnes i Schett, 2011). Neutrofili doprinose sinovitisu tako što oslobadjaju proteaze, reaktivne kiseonične radikale i prostaglandine. Dodatno, ove ćelije u mukozama oslobadjaju ekstracelularne zamke (eng. *Neutrophil Extracellular Traps* - NET) kada dolazi do oslobadjanja različitih produkata i antigena, a između ostalog i citrulisanih peptida (Khandpur i sar, 2013). Ove novonastale antigene, dendritske ćelije i makrofagi prezentuju ćelijama stečenog imunskog sistema kada dolazi do specifične aktivacije T i B ćelija.

Toll-like receptori (TLR) su površinski proteini na makrofagima, dendritskim ćelijama i mast ćelijama u mukozama koji imaju veoma važnu ulogu u prepoznavanju visoko konzerviranih sekvenci mikroorganizama (kakvi su npr lipopolisaharid-LPS, peptidoglikani, nemetilisani CpG motivi u DNK bakterija, jednolančanu i dvolančanu RNK virusa i dr.). Na monocitima, makrofagima i dendritskim ćelijama u reumatoidnom artritisu uočena je značajno veća ekspresija ovih receptora nego kod zdravih osoba (Gierut i sar, 2010). Ovi receptori su prisutni i na B limfocitima, te aktivacija ovih receptora nekim od antigena može rezultovati produkcijom antitela u niskom titru, niske specifičnosti, koja je nezavisna od T ćelija (Catrina i sar, 2016).

1.2.2 Stečeni imunski sistem u reumatoidnom artritisu

T pomoćnički (CD4+, eng. *helper*) limfociti čine više od 50% ćelija prisutnih u inflamiranoj sinoviji (Ankit Saxena i Raychaudhuri, 2014) i imaju ključnu ulogu u indukciji i efektorskoj fazi imunskog odgovora. Smatra se da je reumatoidni artritis bolest Th1 tipa (posredovana Th1 limfocitima), međjutim novija istraživanja ukazuju na Th17 ćelije (Lubberts 2010), podgrupu helper limfocita koji proizvode IL-17, 21 i 22, TNF- α . Citokini TGF- β , IL-1, 6, 21 i 23 koje luče aktivirane dendritske ćelije i makrofagi čine milje koji podstiče diferencijaciju naivnih T-limfocita upravo u pravcu Th17 ćelija i deluju supresivno na T-regulatorne ćelije koje su važne za imunsku toleranciju. Na taj način dolazi do pomeranja T-ćelijske homeostaze u pravcu inflamacije. Zapaženo je da je funkcija T-regulatornih (Treg) ćelija u sinoviji pacijenata sa reumatoidnim artritisom smanjena, što se može objasniti time da prisustvo TNF- α blokira njihovu funkciju, ali i pospešuje diferencijaciju u korist Th17 ćelija (Nadkarni i sar, 2007). Th17 limfociti i IL-17 posreduju u indukciji IL-6 i IL-8 za koje se zna da podstiču inflamaciju u sinoviji i učestvuju u aktivaciji sinovijalnih fibroblasta i hondrocita.

Pored aktivacije T limfocita, dolazi i do aktivacije B limfocita koji se diferenciraju u plazma ćelije koje luče antitela. Veći broj antitela je zapažen u reumatoidnom artritisu: reumatoidni faktor, antitela na citrulinisane peptide, antitela na karbamilisane peptide, antikeratinska antitela, antitela na kolagen tip II, antitela na glukozo 6-fosfat izomerazu. Istraživanja su pokazala da se pored nabrojenih, u krvi pacijenata sa reumatoidnim artritisom mogu detektovati i antitela na glijadin, proteine kravljeg mleka (α - i β -laktalbumin, kazein), na proteine iz svinjskog mesa, te na ovalbumin iz kokošijih jaja (Hvatum i sar, 2006). Posebna pažnja daje se IgG klasi auto-antitela i njihovom vezivanju za Fc γ receptore (Fc γ R). Kako su ovi receptori prisutni na površini različitih ćelija imunskog sistema, efekti ovog vezivanja su vrlo raznoliki i uključuju fagocitozu, prezentovanje antigena, destrukciju ćelija, ćelijsku aktivaciju, oslobađanje medijatora inflamacije.

Reumatoidni faktor (RF) je jedno od prvih detektovanih antitela u RA i zajedno sa antitelima na citrulinisane peptide predstavlja jedan od klasifikacionih kriterijuma za reumatoidni artritis. Ovo antitelo je imunoglobulin najčešće IgM klase, usmereno na Fc fragment sopstvenog IgG molekula, tj svrstava se u grupu anti-imunoglobulinskih

antitela. RF može biti i molekul IgG klase i tada je specifičan samo za reumatoidni artritis i povezuje se sa aktivnijim oblicima bolesti i težom kliničkom slikom. Pored ovih, zapažen je i RF u IgA klasi u vidu dimera. Reumatoidni faktor se vezuje za Fc fragment IgG molekula i formira imunski kompleks koji dovodi do aktivacije sistema komplementa klasičnim putem. Tako nastaje niz zapaljenjskih fenomena koji doprinose zapaljenju zgloba.

Antitela na citrulisane peptide (ACPA) se nalaze kod 60-80% pacijenata sa reumatoidnim artritisom i visoko su specifična za ovu bolest. Mogu se detektovati u vrlo ranoj, prekliničkoj fazi bolesti. Usmerena su protiv citrulisanih peptida kakvi su vimentin, filagrin, fibronektin, fibrinogen, ali i brojni drugi peptidi. Ovi peptidi nastaju procesom citrulinacije koji podrazumeva enzimsku konverziju (deiminaciju) peptida pomoću enzima peptidil arginil deiminaza (PAD). Proces citrulinacije se normalno javlja tokom inflamacije, apoptoze i keratinizacije. Međutim, kod nosioca alela za HLA-DRB1 sa tzv. „podeljenim epitopom“ (*shared epitope*) dolazi do olakšanog autoimunskog odgovora na citrulisane peptide, tj pokazano je da su ovi aleli faktori rizika za ACPA pozitivan reumatoidni artritis. Prisustvo ACPA ima prediktivni značaj i pacijenti sa ovim antitelima razvijaju teže radiografske promene (Bongi i sar, 2004).

1.2.3 Inflamacija u zglobovima

Oticanje zglobova je posledica zapaljenja koje se odigrava u sinoviji zglobova. Ovo zapaljenje se karakteriše nakupljanjem i infiltracijom aktiviranih imunskih ćelija u sinoviji: monocita, dendritskih ćelija, mast ćelija, Th1-limfocita, Th17-limfocita, B-ćelija, plazmablasta i plazma-ćelija. Formira se i veoma kompleksni citokinski milje u kome vodeću ulogu imaju TNF- α , IL-6 i verovatno granulocitno-monocitni faktor rasta (GM-CSF) (Feldmann i Maini, 2008), koji aktiviraju endotelne ćelije, sinovijske fibroblaste, hondrocite i osteoklaste. Posledica ove aktivacije su formiranje novih krvnih sudova, aktivacija matriksnih metaloproteinaza koje uništavaju hrskavicu, razvoj lokalne osteoporoze. Inflamacijom izmenjena sinovija sa hipertrofijom krvnih sudova i sinoviocita, nagomilavanjem imunsko-inflamacijskih ćelija iz krvi se pretvara u granulaciono tkivo poznato kao *panus*. Ovo tkivo nastaje na spoju sinovijskog tkiva, hrskavice i kosti i upravo tu pokazuje invazivne razgradjujuće efekte putem lučenja

matriksnih metaloproteinaza i obilja proinflammatoryh citokina. Kao rezultat nastaju oštećenja hrskavice i erozije na zglobnim okrajcima kostiju.

1.2.4 Sistemska inflamacija u reumatoidnom artritisu

Reumatoidni artritis se povezuje za povećanim rizikom za kardiovaskularne bolesti (oko 1.5 puta veći rizik nego kod zdravih osoba), uključujući infarkt miokarda, cerebrovaskularne događaje i popuštanje srca (Pieringer i Pichler, 2011) (Figura 3). Ovaj povećan rizik se ne objašnjava tradicionalnim faktorima rizika, upotrebom glukokortikoida ili nesteroidnih antiinflammatoryh lekova, genetskom predispozicijom, već se smatra da su inflamatorni mehanizmi koji uključuju citokine (IL-6 i TNF- α), reaktante akutne faze, imunske komplekse i izmenjene lipidne partikule (npr HDL bogat amiloidom A) ti koji povećavaju aktivaciju endotela i mogu destabilizovati ateromatozni plak. Dodatno, pokazano je da je vaskularni rizik povećan već u ranoj fazi bolesti, oslikavajući tako supkliničku inflamaciju u preartikularnoj fazi (Nielen i sar, 2004).

Citokini podstiču i insulinsku rezistenciju u mišićima i masnom tkivu što rezultuje „inflammatorym“ metaboličkim sindromom. Lipidni metabolizam je takodje povezan sa inflamacijom, pa su tako u serumu bolesnika sa reumatoidnim artritisom prisutni sniženi nivoi ukupnog HDL i LDL holesterola, mada je primećeno da postoji paradoksalni skok koncentracija ovih supstanci tokom efektivne terapije (Choy i Sattar, 2009).

Inflamacija u reumatoidnom artritisu utiče i na centralni nervni sistem (umor i smanjena kognitivna funkcija), jetru (povišene koncentracije reaktanata akutne faze i anemija hroničnih bolesti), pluća (inflammatoryna i fibrozna bolest), na egzokrine žlezde (sekundarni Sjögren sindrom), mišiće (sarkopenija) i kosti (osteoporoza).

Rizik od limfoma je povećan kod pacijenata sa reumatoidnim artritisom i povezan je sa aktivnošću inflammatoryne bolesti (Simon i sar, 2015). Klonalna selekcija B-ćelija, poremećena imunska kontrola usled loše funkcije regulatornih T-limfocita i loša funkcija prirodnih ćelija ubica (eng. *Natural-killer cells*, NK) su mogući mehanizmi za razvoj limfoma kod ovih bolesnika.

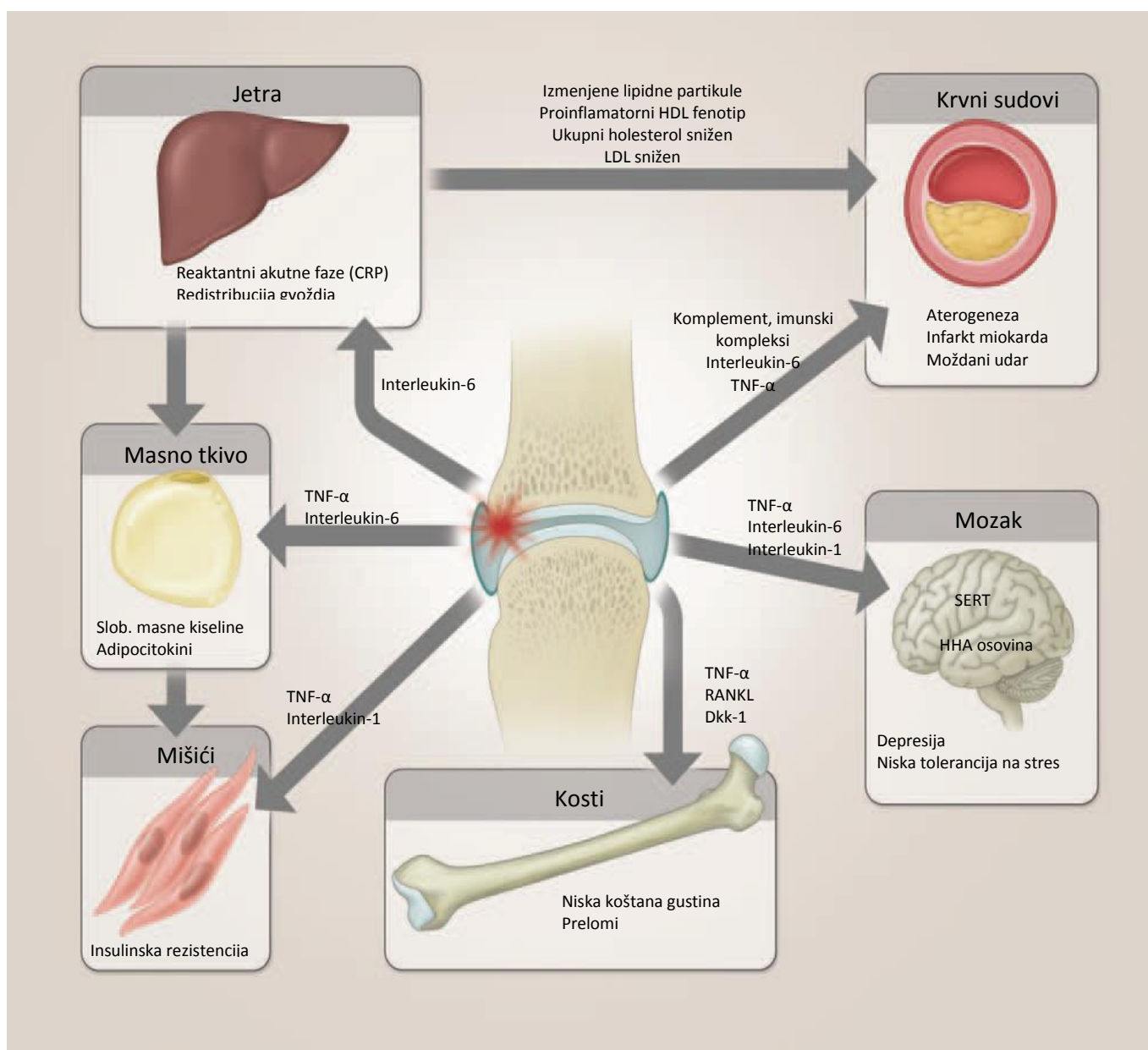


Figura 3. Sistemske manifestacije u reumatoidnom artritisu (preuzeto i modificovano prema McInnes i Schett, 2011)

Veća učestalost raka pluća je također zapažena kod pacijenata sa reumatoidnim artritisom i može se samo delimično objasniti povezanošću pušenja i reumatoidnog artritisa. Sama inflamacija, nezavisno od pušenja, predstavlja faktor rizika za rak pluća, verovatno zbog

dobro poznatih ekstraartikularnih efekata reumatoidnog artritisa na fibrozno remodelovanje intersticijuma pluća.

1.2.5 Uloga ishrane u patogenezi reumatoidnog artritisa

Oboleli od reumatoidnog artritisa često navode kako im određena hrana pogoršava simptome bolesti. Više ispitivanja je posvećeno dejstvu raznih restrikcioni dijeta na aktivnost reumatoidnog artritisa, uglavnom su to bile dijetete bez mesa i glutena (Kjeldsen-Kragh i sar, 1991; Nenonen i sar, 1998; Hafstrom i sar, 2001), bez alergena, aditiva, konzervativa i azo-boja (van de Laar i van der Korst, 1992), mediteranska dijeta (Sköldstam i sar, 2003). Ove studije su pratile mahom kliničke i laboratorijske pokazatelje bolesti tokom primene dijetete, sa veoma različitim rezultatima: kod nekih je došlo do poboljšanja samo subjektivnih tegoba pacijenata (Nenonen i sar, 1998), dok je kod drugih došlo i do povlačenja bolnih i otečenih zglobova i drugih kliničkih pokazatelja aktivnosti bolesti (Kjeldsen-Kragh i sar, 1991; van de Laar i van der Korst, 1992). Među prvim radovima koji su ispitivali prisustvo antitela na proteine iz hrane, našlo se istraživanje O'Farrelly-ja i saradnika (O'Farrelly i sar, 1988) koji su pokazali da u serumu obolelih od reumatoidnog artritisa mogu biti prisutna antitela na glijadin, sastojak glutena iz pšeničnog brašna. Ova antitela su uglavnom bila IgG i IgA klase, a antitela iz IgG klase su bila povezana sa atrofijom resica sluznice jejunuma. Pored antitela na glijadin, uočeni su i povišeni nivoi antitela na proteine iz svinjskog mesa, ovalbumin iz kokošijih jaja, kao i na proteine iz kravljeg mleka (α - i β - laktalbumin, kazein) (Hvatum i sar, 2006). Hafstrom je sa saradnicima (Hafstrom i sar, 2001) pokazao da vegetarijanska dijeta bez glutena može dovesti do smanjivanja nivoa anti-glijadinskih i antitela na β -laktalbumin uz ispunjavanje ACR20 kriterijuma za poboljšanje, naglašavajući tako moguću ulogu izmenjene funkcije sluznica u nastanku i razvoju reumatoidnog artritisa. Novije istraživanje Li-ja i saradnika (Li i sar, 2016) pokazalo je da je kod eksperimentalno izazvanog artritisa kod pacova povećano lučenje proinflammatoryh citokina TNF- α , IL-1, IL-6 i IL-17, uz značajno povišene vrednosti imunskih kompleksa i antitela na mleko i jaja, čime upućuju na povezanost između ishrane i patogeneze reumatoidnog artritisa. Iako se već dugo sumnja na ovu povezanost, istraživanja koja su ispitivala ovu temu nisu razjasnila direktni mehanizam i vezu između reumatoidnog artritisa i ishrane.

Pored humoralnog imunskog odgovora na proteine iz hrane, malo se zna o celularnom imunskom odgovoru na ove antigene kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom. Literatura o celularnom imunitetu u ovoj bolesti i imunoreaktivnosti na namirnice je veoma oskudna. Međutim, pokazano je da kod osoba koje su preosetljive na kravlje mleko, ovaj antigen (proteini iz kravljeg mleka) stimuliše proliferaciju limfocita i stvaranje TNF- α (Motrich i sar, 2003). Pored toga, kod obolelih od celijačne bolesti glijadin može da pokrene umnožavanje T limfocita i stvaranje IFN- γ , IL-2, IL-6 i IL-10 (O'Keefe i sar, 1999). Ovakav proinflamatorni citokinski milje i umnožavanje T limfocita su takođe prisutni u reumatoidnom artritisu, te bi se moglo pretpostaviti da antigeni iz hrane mogu izazvati isti efekat i kod pacijenata sa ovim oboljenjem.

Mogući patogenetski mehanizam i uloga ishrane u reumatoidnom artritisu može se pretpostaviti na osnovu već ispitivanih i razjašnjenih modela sličnih imunski posredovanih oboljenja u kojima se javljaju antitela na proteine iz hrane, kakva je celijačna bolest. U ovom oboljenju, ingestija glutena kod predisponiranih osoba nosioca HLA DQ2/DQ8 alela, dovodi do aktivacije T ćelijskog odgovora i posledičnog stvaranja anti-glijadinskih antitela i/ili antitela na tkivnu transaminazu 2 (Green i sar, 2015). Ono što je zajedničko za oba oboljenja je njihova povezanost sa HLA alelima – u celijakiji su to DQ2 i DQ8, u reumatoidnom artritisu su to DR podeljeni epitopi (Koning i sar, 2015). Dalje, obe bolesti u osnovi predstavljaju reakciju imunskog sistema na postranslaciono modifikovane proteine – deamidovani gluten u celijakiji, citrulisani vimentin, fibronektin, kolagen, α -enolaza u reumatoidnom artritisu (Sakkas i sar, 2014; Green i sar, 2015). Konačno, ključnu ulogu u patogenezi obe bolesti ima kooperacija između T i B ćelija (Koning 2015). Međutim, ono što idalje ostaje nepoznanica u reumatoidnom artritisu jeste priroda antigena koji pokreće T ćelijski odgovor, iako skorašnja istraživanja upućuju na sluznice pluća, probavnog trakta i usta (Brusca i sar, 2014), ali i na unakrsnu reaktivnost između mikrobnih i sopstvenih antigena kakav je vinkulin (van Heemst i sar, 2015), zbog prisutne identične zajedničke sekvence aminokiselina DERAA u epitopu koji prepoznaju T ćelije.

1.2.6 Uloga dipeptidil peptidaze IV u patogenezi reumatoidnog artritisa

Dipeptidil peptidaza IV (DPPIV/CD26; EC.3.4.14.5) je transmembranski glikoprotein tip 2 molekulske mase 110 kD, koji se može naći na površini epitelnih ćelija mnogih tkiva, na površini limfocita, monocita i makrofaga, ali i na endotelnim ćelijama krvnih sudova (Fox i sar, 1984; Ohnuma i sar, 2008). DPPIV je izgrađen od 766 aminokiselina, koji pripada serin proteaznoj familiji i poseduje citoplazmatski domen od 6 aminokiselina (Tanaka i sar, 1992), prikazan na Figuri 4.

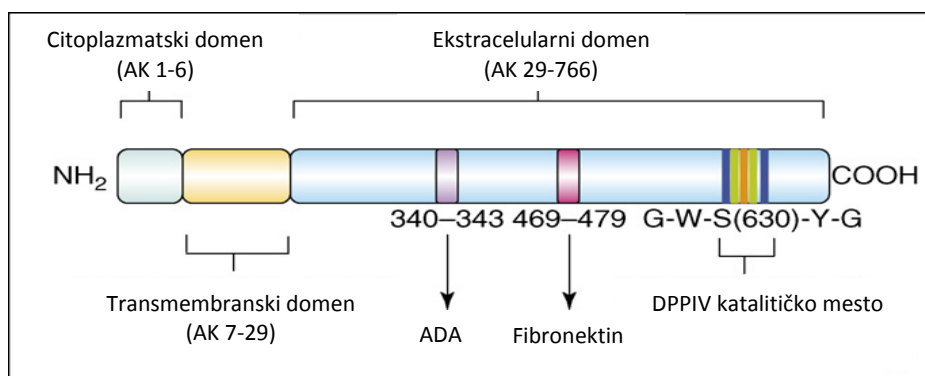


Figura 4. Šematski prikaz humanog DPPIV/CD26 molekula. ADA- adenzin deaminaza, Gly(G)-Trp(W)-Ser(S)630-Tyr(Y)-Gly(G)- redosled aminokiselina (AK). Preuzeto i modifikovano od Ohnuma i sar, 2008.

DPPIV u svom ekstraćelijskom domenu ima serin proteaznu aktivnost koja vrši odsecanje dipeptida koji imaju L-alanin ili L-prolin na drugoj poziciji aminoterminalnog kraja lanca (Hosono i sar, 2003; Lambeir i sar, 2003). Na ovaj način DPPIV aktivira, inaktivira ili menja aktivnost svog supstrata, a to su različiti bioaktivni peptidi, mnogobrojni hemokini, integrini i neuropeptidi. Pokazano je da na ovaj način, modifikacijom hemokina od strane DPPIV, može doći do aktivacije neutrofila i makrofaga, kao i do privlačenja pomoćničkih T-limfocita na mesto modifikacije (Boonacker i Van Noorden, 2003). Pored toga, DPPIV svojom enzimskom aktivnošću obeležava proteine za proteolitičku degradaciju, a može i da stupi u interakciju sa proteinima kakvi su kolagen, fibronektin, ekstracelularne matriksne proteaze, adenzin deaminaza, hemokinski receptor CXCR4, plazminogen tip 2 i drugi (Cordero i sar, 2009). U ovoj interakciji sa proteinima ekstraćelijskog matriksa, kolagenom i fibronektinom, DPPIV se ponaša kao funkcionalni receptor i ima sposobnost da ih razgrađuje, te tako olakša prolazak ćelija kroz ekstraćelijski matriks. Interakcija sa

kolagenom se zapravo odigrava preko regiona DPPIV koji nema katalitičku funkciju, ali je bogat cisteinom (Löster i sar, 1995). Havre i saradnici (Havre i sar, 2008) su pokazali da je interakcija fibronektina i DPPIV od velike važnosti za adheziju ćelija. Veoma dobro je ispitana uloga ovog enzima u metabolizmu šećera, a inhibitori ovog enzima koriste se u lečenju diabetes mellitusa tip 2 (Röhrborn i sar, 2015).

Poznata su dva oblika ovog enzima: postoji kao solubilna forma, ali javlja se i kao površinski receptor na različitim ćelijama u organizmu (endotelne ćelije, limfociti, monociti, makrofagi i druge).

Solubilna forma CD26 se može naći u serumu, plazmi, sinovijalnoj tečnosti, urinu i cerebrospinalnoj tečnosti, te kao takva ne sadrži intraćelijski i transmembranski domen (Durinx i sar, 2000; Yu i sar, 2011). Smatra se da su glavni izvor solubilne forme DPPIV hepatociti i limfociti (Iwaki-Egawa i sar, 1998; Gorrell i sar, 2001). Pokazano je da se solubilna forma CD26 procesom proteolitičkog odsecanja odvaja sa površine ćelija koje eksprimiraju CD26 i koje su u kontaktu sa krvlju (Cordero i sar, 2009). Do sada su identifikovane tri biološke funkcije ove forme enzima: uloga u aktivaciji, odnosno deaktivaciji određenih hemokina (Metzemaekers i sar, 2016) i u autoimunskim procesima (Hosono i sar, 2003), uloga u inaktivaciji biološki aktivnih supstrata u krvi kao što su faktori rasta ili hormoni (Drucker i Nauck, 2006; Baggio i Drucker, 2007), uloga u ćelijskoj adheziji koja ima značajnu ulogu tokom neoplastične transformacije (Martín i sar, 1995; Hashikawa i sar, 2004). Pokazano je da se povišen nivo solubilnog CD26 javlja kod infektivnih i inflamatornih bolesti, bolesti jetre i nekih tipova hematoloških maligniteta, dok je nizak nivo uočen u bolestima sa oslabljenim imunskim sistemom, uključujući pojedine hematološke i solidne malignitete (Cordero i sar, 2009).

Kao površinski oblik, CD26 je receptor za adenozin deaminazu (ADA), a interaguje i sa transmembranskom tirozin fosfatazom CD45, hemokinskim receptorom CXCR4, manoza-6-fosfat/insulinu sličan faktor rasta II receptorom (M6P/IGFIIR), fibroblast aktivacionim proteinom - alfa (FAP- α) i plazminogenom-2 (Pg2) (Havre i sar, 2008).

Jedna od važnijih uloga DPPIV enzima jeste aktivacija T ćelija i imunska regulacija koja se ostvaruje putem direktnog vezivanja CD26 za enzim adenozin deaminazu (ADA) koja ima glavnu ulogu u metabolizmu purina, ali i u aktivaciji ćelija imunskog sistema. Ovo direktno vezivanje površinskog ADA i CD26 molekula dovodi do deaminacije

ekstracelularnog adenzina i 2'-deoksiadenozina do inozina i 2'-deoksiinozina što rezultuje aktivacijom T ćelija (Hosono i sar, 2003). ADA je prisutan u citosolu svih ćelija sisara, ali se može uočiti i na površini B- i T-limfocita. Ekspresija ADA na površini T i B limfocita povećana je kod aktiviranih ćelija (Boonacker i Van Noorden, 2003). Adenzin i deoksiadenozin su snažni inhibitori T i B limfocita, te kod nedostatka ADA enzima dolazi do pojave snažne imunodeficijencije (Pro i Dang, 2004). S druge strane, ćelije koje na svojoj površini imaju kompleks ADA-CD26 mogu da redukuju lokalnu koncentraciju adenzina i tako pokažu veću otpornost na inhibiciju posredovanu adenzinom. Dakle, ADA je u interakciji sa CD26 uključena u regulaciju imunskog odgovora (Dong i sar, 1997; Boonacker i Van Noorden, 2003).

CD26 ima kostimulatornu ulogu pri interakciji sa CD45 tirozin fosfatazom, receptorom na T limfocitima koji ima ključnu ulogu u sprovođenju signala sa površine ćelije (Ohnuma i sar, 2008). CD45 tirozin fosfataza je na površini limfocita neaktivna u formi dimera, a CD26 dovodi do povećanja aktivnosti ove fosfataze indukovanjem monomerizacije, pa na taj način stimuliše signalizaciju putem T ćelijskog receptora (engl. *T Cell Receptor*, TCR), odnosno TCR signalizaciju.

Drugi receptor koji može stupiti u interakciju sa CD26 je hemokin CXCR4. Kada dodje do formiranja CXCR4-CD26 kompleksa, on dalje vezuje drugi hemokin CXCL12 koji se još naziva i SDF-1 α (eng. *Stomal derived factor 1 alpha*). Ovaj hemokin pokazuje efekte na hematopoetske ćelije i ima funkciju hemoatraktanta, te indukuje antivirusnu aktivaciju limfocita (Broxmeyer i sar, 2016). Ovo vezivanje dovodi do internalizacije receptorskog kompleksa, menjajući tako aktivnost CXCL12 i utičući na aktivnost antivirusnih limfocita.

Vezivanje plazminogena 2 za CD26 je prvi put uočeno kod sinovijalnih fibroblasta u reumatoidnom artritisu (Gonzalez-Gronow i sar, 1994), a pokazano je da kod ćelija tumora prostate ovo vezivanje indukuje ekspresiju i sekreciju matriksne metaloproteinaze-9 (Gonzalez-Gronow i sar, 2001), što bi moglo objasniti invazivnost pojedinih malignih tumora (Havre i sar, 2008).

Još jedan molekul koji se vezuje za površinski CD26 i ima ulogu u aktivaciji T-ćelija je receptor za manoza 6-fosfat/insulinu sličan faktor rasta II (eng. *mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor*, M6P/IGFIIR), gde nakon vezivanja ova

dva molekula, dolazi do internalizacije CD26 i posledične CD26-posredovane aktivacije T ćelija (Hosono i sar, 2003). Interakcija CD26 sa M6P/IGFIIR ostvaruje se preko manoza-6-fosfatnih ostataka na molekulu CD26, i neophodna je za DPPIV posredovanu aktivaciju i migraciju T-limfocita koja je zavisna od enzimske aktivnosti DPPIV (Havre i sar, 2008).

Pored navedenih, pokazano je i da kaveolin-1 na površini antigen prezentujućih ćelija može da se veže za CD26. Između kaveolina-1 i CD26 na aktiviranim T ćelijama uspostavlja se direktna veza koja dovodi do pojačane ekspresije molekula CD86 na antigen prezentujućim ćelijama. Dalje, CD86 intereaguje sa CD28 molekulom na T ćelijama i indukuje njihovu aktivaciju (Ohnuma i sar, 2008).

DPPIV ima veoma značajnu ulogu u fiziologiji T-limfocita i spominje se kao pokretač umnožavanja T-limfocita i regulacije imunskog odgovora (Morimoto i Schlossman, 1998). Ekspresija CD26 povećana je nakon njihove aktivacije, pa je upravo ovaj molekul marker aktivacije T-limfocita, na prvom mestu memorijskih CD4+ T limfocita. Zapaženo je i da CD4+ limfociti kojima nedostaje CD26 nisu sposobni da se aktiviraju i obavljaju funkcije pomoćničkih ćelija, ali imaju sposobnost da odgovore na mitogene i aloantigene. Pored CD4+ limfocita, CD26 je prisutan i na površini aktiviranih CD8+ limfocita, kao kostimulatorni molekul učestvuje u T ćelijskoj signalnoj transdukciji (Pro i Dang, 2004), u indukciji proliferacije T ćelija i sekrecije limfokina posredovane CD3/TCR (Morimoto i Schlossman, 1998). Za proces T ćelijske stimulacije putem CD26 veoma je važna njena enzimaska aktivnost, pokazano je na *in vitro* modelima (Tanaka i sar, 1993).

Izmenjena aktivnost, koncentracija u serumu i ekspresija DPPIV na različitim ćelijama je uočena u velikom broju oboljenja uključujući maligne (Kajiyama i sar, 2003; Matić i sar, 2013), autoimunske i inflamatorne bolesti (Bank i sar, 2008). Brojne studije su pokazale da je nivo enzimske aktivnosti DPPIV u serumu povišen kod bolesnika sa osteoporozom (Gotoh i sar, 1988),olestazom (Perner i sar, 1999), karcinomom jetre (Kojima i sar, 1979), hepatitisom i drugim oboljenjima jetre (Lakatos i sar, 1999; Andrieu i sar, 2003), kao i kod bolesnika sa poremećajima ishrane kao što su anoreksija ili bulimija (Hildebrandt i sar, 1999). Snižena aktivnost DPPIV zapažena je kolorektalnom karcinomu (Ayude i sar, 2003-2004), sistemskom eritemskom lupusu (Kobayashi i sar, 2002; Cordero i sar, 2009) i sistemskoj sklerozi (Sinnathurai i Spencer, 2016). Takođe

nizak nivo aktivnosti DPPIV uočen je kod inflamatorne bolesti creva (Hildebrandt i sar, 2001), zdravih pušača (Van Der Velden i sar, 1999), zatim trudnica (Krepela i sar, 1983), osoba sa dijabetesom tipa II (Mannucci i sar, 2005), alkoholičara i osoba koje pate od depresije (Maes i sar, 1997; Maes i sar, 1999).

Uloga ovog enzima u patogenezi reumatoidnog artritisa nije u potpunosti razjašnjena. Ima mnogo radova koji su ispitivali promene u serumskoj aktivnosti, ekspresiji ili serumskoj koncentraciji ovog enzima u reumatoidnom artritisu. Pa tako je poznato da je kod bolesnika sa dugogodišnjim reumatoidnim artritisom, aktivnost DPPIV u serumu snižena (Cordero i sar, 2001), dok je ekspresija na perifernim T-ćelijama povišena (Ulusoy i sar, 2012). Značajno niža ekspresija i membranska aktivnost CD26 zabeležena je na mononuklearnim ćelijama sinovije i sinovijske tečnosti (Sromova i sar, 2010). Dodatno, inhibicija aktivnosti DPPIV vodi povećanom oštećenju hrskavice (Ospelt i sar, 2010; Herlihy i sar, 2015), što upućuje na to da DPPIV deluje kao protektivni faktor za zglobnu hrskavicu.

Najveći deo do sada publikovanih rezultata je ispitivao hronični reumatoidni artritis, a malo se zna o ulozi ovog enzima u patogenezi ranog reumatoidnog artritisa. Kako novija saznanja pokazuju, u ranom reumatoidnom artritisu ključnu ulogu imaju Th17 limfociti, IL-17 i IL-23 (Miossec i sar, 2009; Cascão i sar, 2010; McInnes i Schett, 2011), te u takvom drugačijem ćelijskom i citokinskom miljeu malo se zna o ulozi DPPIV u patogenezi ranog reumatoidnog artritisa.

1.3 Klinička slika reumatoidnog artritisa

Prve tegobe u vidu bolova i otoka sitnih zglobova šaka i stopala, kao i jutarnje ukočenosti najčešće se javljaju postepeno, tokom nekoliko nedelja, najčešće kod žena srednjeg životnog doba. Često se pre oticanja zglobova javlja i prodromalni period koji može trajati nedeljama i mesecima u vidu stalnog umora, malaksalosti, gubitka u telesnoj masi, subfebrilnosti. Pored ovakvog početka bolesti, redje se prvi znaci bolesti javljaju u vidu palindromskog reumatizma koji mesecima ili godinama prethodi početku hroničnog oboljenja. Bolest može početi i akutno sa zahvatanjem više zglobova, dok je akutni monoartikularni početak veoma redak. Tipično u reumatoidnom artritisu govorimo o

simetričnom poliartikularnom (više od 10 zglobova) zahvatanju zglobova. Često dominantna strana tela bude teže oštećena, a distalni interfalangealni zglobovi (DIP) nikada nisu zahvaćeni inflamatornim procesom u reumatoidnom artritisu. U početku bolesti može nedostajati simetričnost zahvatanja, a ista se može uočiti i kod hemiparetičnih bolesnika, kod kojih paretična strana obično bude manje zahvaćena. Mada svaki sinovijski zglob može biti pogodjen reumatoidnim artritisom, najčešće zahvaćeni zglobovi su na prstima šaka – metakarpofalangealni i proksimalni interfalangealni (40%), stopala (20%), ramena (20%) i ručja (15%), skočni zglobovi, kolena, kukovi, laktovi (Stupar 2000).

1.3.1 Zglobne promene

Zglobne manifestacije se mogu podeliti u dve grupe: reverzibilne simptome i znake i ireverzibilna strukturna oštećenja.

U reverzibilne promene spada jutarnja ukočenost i znaci sinovijske inflamacije. Jutarnja ukočenost je važan simptom koji nastaje zbog sinovijske inflamacije. Izazvana je edemom sinovije i periartikularnih struktura, a delimično i redistribucijom intersticijske tečnosti tokom spavanja. Zavisi od dužine imobilizacije (nakon dužeg mirovanja zglobova) i pokazuje cirkadijalni ritam – najizraženija je ujutru. Ukočenost u reumatoidnom artritisu je dugotrajna, obično traje duže od dva sata i pri pregledu se manifestuje ograničenjem pokreta zglobova koji variraju tokom dana (za razliku od fiksirane ograničenosti pokreta koja može biti uzrokovana ankilozom ili oštećenjem okolozglobnih struktura).

Inflamacija sinovije se klinički ispoljava bolom, ali i znacima kao što su crvenilo, otok i toplota u zahvaćenom zglobu. Ovakva klinička slika se najčešće sreće u ranom stadijumu bolesti. Kako bolest prelazi u hronični stadijum, tako se i menjaju klinički znaci. Vremenom dolazi do smanjenja vaskularizacije sinovije i zamene granulacionim i fibroznim tkivom, pa su tako crvenilo, toplota i otok zglobova sve manje izraženi, te se kod dugogodišnjih bolesnika zapaža fenomen „isušenog RA“.

Ireverzibilne promene u vidu gubitka hrskavice i erozija periartikularne kosti su strukturalne promene karakteristične za reumatoidni artritis. Kao posledica ovih

ireverzibilnih promena dolazi do anatomskih oštećenja zgloba i funkcijske nesposobnosti. Procena oštećenja zgloba vrši se nekom od vizuelizacionih tehnika kakve su radiografije zglobova, ultrasonografski pregled i pregled magnetnom rezonancom.

1.3.2 Sistemske manifestacije reumatoidnog artritisa

Sistemske manifestacije su značajni, integralni i čest deo reumatološkog patološkog procesa. Javljaju se u oko 40% bolesnika sa reumatoidnim artritismom i tada su povezane sa tri puta većim mortalitetom u odnosu na bolesnike bez ovih manifestacija. U osnovi sistemskih manifestacija stoje imunski fenomeni i može biti zahvaćen skoro svaki od organskih sistema, tabela 2.

Tabela 2. Sistemske manifestacije reumatoidnog artritisa

Hematološke	Okularne	Neurološke
Anemija	kseroftalmija	kompresivne neuropatije
neutrofilija	skleritis	mononeuritis multiplex
trombocitoza	episkleritis	periferne neuropatije
Felty-jev sindrom		
Kutane	Kardiološke	Ostale
reumatoidni čvorići	perikarditis	suvoća ustiju
periferni vaskulitis	koronarni vaskulitis	osteoporoza
ulkusi potkolenica		atrofija mišića
alopecija	Plućne	
	intersticijalna fibroza	
	obliterišući bronhiolitis	

1.3.2.1 Reumatoidni čvorići

Čvorići su histološki karakteristična manifestacija bolesti i ima ih oko 25% bolesnika (Tehirian i Bathon, 2008). Javljaju se obično na mestima pritiska (laktovima, Ahilovim tetivama, prstima) i skoro isključivo kod seropozitivnih pacijenata. Histološki izgled reumatoidnih čvorića pokazuje centralnu zonu nekroze sa palisadno poredjanim

fibroblastima, histiocitima i makrofagima koji stvaraju kolagenaze i proteaze čime se objašnjava pojava zone centralne nekroze. Razlikuju se površni i duboki čvorići. Nodulusi su najčešće potkožni, ali mogu se naći i subperiostno, u koži, tetivama, burzama, kao i u unutrašnjim organima. Obično su bezbolni, ali mogu egzulcerisati kod nepokretnih bolesnika i stvarati hronične fistule. Mogu dovesti i do oštećenja funkcije ako su lokalizovani u tetivnim omotačima ili unutrašnjim organima. Nije uočena povezanost između aktivnosti artritisa i pojave čvorića.

1.3.2.2 Reumatoidni vaskulitis

Manifestacije reumatoidnog vaskulitisa su veoma raznolike i zavise od veličine zahvaćenog krvnog suda. Vaskulitis kapilara se klinički ispoljava kao tačkasta hemoragija u rubu nokatne ploče. Ukoliko se radi o leukocitoklastičkom vaskulitisu postoji palpabilna purpura, a ako su zahvaćene veće arterije mogu nastati i bolne kožne ulceracije. U patogenezi ovog vaskulitisa najverovatnije stoje imunski kompleksi sa IgG i IgM reumatoidnim faktorom. Kao i kod nodulusa, ni aktivnost vaskulitisa nije povezana sa aktivnošću sinovitisa.

1.3.2.3 Specifične promene u organima

Perikarditis je najčešća srčana sistemska manifestacija reumatoidnog artritisa, incidencija se kreće od 1-20%. Može se naći u bilo kom stadijumu bolesti, a naročito u ranom, kada može biti i početna manifestacija bolesti. Patohistološke promene u perikardu pokazuju različite stepene inflamacije, slične onim u sinoviji: proliferacija seroznih ćelija sa intenzivnom infiltracijom limfocita i plazma ćelija. Ishod akutnog reumatskog perikarditisa je povoljan i uspešno se leči primenom glukokortikoida. U okviru endokarditisa, najčešće se radi o zahvaćenosti aortnih valvula, tj o nespecifičnom valvulitisu koji može biti asimptomatski, ali i regurgitacijski, veoma retko dolazi do stenozе valvula. Miokarditis je veoma redak, a vidjena je i fokalna miokardna fibroza.

Zahvatanje pluća je takodje jedna od češćih sistemskih manifestacija reumatske bolesti. Pleuritis se sreće kod seropozitivnih bolesnika, često u nodulusnom reumatoidnom artritisu. Može se javiti u bilo kojem stadijumu RA i često je asimptomatski. Kada se

klinički ispolji, može biti i prva manifestacija ove bolesti. Kao plućna manifestacija, može se javiti Kaplanov sindrom koji se definiše prisustvom plućnih čvorića kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom i pneumokoniozom. Sindrom je uslovljen izmenjenim tkivnim odgovorom na inhaliranu prašinu koja predstavlja antigeni stimulus za respiratornu sluzokožu. Pored navedenih, opisane su i difuzna intersticijska fibroza i obliterativni bronhiolitis.

Neuromuskularne manifestacije su česte i mogu biti posledica nestabilnosti vratne kičme, kompresije perifernih nerava i vaskulitisa. Kompresivne neuropatije nervusa medijanusa u karpalnom tunelu, nervusa ulnarisa u Guyonovom kanalu, nervusa tibialis posterior u tarzalnom kanalu se najčešće vidjaju kod RA bolesnika. Mononeuritis multiplex nastaje iznenada, može zahvatati nekoliko perzistentnih, klinički nezavisnih perifernih mononeuropatija i posledica je reumatoidnog vaskulitisa.

Oštećenja bubrega su posledica amiloidoze, vaskulitisa, ali mogu biti izazvana i lekovima koji se koriste u lečenju reumatoidnog artritisa.

Splenomegalija, neutropenija i reumatoidni artritis su trijas karakterističan za Felty-ev sindrom. Pacijenti sa ovim sindromom u 80% slučajeva imaju pozitivna ANA antitela, 90% bolesnika ima pozitivan reuma faktor, a uočeno je prisustvo i krioglobulinskih imunskih kompleksa i relativna hipokomplementemija.

Očne manifestacije su retke, javljaju se episkleritis, skleritis koji je karakterističan za reumatoidni artritis i histološki ima nalaz tipičnog reumatoidnog čvorića, a može doći i do nekroze zahvaćene sklere, destrukcijom i ulceracijom čvorića kada se radi o *scleromalacia perforans*.

1.4 Dijagnoza reumatoidnog artritisa

Klinička slika pacijenta sa simetričnim poliartritisom lokalizovanim na šakama i stopalima, sa dugotrajnom jutarnjom ukočenošću, uz uočene povišene vrednosti C-reaktivnog protiena i ubrzanom sedimentacijom eritrocita upućuju na reumatoidni artritis. Nažalost, ovakva prezentacija bolesti nije specifična samo za ovu bolest, već bi trebalo razmotriti i druge mogućnosti (psorijazni, infektivni, reaktivni artritis, Lajmsku bolest, druge sistemske bolesti, degenerativna oboljenja zglobova). Zapravo, nema

dijagnostičkih kriterijuma za reumatoidni artritis. Koriste se klasifikacioni kriterijumi koji služe kao smernica za dijagnozu. Američko i evropsko društvo reumatologa (American College of Rheumatology ACR, European League against Rheumatism EULAR) su 2010. godine osmislili nove klasifikacione kriterijume koji se danas koriste u praksi (Aletaha i sar, 2010), prikazani u Tabeli 3. Kriterijumi obuhvataju 4 grupe: broj zahvaćenih zglobova, serološke analize, nivo reaktanata akutne faze i trajanje simptoma.

Tabela 3. Klasifikacioni kriterijumi u reumatoidnom artritisu

A. Zahvaćenost zglobova	
1 veliki zglob	0
2-10 velikih zglobova	1
1-3 mala zglova (sa ili bez zahvatanja velikih zglobova)	2
4-10 malih zglobova (sa ili bez zahvatanja velikih zglobova)	3
više od 10 zglobova	5
B. Serologija	
Negativan RF i negativna ACPA	0
nisko pozitivan RF ili nisko pozitivna ACPA	2
visoko pozitivan RF ili visoko pozitivna ACPA	3
C. Reaktanti akutne faze	
Normalan CRP i normalna SE	0
Abnormalan CRP ili abnormalna SE	1
D. Trajanje simptoma	
manje od 6 nedelja	0
više od 6 nedelja	1

Zbir od 6 ili više poena potvrđuje dijagnozu reumatoidnog artritisa.

1.5 Lečenje reumatoidnog artritisa

Lečenje bolesnika sa reumatoidnim artritismom je složeno i dugotrajno, često doživotno. Cilj terapije je zaustavljanje progresije bolesti i ireverzibilnih oštećenja zglobova. S

obzirom da inflamacija stoji u osnovi ovog oboljenja i ona je srž kliničkog ispoljavanja bolesti, njeno suzbijanje je osnovni cilj lečenja. Stoga, strategija lečenja zahteva dobro osmišljen pristup koji će kroz redovno praćenje aktivnosti bolesti i adaptaciju terapije omogućiti bolesniku kvalitetan i funkcionalan život i rad (princip „treat to target“) (Smolen i sar, 2016).

Za procenu aktivnosti bolesti koriste se različiti indeksi kakvi su kompozitni Disease Activity Score 28 (DAS28), Cincial Disease Activity Index (CDAI), Simplefied Disease Activity Index (SDAI). Skorovi aktivnosti bolesti se računaju na osnovu pokazatelja kakvi su broj bolnih zglobova, broj otečenih zglobova, procena aktivnosti bolesti od strane bolesnika, procena aktivnosti bolesti od strane lekara, vrednosti sedimentacije eritrocita, koncentracija C-reaktivnog proteina, prema tačno utvrđenoj formuli. Ovi indeksi mogu klasifikovati stanje aktivnosti bolesti u četiri grupe: visoka, umerena, niska aktivnost bolesti i remisija. Cilj lečenja je postići remisiju ili nisku aktivnost bolesti.

Pored aktivnosti bolesti, važno je proceniti i progresiju strukturnih promena na zglobovima. Lečenje reumatoidnog artritisa bi trebalo da prevenira ili zaustavi anatomske promene i time smanji ili povrati funkcionalnost bolesniku. Praćenje strukturnih promena se vrši pomoću radiografija, magnetne rezonance, ehosonografskim pregledima.

Savremeni način lečenja podrazumeva ranu dijagnozu i ranu agresivnu terapiju sa identifikacijom faktora dobre i loše prognoze. Dijagnoza reumatoidnog artritisa se postavlja prosečno posle 9 meseci trajanja bolesti (od 4 nedelje do 10 i više godina). S obzirom da se najveća i najčešća oštećenja zglobova javljaju rano u početku bolesti, ovo nameće neophodnost rane dijagnoze i brze i agresivne terapije radi supresije inflamacije pre definitivnog oštećenja zglobova. Lečenje se obavlja medikamentoznom terapijom, rehabilitacijom i hirurškim putem.

1.5.1 Medikamentozna terapija

Sledeće grupe lekova se koriste u terapiji reumatoidnog artritisa:

- a) Lekovi koji modifikuju tok bolesti (LMTB)
- b) Glikokortikoidi

- c) Simptomatska terapija: nesteroidni antiinflamatorni lekovi (NASIL) i paracetamol

1.5.1.1 Lekovi koji modifikuju tok bolesti (LMTB)

Lekovi iz ove grupe utiču na inflamaciju različitim mehanizmima i tako deluju i usporavaju patogenetske mehanizme bolesti. Mogu se podeliti u dve velike grupe:

- I. Sintetski LMTB (sLMTB) koji mogu biti
 - i. Konvencionalni sintetski LMTB
 - ii. Ciljani sintetski LMTB
- II. Biološki LMTB koji deluju visoko selektivno na specifične tipove ćelija i molekule citokina, glavne učesnike u imunskom odgovoru i imunski posredovanoj inflamaciji. Ovi lekovi prekidaju lanac imunskog procesa u fazi indukcije, a ne u njegovoj efektorskoj fazi.

1.5.1.1.1 Sintetski lekovi koji modifikuju tok bolesti

Najčešće korišćeni lekovi iz grupe konvencionalnih sLMBT su metotreksat, sulfasalazin, antimalarici, leflunomid, azatioprin. Ranije su korišćeni i soli zlata i D-penicilamin. Od ciljanih sLMTB koriste se inhibitori JAK kinaza kakav je tofacitinib.

Metotreksat je antagonist folne kiseline, koristi se unazad više od 30 godina i danas predstavlja „zlatni standard“ u lečenju reumatoidnog artritisa. On je prva linija, lek izbora, pri započinjanju lečenja ove bolesti. Osnovni mehanizam delovanja metotreksata je kompetitivna inhibicija enzima dihidrofolat reduktaze koja katalizuje pretvaranje folne i hidrofolne kiseline u tetrafolnu. Nedostatak redukovanih folata sprečava sintezu timidilata, inozinske kiseline i drugih purinskih metabolita, što prekida deobni ciklus ćelija u fazi G1. Dodatno, u toku intraćelijskog metabolizma metotreksata nastaju produkti koji pored dihidrofolat reduktaze, deluju inhibitorno i na druge enzime zavisne od folata (npr 5-aminoimidazol-karboksamid-ribonukleotid-transformilaza, AICAR transformilaza) koji su neophodni za sintezu purina. Kao rezultat, nastaje inhibicija funkcije neutrofila, monocita i limfocita. Antiinflamatorni efekti metotreksata uslovljeni

su i smanjenom produkcijom IL-1 i IL-6, normalizacijom smanjenih nivoa IL-2 i smanjenom sintezom reuma faktora. Ovaj lek se koristi jednom nedeljeno, može se dati oralno ili parenteralno. Najučestalije neželjene pojave javljaju se na gastrointestinalnom traktu, hematopoeznom sistemu, jetri i plućima. Kako bi se sprečile, obavlja se nadoknada folnom kiselinom 24h posle doze metotreksata, čime se postiže nepromenjena efikasnost, a broj neželjenih desjtava se smanjuje za 50%.

Sulfasalazin je kombinacija dve aktivne supstance: sulfapiridina i 5-aminosalicilne kiseline. Terapijski efekti sulfasalazina su višestruki: deluje na bakterijsku floru crevnog trakta (koristi se u lečenju inflamatorne bolesti creva), deluje na ćelije i njihove produkte koji učestvuju u procesu zapaljenja (inhibiše lipooksigenazu što smanjuje sintezu leukotrijena B₄, inhibiše ciklooksigenazni put metabolizma arahidonske kiseline, deluje inhibitorno na dihydrofolat reduktazu, ali u manjoj meri nego metotreksat) i ima imunomodulatorno dejstvo (inhibiše oslobadjanje IL-2 i IFN γ iz T ćelija, inhibiše oslobadjanje TNF- α , IL-1 i IL-6 iz aktivisanih makrofaga i sprečava aktivaciju B ćelija i sintezu imunoglobulina). Ovaj lek se primenjuje oralnim putem, najčešće neželjene pojave su gastrointestinalne prirode, glavobolja, vrtogalvica, temperatura, može izazvati citopenije, porast transaminaza, ali i sterilitet kod muškaraca jer smanjuje motilitet i broj spermatozoida.

Antimalarici (hlorokvin i hidrosihlorokvin) su lekovi čiji se imunomodulatorni efekat pripisuje hemijskoj strukturi diprotske baze. U neutralnoj sredini seruma diprotska baza ne ispoljava jonski naboj i slobodno prolazi kroz ćelijske membrane. Medjutim u kiseloj sredini kakve su vezikule lizozomnog sistema citoplazme makrofaga, limfocita, neutrofila i drugih, lek dobija pozitivni naboj i kao takav nije sposoban da izađe iz vezikule. Ovo vodi u dalje nagomilavanje leka i do porasta kiselosti što utiče na prolaz drugih molekula kroz membrane ćelija i menja njihovu ekspresiju na površini. Ovi lekovi se intenzivno nagomilavaju u tkivima, leukocitima i eritrocitima, ali i jetri i pigmentovanim tkivima. Efikasni su u lečenju bolesnika sa ranim, blagim do umerenim reumatoidnim artritismom, a mogu se davati i u kombinaciji sa drugim sLMTB.

Leflunomid je inhibitor *de novo* sinteze pirimidina putem inhibicije mitohondrijalnog enzima dihidroorotat dehidrogenaze (DHODH) što vodi do nemogućnosti ćelija da iz G1 faze predju u S fazu ciklusa. Ovo pogadja najviše ćelije koje se brzo dele, a pogotovo

limfocite. Leflunomid smanjuje aktivaciju i diferencijaciju B ćelija, produkciju antitela, ali deluje i na T ćelije, inhibišući njihovu proliferaciju i smanjuje lučenje inflamatornih citokina putem stimulacije antiinflamatornog TGF- β (Mehta i sar, 2009). Može se davati kao monoterapija, ali i u kombinaciji sa drugim LMTB. Gastrična nepodnošljivost, hepatotoksičnost, alopecija su retke neželjene pojave, češće kada se ovaj lek daje u kombinaciji.

Azatioprin je 6-merkaptopurin, analog hipoksantina, koji inhibicijom sinteze purinskih baza prečava sintezu DNK. Ovaj lek suprimira produkciju antitela, ćelijsku citotoksičnost zavisnu od antitela (ADCC), aktivnost NK ćelija i odgovor posredovan T limfocitima. Daje se oralnim putem, a komplikacije zbog toksičnog efekta na kostnu srž i mogućnost nastanka limfoma su retke komplikacije. Preporučuje se kod bolesnika koji imaju refraktarnost ili kontraindikaciju na druge LMTB.

Tofacitinib je inhibitor JAK3 kinaze, spada u grupu ciljanih sLMTB. Grupa enzima Janus kinaza obuhvata četiri člana, JAK1, JAK2, JAK3 i TYK2. JAK3 kinaza se nalazi na površini hematopoeznih ćelija i ima ključnu ulogu u signalnom putu za interleukine kakvi su IL-2, 3, 7, 9, 15 i 21 koji su važni za razvoj i preživljavanje limfocita. Tofacitinib je u kliničkim studijama pokazao veoma dobru efikasnost u lečenju reumatoidnog artritisa, uz retke neželjene događaje medju kojima se izdvajaju neutropenija, anemija, hiperholesterolemija, infekcije (Yamaoka 2016).

1.5.1.1.2 Biološki lekovi

Noviji lekovi u lečenju reumatoidnog artritisa koji su pokazali visoku efikasnost jesu biološki agensi koji deluju na razne komponente imunskog odgovora: neki ometaju antigensku prezentaciju blokadom MHC molekula, drugi se vezuju za specifične receptore na površini T limfocita i sprečavaju aktivaciju ćelija i interakciju sa drugim ćelijama, treći ometaju funkcije citokina vezivanjem za citokinske receptore. Ova biofarmaceutska sredstva obuhvataju monoklonska antitela i imunokonjugate. Aktuelno odobreni biološki lekovi u lečenju reumatoidnog artritisa se mogu svrstati u četiri grupe prema menahizmu desjtva:

- a. TNF inhibitori: etanercept, adalimumab, golimumab, certolizumab-pegol i infliksimab
- b. Inhibitori IL-6 receptora: tocilizumab
- c. Blokatori T ćelijske stimulacije: abatacept
- d. Depletori B ćelija: rituksimab

TNF inhibitori su grupa lekova koja specifično blokira efekte TNF- α koji je ključni medijator inflamacije u reumatoidnom artritisu. Etanercept je solubilni fuzioni protein koji se vezuje za solubilni TNF, neutrališući tako njegovu biološku aktivnost. Infliksimab je himerično monoklonsko antitelo koje se vezuje i za solubolnu i za površinsku formu TNF, dok je adalimumab humano monoklonsko antitelo sa sličnim karakteristikama vezivanja za TNF kao i infliksimab. Ovi lekovi su pokazali izuzetnu efikasnost u poredjenju sa sLMTB, ne samo u pogledu povlačenja simptoma i znakova bolesti, već i u usporavanju progresije strukturnih oštećenja zglobova. Etanercept, adalimumab i golimumab se daju potkožno, dok se infliksimab primenjuje u vidu intravenske infuzije. Neželjeni događaji su retki i obuhvataju reakcije na mestu davanja leka, infuzijske reakcije, ozbiljne infekcije i reaktivacije latentnih infekcija (tuberkuloza, herpes zoster), limfome, demijelinizirajuće bolesti i lekom izazvan sistemski eritemski lupus (Oliver i Claire, 2008).

Tocilizumab je humanizovano monoklonsko antitelo koje blokira IL-6 tako što se vezuje za njegov receptor na površini ćelija, a takodje se vezuje i za solubilnu formu IL-6R. Dobro je poznato da IL-6 ima važnu ulogu u regulaciji imunskog odgovora i inflamacije, hematopoezi, stimulaciji produkcije reaktanata akutne faze u jetri. Pored toga, ovaj citokin stimuliše adherenciju neutrofila, maturaciju i aktivaciju osteoklasta, sinovijalnu proliferaciju, što su sve važni elementi u formiranju sinovijskog panusa i destrukcije kosti koja je zapažena u reumatoidnom artritisu. Učestvuje u diferencijaciji T ćelija, uključujući Th17 limfocite i regulatorne T ćelije (Kasama i sar, 2016). Tocilizumab je veoma efikasan lek, daje se intravenski, kao monoterapija ili u kombinaciji sa metotreksatom. Zbog svog povoljnog delovanja na lipidni metabolizam, ovaj lek je posebno pogodan kod pacijenata sa aterosklerozom i kardiovaskularnim komorbiditetima. Najčešći neželjeni događaji koji se javljaju pri primeni ovog leka su respiratorne infekcije.

Abatacept je fuzioni protein koji se sastoji iz Fc fragmenta IgG imunoglobulina i ekstracelularnog domena molekula CTLA-4. Abatacept se vezuje za površinski CD80 molekul na membrani T ćelija i tako onemogućuje sekundarni kostimulatorni signal za njihovu aktivaciju. Može se primenjivati intravenski ili subkutano, a pogodan je kod pacijenata kod kojih primena sintetskih LMTB i TNF antagonista nije dala željene rezultate.

Rituksimab je himerično monoklonsko antitelo usmereno protiv površnog markera CD20 na B ćelijama. Fc fragment rituksimaba posreduje u ćelijskoj citotoksičnosti posredovanoj antitelima (ADCC), aktivaciji komplementa i apoptozi CD20 pozitivnih ćelija. Interesantno je da je od dostupnih anti CD20 agenasa, samo rituksimab efikasan u reumatoidnom artritisu. Ovaj lek se primenjuje intravenski, kao mono ili kombinacija sa drugim LMTB. Sigurnosni profil rituksimaba je sličan kao i kod drugih bioloških lekova koji se primenjuju intravenski.

1.5.1.2 Glikokortikoidi

Glikokortikoidi imaju snažno antiinflamatorno i imunosupresivno dejstvo, pri čemu ispoljavaju brz i dobar simptomatski efekat, ali dugotrajna primena ovih lekova je povezana sa ozbiljnim neželjenim događajima. Glikokortikoidne receptore poseduju gotovo sve ćelije, a njihova aktivacija podrazumeva kaskadu događaja koji rezultiraju povećanom ili smanjenom transkripcijom gena sa sledstvenom sintezom odgovarajućih funkcionalnih proteina. Ovi lekovi snažno utiču na T ćelije, pogotovo na pomoćničke T limfocite, zatim na nezrele B ćelije i NK ćelije. Snažni su inhibitori produkcije citokina IL-1, TNF- α , IFN γ . Terapijske doze izazivaju prolaznu limfocitopeniju, a povećavaju cirkulišući broj neutrofila. Visoke doze inhibišu proliferaciju fibroblasta, sintezu kolagena tip I i II, a deluju inhibitorno i na umnožavanje osteoblasta, uzrokujući tako osteoporozu. Gustina glikokortikoidnih receptora veća je u masnom tkivu omentuma, nego u potkožnom masnom tkivu, pa otuda i karakterističan tip gojaznosti kod primene ovih lekova. Deluju na metabolizam katabolitički, doprinoseći razvoju hiperglikemije u toku lečenja. Za kontrolu zglobnih manifestacija u reumatoidnom artritisu potrebne su male doze u kraćem vremenskom periodu sa brzim sniženjem doze do potpunog isključivanja. Vrlo su korisni u fazama pogoršanja bolesti, ali i tokom premošćenja

vremenskog perioda u kome LMTB još nisu ispoljili svoj efekat. Spektar neželjenih efekata je veliki i raznolik, te upotrebu ovih lekova treba pažljivo uzeti u obzir.

1.5.1.3 Simptomatska terapija

U svrhu kupiranja simptoma bolesti - bolova, otoka i jutarnje ukočenosti, koriste nesteroidni antiinflamatorni lekovi (NSAIL) i/ili paracetamol. Ovi lekovi ne zaustavljaju inflamaciju i oštećenje zglobova izazvano upalom, pa ne spadaju u grupu lekova koji modifikuju tok bolesti. Mogu se primenjivati periodično ili kontinuirano kroz duži vremenski period. Medjutim, zbog profila neželjenih efekata, ove lekove pažljivo treba davati bolesnicima.

1.5.2 Rehabilitacija

Rehabilitacija je važan deo lečenja bolesnika sa reumatoidnim artritismom jer značajno smanjuje funkcijsko oštećenje zglobova.

1.5.3 Hirurško lečenje

Specifični problemi u reumatoidnom artritisu koji bi mogli zahtevati hirurško lečenje su čvorići koji su izrazito bolni ili inflamirani. U Felty-jevom sindromu, splenektomija može pomoći pri rekurentnim infekcijama. Perikarditis može zahtevati perikardiocentezu zbog tamponade, a u retkim slučajevima perikardiektomija rešava konstriktivni perikarditis. Ortopedska hirurgija je od velikog značaja kod bolesnika sa trajnim i velikim oštećenjima zglobova: od resekcije ligamenata, dekompresije nerava, reparacije tetivnih ruptura, do totalne zglobne artroplastike.

2. CILJ RADA

Ovaj rad imao je za cilj da se:

1. Odredi sadržaj antitela klase IgA, IgG i IgM na glijadin i na ukupne proteine kravljeg mleka u krvi osoba sa ranim reumatoidnim artritismom;
2. Ispita da li postoji povećana ekspresija receptora za IgG (Fc γ RIII/CD16) na leukocitima i da li je povezana sa koncentracijom antitela specifičnih za pomenute proteine hrane;
3. Odredi proliferativni odgovor mononuklearnih ćelija periferne krvi na glijadin, proteine kravljeg mleka i fitohemaglutinin;
4. Odredi serumska aktivnost i ekspresija dipeptidil peptidaze 4 (DPPIV/CD26) na mononuklearnim ćelijama periferne krvi;
5. Ispita povezanost pokazatelja imunoreaktivnosti na proteine iz hrane sa pokazateljima aktivnosti bolesti;
6. Ispita povezanost pokazatelja aktivnosti i ekspresije DPPIV/CD26 sa parametrima aktivnosti bolesti.

3. BOLESNICI I METODE

3.1 Tip studije

Ispitivanje predstavlja studiju preseka u kojoj je ispitivano prisustvo specifičnih antitela na proteine iz hrane, proliferativni odgovor perifernih ćelija krvi na antigene iz hrane, kao i serumska aktivnost i ekspresija dipeptidil peptidaze IV kao mogućeg pokretača imunoreaktivnosti kod pacijenata sa ranim reumatoidnim artritismom čiji odgovor imunskog sistema nije bio modifikovan terapijom. Istraživanje je bilo sprovedeno u skladu sa Kodeksom dobre naučne prakse Medicinskog fakulteta u Beogradu, a odobreno od strane Etičkog odbora Instituta za reumatologiju i Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Istraživanja na ovom polju su deo projekta 175011 Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

3.2 Mesto i period istraživanja

Studija je sprovedena na Institutu za reumatologiju i Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije u Beogradu, u periodu od januara 2013. do decembra 2016.godine.

3.3 Izbor ispitanika

U ovom istraživanju učestvovalo je 120 ispitanika koji su bili podeljeni u tri grupe: studijsku grupu bolesnika sa ranim reumatoidnim artritismom (n=50), kontrolnu grupu bolesnika sa degenerativnim oboljenjima lokomotornog sistema (n=30) i kontrolnu grupu zdravih ispitanika (n=40). U studiji je učestvovalo i trideset pacijenata sa hroničnim, dugogodišnjim reumatoidnim artritismom, koji su uključeni kao dodatna kontrolna grupa za ispitivanje pokazatelja serumske aktivnosti i ekspresije dipeptidil peptidaze IV.

3.3.1 Uključujući i isključujući kriterijumi u istraživanju

U grupu pacijenata sa ranim reumatoidnim artritismom uključeno je 50 pacijenata oba pola, starosti 22-81 godinu, sa novopostavljenom dijagnozom reumatoidnog artritisa koji se

leče na Institutu za reumatologiju. Isključujući kriterijumi za ulazak u studiju za ove pacijente su bili:

- a) primena glikokortikoidne terapije i terapije bolest modifikujućim lekovima,
- b) postojanje strukturnih promena (erozija) na standardnim radiografijama šaka i stopala,
- c) postojanje neke od sistemskih bolesti vezivnog tkiva,
- d) oboleli od celijakije,
- e) nepristajanje pacijenta da učestvuje u studiji.

U kontrolnu grupu pacijenata sa degenerativnim reumatizmom ušlo je trideset pacijenata (starosti 21-81 godinu, 22 žene i 8 muškaraca) koji se leče na Institutu za reumatologiju (lumbalni i cervikalni sindrom, lumboišijalgija, cervikalgija, osteoartritis kolena, kukova, šaka...), uparenih po polu i starosti (+/- 3 godine) sa grupom pacijenata sa ranim reumatoidnim artritismom. Isključujući kriterijumi za ove osobe su bili:

- a) prisustvo reumatoidnog artritisa i drugih sistemskih bolesti vezivnog tkiva,
- b) prisustvo autoimunskih bolesti,
- c) prisustvo celijačne bolesti,
- d) nepristajanje pacijenta da učestvuje u studiji.

Kontrolnu grupu zdravih dobrovoljaca činilo je četrdeset osoba (starosti 23-62 godine, 26 žena i 14 muškaraca) zaposlenih na Institutu za reumatologiju i na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije, a kod kojih je isključeno prisustvo:

- a) reumatoidnog artritisa i drugih sistemskih bolesti vezivnog tkiva,
- b) metaboličkih i autoimunskih bolesti,
- c) celijačne bolesti,
- d) degenerativnih oboljenja kičme i zglobova,

- e) odbijanje učestvovanja u istraživanju.

Dodatnu, četvrtu grupu bolesnika sa hroničnim reumatoidnim artritismom činilo je 30 osoba, uparenih po polu i starosti (+/-3 godine) sa pacijentima sa ranim reumatoidnim artritismom. Isključujući kriterijumi za ove bolesnike su bili:

- a) trajanje reumatoidnog artritisa manje od 5 godina,
- b) prisustvo celijačne bolesti,
- c) nepristajanje pacijenta da učestvuje u studiji.

Dugogodišnji pacijenti sa reumatoidnim artritismom su bili lečeni različitim terapijskim režimima: njih 26-oro je koristilo metotreksat kao monoterapiju ili u kombinaciji sa drugim lekovima koji menjaju tok bolesti, biološkim agensom ili kortikosteroidnom terapijom, dvoje je lečeno anti-TNF agensima i dvoje su lečeni anti IL-6 terapijom.

3.4 Studijski protokol

Po postavljanju dijagnoze ranog reumatoidnog artritisa ili degenerativnog oboljenja, uz pisanu saglasnost svakog ispitanika, za uzorak za ispitivanje uzeto je 10ml krvi bez antikoagulansa i 10ml krvi sa 0.3ml heparina iz kubitalne vene pomoću vakutajnera. Uzorak se uzimao pre početka lečenja glukokortikoidima i/ili lekovima koji menjaju tok bolesti. Uzorci su analizirani u Laboratoriji za modifikatore biološkog odgovora Odeljenja za eksperimentalnu onkologiju Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije.

Aktivnost reumatoidnog artritisa procenjivana je kompozitnim indeksom DAS28 koji obuhvata broj bolnih i broj otečenih zglobova, bolesnikovu procenu aktivnosti bolesti i vrednost sedimentacije eritrocita. Pored demografskih karakteristika (pol, starost), pratila se i dužina trajanja tegoba, vrednost C reaktivnog proteina u krvi, prisustvo RF i ACPA antitela u krvi.

3.5 Metode

3.5.1 ELISA testovi za određivanje nivoa antitela IgA, IgG i IgM klase na glijadin i proteine kravljeg mleka

Odredjivanje serumske IgA, IgG i IgM imunoreaktivnosti na glijadin (frakcija glutena) i ukupne proteine kravljeg mleka vršilo se „Home-made“ ELISA testovima kako je opisano od strane Besu I i saradnika (Besu i sar, 2009).

Proteini kravljeg mleka (0,1mg/ml) se rastvaraju u 0.05M karbonatnom puferu pH 9.6, a glijadin (1mg/ml) u 1% rastvoru SDS-a, i ti se rastvori (po 100 μ L) nalivaju u otvore mikrotitar ploča sa 96 rupica (polistirenske mikrotitarske ploče sa 96 bunarića, F96 MaxiSorp Thermo Scientific™ Nunc™, Danska). Inkubacija ploča sa rastvorom proteina kravljeg mleka se vrši na +4C, a ploča sa rastvorom glijadina na sobnoj temperaturi. Nakon 24h inkubacije, ploča sa rastvorom proteina mleka se ispira TTBS puferom (0.05% Tween-20 u 20mM Tris-HCl, 500mM NaCl, pH 7.5) da bi se uklonio karbonat, pa se potom u sve otvore ploča (i mleko i glijadin) naliva 1% BSA (govedji serumski albumin, engl. *bovine serum albumin*, BSA) u TTBS-u u svojstvu blokera za blokiranje nespecifičnih mesta vezivanja i inkubira tokom 1h. Nakon toga, ploče se isperu 3 puta u rastvoru PBS-a (engl. *phosphate buffered saline*, PBS) sa 0,05% Tween 20 deterdžentom, pa se u svaku rupicu dodaje po 50 μ l 1% humanog seruma u 1% rastvoru BSA u TTBS-u i sve se inkubira 1h. Nakon inkubacije, ploče se ispiraju rastvorom TTBS-a tri puta, a potom se dodaju rastvori antihumanog ovčijeg IgA, IgG ili IgM, konjugovanog sa HRP (eng. *Horseradish peroxidase*, HRP). Po isteku 60min, ploče se ispiraju 5 puta rastvorom TTBS-a i dodaje se 100 μ L 0.7mg/ml ortofenildiamina u 0.15M citratnom puferu pH 5.5 sa 1 μ l/ml 12% H₂O₂. Razvoj boje se zaustavlja 15 minuta kasnije dodavanjem 50 μ l sumporne kiseline. Apsorbancija se očitava na talasnoj dužini od 450 nm na čitaču Multiskan EX Thermo Labsystems u roku od 15 minuta.

Izračunavanje nivoa imunoreaktivnosti za ispitivane antigene se vrši tako što se od srednje vrednosti apsorbance uzoraka (triplikat), u kojima je antigen prvo inkubiran sa albuminom govedjeg seruma (BSA) kao blokerom, a zatim sa humanim serumom u prisustvu pufera (TTBS), a potom sa sekundarnim antitelom obeleženim HRP, oduzmu srednje vrednosti apsorbanci odgovarajuće dve slepe probe. Prva slepa proba je apsorbancija uzorka u kome je odgovarajući humani serum inkubiran sa puferom u kome

se nalazi bloker. Druga slepa proba predstavlja srednju vrednost apsorbanci uzoraka u kojima je antigen tretiran puferom (TTBS sa blokerom) i sekundarnim antitelom obeleženim sa HRP.

Za ispitivanje imunoreaktivnosti prema proteinima kravljeg mleka i glijadina koriste se laboratorijske pozitivne kontrole, normirane u odnosu na standarde; to su tri različita seruma sa visokim nivoom IgA, IgG odnosno IgM imunoreaktivnosti prema proteinima kravljeg mleka, odnosno prema glijadinu. Rezultati za imunoreaktivnost prema proteinima kravljeg mleka/glijadina su izraženi arbitrarnim jedinicama (AU/ml), a dobijaju se sa prethodno napravljene kalibracione krive $A=f(\text{AU/ml})$. Kao kontrolne serume, svaki eksperiment je sadržao jedan pozitivni kontrolni serum i jedan serum zdrave kontrole. Koeficijent varijacije izmedju testova je iznosio do 10%.

Granična vrednost prema ispitivanim antigenima je određena na osnovu humoralne imunoreaktivnosti zdravih kontrolnih osoba. Granične vrednosti za svaki test su određivane kao srednja vrednost za ispitivane kontrolne osobe uvećana za 2 standardne devijacije ($X_{sr}+2SD$). Nепroteinski rastvori nisu pokazali reaktivnost u ELISA testu (bila je 0), što znači da nije došlo do nespecifičnog vezivanja.

3.5.2 *Test stimulacije proliferacije ćelija na antigene hrane*

In vitro stimulacija mononuklearnih ćelija periferne krvi antigenima hrane ispitana je testom stimulacije proliferacije, pri čemu se proliferativni odgovor merio MTT (3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid) proliferacionim testom. Ova metoda opisana je od strane Mosmann-a (Mosmann 1983), a potom modifikovana od strane Ohno-a i Abe-a (Ohno i Abe, 1991).

Iz pune heparizirane krvi se izoluju plazma i mononuklearne ćelije periferne krvi (eng. *Peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) centrifugiranjem u gradijentu gustine pomoću *Lymphoprep*-a (Nycomed, Oslo, Norway). PBMC sa interfeze se isperu tri puta *Haemaccel*-om (vodeni rastvor 145 mM Na⁺, 5.1 mM K⁺, 6.2 mM Ca²⁺, 145mM Cl⁻ i 35 g/l polimera želatina, pH 7.4), izbroje i resuspenduju u hranljivom medijumu (RPMI-1640, bez boje fenol crveno, pH 7.2, 10% autologe plazme, 3mM L-glutamina, 100 µg/ml streptomocina, 100 IU/ml penicilina i 25mM Hepes). Suspenzija PBMC u navedenoj

podlozi (150 000 ćel/po otvoru) se postavi u mikrotitar ploče sa 96 otvora. PBMC se zatim inkubiraju u finalnoj zapremini od 150µl hranljivog medijuma, a u prisustvu antigena, proteina kravljeg mleka (333µg/ml) (ICN pharmaceuticals), glijadina (50µg/ml) (SIGMA), mitogena fitohemaglutinina (5µg/ml) (PHA- INEP, Beograd, Srbija) i u kombinaciji PHA sa proteinima kravljeg mleka, ili glijadinom. Sledi inkubacija od 72h, nakon čega se preživljavanje ćelija određuje MTT testom: u svaki otvor ploče dodaje se 10µL MTT rastvora (3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid), potom se nastavlja inkubacija još četiri sata, kada se dodaje 100µl 10% SDS-a. Apsorbancija se meri sledećeg dana na 570nm.

Stimulacija proliferacije se određivala kao odnos između apsorbancije uzorka sa antigenima i apsorbancije uzorka koji je inkubiran samo sa hranljivom podlogom. Kako je broj ćelija proporcionalan apsorbanciji ćelija tretiranih MTT-jem, stimulacija proliferacije G (%) je računata kao:

$$G (\%) = (A - A_o) \times 100 / A_o$$

gde je A apsorbancija PBMC koje su inkubirane sa antigenima hrane, a A_o je apsorbancija kontrolnih ćelija koje su inkubirane samo sa hranljivim medijumom. Podrazumeva se da je za dobijanje A, odnosno A_o, apsorbancija slepe probe (apsorbancija podloge sa odgovarajućim antigenom, ali bez ćelija) uvek oduzimana od odgovarajuće apsorbancije uzorka sa ćelijama.

Granična vrednost prema ispitivanim antigenima je određena na osnovu podataka dobijenih analizom proliferacije PBMC zdravih kontrolnih osoba. Granične vrednosti za svaki test su određivane kao srednja vrednost za ispitivane kontrolne osobe uvećana za 2 standardne devijacije (X_{sr}+2SD).

3.5.3 Ekspresija receptora za IgG na leukocitima i ekspresija CD26 na površini perifernih mononuklearnih ćelija

Ekspresija receptora za IgG (FcγRIII/CD16), CD16/CD56 i površinskog CD26 na leukocitima ispitana je metodom protočne citometrije. Korišćena su odgovarajuća monoklonska antitela i to: monoklonsko antitelo specifično za CD16 i CD26 su fikoeritriinom bojena (PE), a antitelo specifično za CD56 je bilo obeleženo fluorescein

izotiocijanatom (FITC), sva korišćena monoklonska antitela su od proizvođača Becton Dickinson Immunocytometry Systems. Ekspresija CD16 i CD56 molekula je određivana na limfocitima i granulocitima (koji su fizički gejtovani), dok je ekspresija CD26 određivana na mononuklearnim ćelijama periferne krvi (limfociti i monociti, fizičko gejtovanje). Granične vrednosti pokazatelja dobijene analizom uzoraka zdravih osoba određivane su kao $X_{sr} \pm SD$.

Ukratko, u 50 μ l pune krvi se dodaje 2,5 μ l (0.05mg/ml) rastvora monoklonskog antitela, potom vorteksuje i inkubira u mraku tokom 15min. Nakon toga, 800 μ l rastvora za liziranje (FACS Lysing solution, BD Biosciences) rastvora se naliva, vorteksuje i tokom 10 min inkubira u mraku, potom centrifugira na 1600 obrt/min, 5 minuta. Uzorak se zatim ispere dva puta cell wash-om i na kraju se dodaje po 200 μ L cell fix rastvora za fiksaciju (CellFIX, BD Biosciences).

Ekspresija ispitivanih molekula se određivala pomoću FACSCalibur protočnog citometra (BD Biosciences Franklin Lakes, NJ, USA). Iz svakog uzorka je ispitivano 10000 ćelija periferne krvi, odnosno leukocita, a prikupljeni podaci su analizirani CELLQuest softverom (BD Biosciences).

3.5.4 Aktivnost dipeptidil peptidase 4 (DPPIV/CD26) u serumu

Serumska aktivnost DPPIV merena je pomoću direktne fotometrijske metode prilagodjene pločama sa 96 otvora, opisane od strane Jarmolowska i sar. (Jarmolowska B 2007), ali delimično izmenjena (Erić-Nikolić i sar, 2011; Matić i sar, 2012)

Dodaje se 50 μ l 0.3M Gly/NaOH pufera (pH 8.7), 20 μ L 1.5 mM Gly-Pro-p-nitroanilid p-toluensulfonata (DPPIV substrat; Sigma G2901) i 50 μ l destilovane vode u uzorke seruma i njihove slepe probe. Standardni uzorci sadrže 20 μ l 1.5 mM p-nitroanilina (Sigma N2128) umesto supstrata, dok slepe probe sadrže 20 μ l vode. Nakon inkubacije od 30min na 37C, dodaje se 50 μ l hladnog (4C) 1M acetatnog pufera (pH 4.2) slepim probama seruma kako bi se sprečila enzimaska reakcija. Potom, 10 μ l seruma se dodaje uzorcima i njihovim slepim probama, dok se standardnim uzorcima i njihovim slepim probama dodaje 10 μ l vode. Ploče se inkubiraju tokom 30min na 37C, a enzimaska reakcija se u uzorcima sa serumom zaustavlja dodavanjem 50 μ l hladnog (4C) 1M acetatnog pufera

(pH 4.2). Standardni uzorci i njihove slepe probe sadrže istu zapreminu acetatnog pufera. Apsorbancija se meri na 405nm. Nakon obrade podataka, pristupa se izračunavanju aktivnosti enzima.

DPPIV aktivnost u serumu se izračunavala putem sledeće formule:

$$\text{Enzimska aktivnost} = (\text{Auzorka seruma} - \text{Aslepe probe seruma} / \text{A standardni uzorak} - \text{A slepa proba standarda}) \times 100$$

Enzimska aktivnost: IU/L = 1 μ M/min/L seruma.

Svi eksperimenti radjeni su u triplicatu. Kao kontrolne serume, svaki eksperiment je sadržao jedan pozitivni kontrolni serum i jedan serum zdrave kontrole. Koeficijent varijacije izmedju testova je iznosio do 10%. Granične vrednosti su računane kao $\bar{X}_{sr} \pm SD$.

3.5.5 Statistička obrada podataka

Po završenom prikupljanju i obradi uzoraka, pristupilo se statističkoj obradi podataka. Najpre je proverena normalnost distribucije dobijenih rezultata pomoću Kolmogorov Smirnov-ovog testa. Korišćeni su parametarski testovi (Student-ov t-test i one way Anova) za varijable sa normalnom distribucijom podataka, a neparametarske testove (Mann-Whitney, Kruskal-Wallis test) za varijable sa neparametarskom distribucijom podataka. Za ispitivanje povezanosti izmedju ispitivanih pokazatelja korišćeni su parametarski i neparametarski testovi (Pirsonov ili Spirmanov koeficijent korelacije), u skladu sa distribucijama varijabli.

Kako bismo ocenili dijagnostički kvalitet varijabli za serumsku aktivnost i ekspresiju DPPIV, koristili smo ROC (eng. *The Receiver Operating Characteristic*) analizu koja je kontrolisana putem površine ispod krive (eng. *Area Under the Curve*, AUC) sa manuelno izabranim najboljim graničnim vrednostima za grupu pacijenata. Nivo značajnosti za sve analize je bio 0.05. Statistička analiza je uradjena pomoću programskog paketa SPSS 15.0 za Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Za grafički prikaz podataka korišćen je GraphPad Prism5.

4. REZULTATI

Prosečna starost pacijenata sa ranim reumatoidnim artritismom (rRA) iznosila je 49.1 ± 15.7 godina (od 22-81 godinu), medju njima je bilo 41 žena i 9 muškaraca. Od pedesetoro pacijenata sa rRA koji su učestvovali u studiji, 29 (58%) pacijenata je imalo simptome manje od 3 meseca pre nego što ima je dijagnostikovani reumatoidni artritis – ova grupa pacijenata je označena kao veoma rani reumatoidni artritis (vrRA). Dalja analiza podataka pokazala je da su dva pacijenta imala nisku aktivnost bolesti, njih 18 je bilo u zoni umerene aktivnosti bolesti, a čak 30 pacijenata (60%) je imalo visoku aktivnu bolest. Kliničke karakteristike pacijenata sa ranim i hroničnim reumatoidnim artritismom su prikazane u tabeli 4.

Tabela 4. Karakteristike bolesnika sa ranim i hroničnim reumatoidnim artritismom.

	rani RA	hronični RA
Starost	49.1 ± 15.7 godina	48.6 ± 15.9
Pol	41 žena i 9 muškaraca	25 žena i 5 muškaraca
Trajanje simptoma	5.5 ± 7.1 meseci	11.1 ± 5.5 godina
Sedimentacija eritrocita	36 ± 26 mm/sat	17 ± 13 mm/sat
CRP ^a	22.5 ± 28.9 mg/L	NR ^b
Imunoserologija	70% RF pozitivnih, 78% ACPA pozitivnih	55% RF pozitivnih, 69% ACPA pozitivnih
Osetljivi zglobovi	11 ± 8	4 ± 3
Otečeni zglobovi	9 ± 6	2 ± 2
Pacijentova procena aktivnosti bolesti VAS (0-100)	47.2 ± 18.9	33 ± 18
DAS28 skor	5.5 ± 1.3	3.5 ± 1.7

^a C-reaktivni protein, ^b nije uradjeno

Kontrolnu grupu bolesnika sa hroničnim artritismom činilo je 30 bolesnika, prosečne starosti 48.6 ± 15.9 godina (21-81 godina), koji su bili na različitim terapijskim režimima. Ova grupa se po polu i starosti nije statistički razlikovala od ispitivane grupe sa rRA ($p > 0.99$ za pol, $p = 0.8807$ za starost). U remisiji je bilo 8 pacijenata sa hRA, četvero je

imalo nisku aktivnost bolesti, njih 15 je bilo u zoni umerene aktivnosti bolesti, a troje je bilo sa visoko aktivnom bolešću.

Kontrolnu grupu bolesnika sa degenerativnim oboljenjima lokomotornog sistema (D) činilo je 30 ispitanika, uparenih po polu i po starosti sa grupom bolesnika sa rRA ($p=0.4049$ za pol, $p=0.08$ za starost). Prosečna starost ovih bolesnika je bila 55.3 ± 15.2 godine, grupu je činilo 22 žene i 8 muškaraca.

Kontrolnu grupu zdravih ispitanika činilo je 40 osoba, prosečne starosti 38.5 ± 10.7 godina ($23-62$ godine), 26 žena i 14 muškaraca.

4.1 Određivanje nivoa antitela IgG, IgA i IgM klase na proteine iz hrane u serumu

4.1.1 Antitela na glijadin

Serumski nivoi antitela na glijadin IgG, IgA i IgM klase određivani su kod 50 pacijenata sa ranim RA, 30 pacijenata sa degenerativnim oboljenjima zglobova i kod 37 zdravih kontrola. Rezultati ispitivanja prikazani su u tabeli 5.

Tabela 5. Nivoi anti-glijadinskih IgA, IgG i IgM antitela kod bolesnika sa ranim reumatoidnim artritismom (rRA), bolesnicima sa degenerativnim oboljenjima zglobova (D) i kod zdravih osoba (K)

Grupa ispitanika	Nivo anti-glijadinskih IgA antitela	Nivo anti-glijadinskih IgG antitela	Nivo anti-glijadinskih IgM antitela
rRA	$2,13\pm 4,23$	$5,93\pm 6,02^*$	$36,67\pm 19,42$
D	$3,21\pm 2,81^{**}$	$6,97\pm 12,48$	$27,38\pm 21,80$
K	$1,13\pm 1,34$	$3,08\pm 4,57$	$38,15\pm 26,67$

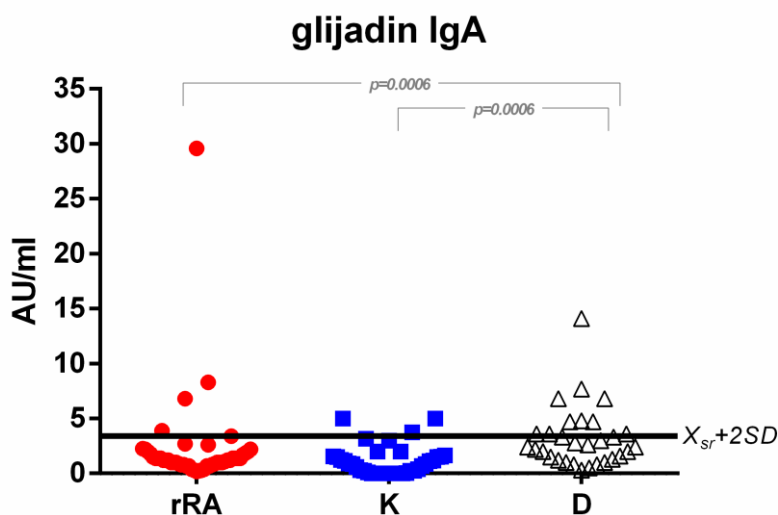
** $p=0.014$ u odnosu na zdrave ispitanike, ** $p=0.0006$ u odnosu na zdrave ispitanike i bolesnike sa degenerativnim reumatizmom*

Rezultati ELISA testova pokazali su da kod pacijenata sa ranim reumatoidnim artritismom postoji značajno povećan nivo IgG antitela na glijadin u odnosu na grupu zdravih ispitanika ($p=0.014$). Nije primećena razlika u imunoreaktivnosti antitela klase IgG na glijadin izmedju grupe bolesnika sa rRA i degenerativnim reumatizmom ($p=0.67$), kao ni izmedju kontrolne grupe zdravih ispitanika i bolesnika sa degenerativnim reumatizmom ($p=0.11$).

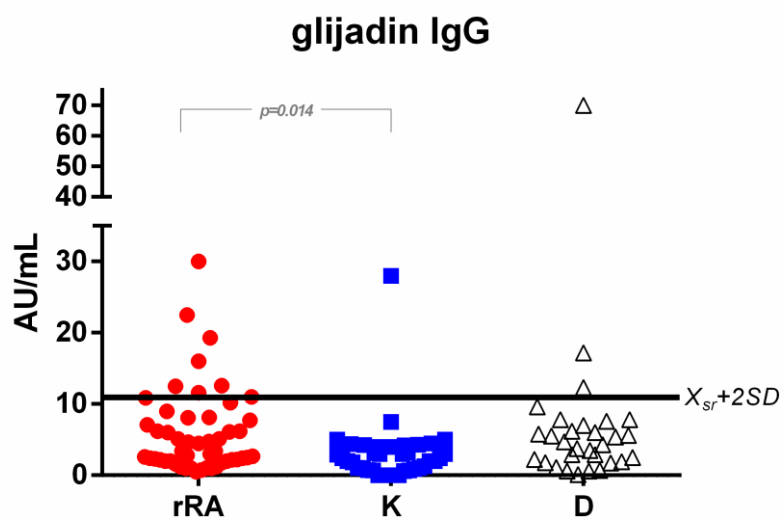
Nivo antitela na glijadin iz IgA klase nije pokazao značajnu razliku izmedju grupe bolesnika sa rRA i zdravim ispitanicima ($p=0.12$), ali je zato u grupi bolesnika sa degenerativnim oboljenjima zglobova nivo ovih antitela bio značajno viši u odnosu na zdrave ispitanike ($p=0.0006$), ali i u odnosu na bolesnike sa rRA ($p=0.0006$).

Analiza nivoa anti-glijadinskih antitela IgM klase nije pokazala statistički značajne razlike izmedju ispitivanih grupa ($p=0.1144$).

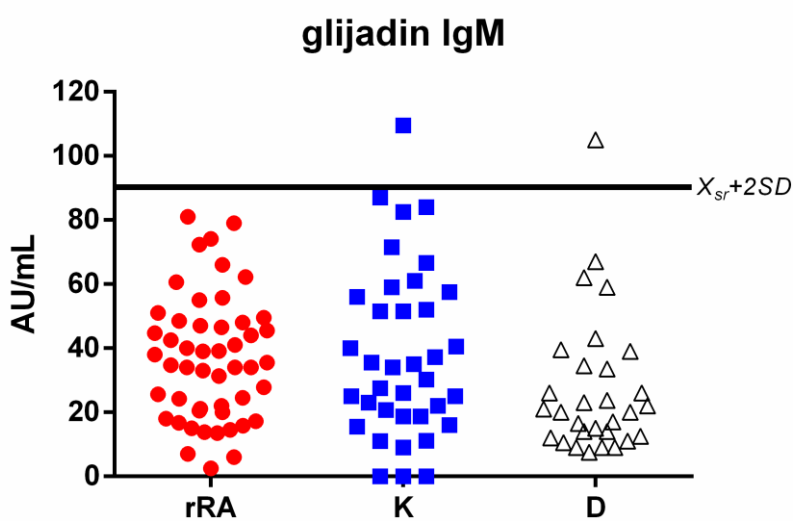
Distribucija anti-glijadinskih IgA, IgG i IgM klase antitela u serumu bolesnika sa ranim reumatoidnim artritismom, bolesnika sa degenerativnim oboljenjima zglobova i kod zdravih kontrola prikazana je na graficima 1.1., 1.2. i 1.3.



Grafik 1.1. Nivoi anti-glijadinskih IgA antitela u serumu pacijenata sa ranim reumatoidnim artritismom (rRA), zdravih kontrola (K) i bolesnika sa degenerativnim bolestima zglobova (D).



Grafik 1.2. Nivoi anti-glijadinskih IgG antitela u serumu pacijenata sa ranim reumatoidnim artritismom (rRA), zdravih kontrola (K) i bolesnika sa degenerativnim bolestima zglobova (D).



Grafik 1.3. Nivoi anti-glijadinskih IgM antitela u serumu pacijenata sa ranim reumatoidnim artritismom (rRA), zdravih kontrola (K) i bolesnika sa degenerativnim bolestima zglobova (D).

4.1.2 Antitela na proteine iz kravljeg mleka

Serumski nivoi antitela na proteine kravljeg mleka IgG, IgA i IgM klase određivani su kod 50 pacijenata sa ranim RA, 30 pacijenata sa degenerativnim oboljenjima zglobova i kod 37 zdravih kontrola. Rezultati ispitivanja prikazani su u tabeli 6.

Tabela 6. Nivoi antitela IgA, IgG i IgM klase na proteine kravljeg mleka kod bolesnika sa ranim reumatoidnim artritisom (rRA), bolesnicima sa degenerativnim oboljenjima zglobova (D) i kod zdravih osoba (K)

Grupa ispitanika	Nivo IgA antitela na proteine kravljeg mleka	Nivo IgG antitela na proteine kravljeg mleka	Nivo IgM antitela na proteine kravljeg mleka
rRA	35,09±65,09*	19,05±25,95	134,2±109,6**
D	26,33±26,60	43,82±68,37****	138,3±152,9***
K	10,88±36,77	14,12±18,26	39,59±57,9

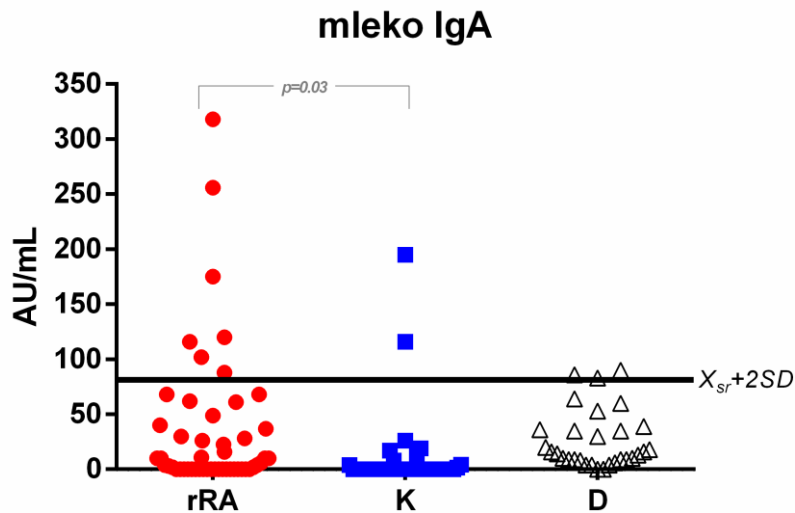
* $p=0.0308$ u odnosu na zdrave ispitanike, ** $p<0.0001$ u odnosu na zdrave ispitanike, *** $p=0.0019$ u odnosu na zdrave ispitanike, **** $p=0.027$ u odnosu na zdrave ispitanike

Značajno viši nivoi IgA antitela na proteine iz kravljeg mleka uočeni su u serumu pacijenata sa rRA u odnosu na zdrave kontrole ($p=0.0308$). Nije detektovana značajna razlika u imunoreaktivnosti IgA antitela na proteine iz kravljeg mleka između grupe degenerativnih oboljenja zglobova i bolesnika sa rRA ($p=0.4033$), kao i sa grupom zdravih ispitanika ($p=0.0505$).

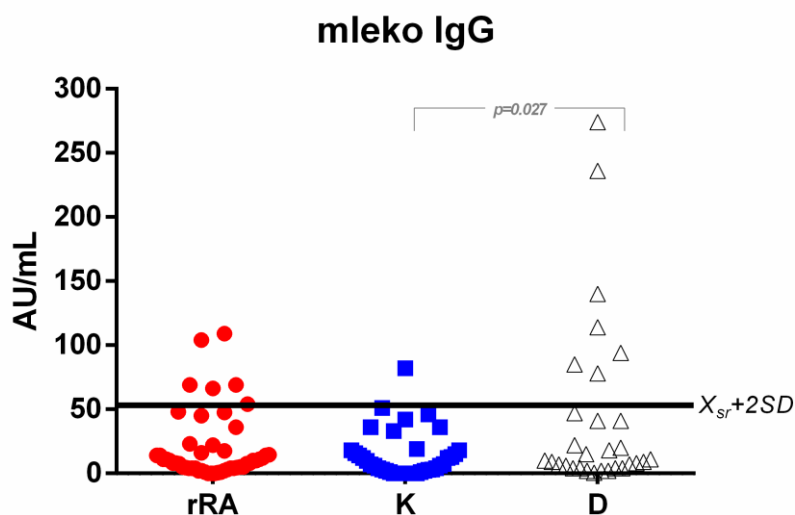
IgM antitela na proteine iz kravljeg mleka pokazala su značajni viši titar kod bolesnika sa rRA nego kod zdravih osoba ($p<0.0001$). Nije bilo značajne razlike u nivou ovih antitela između grupe obolelih od rRA i grupe sa degenerativnim reumatizmom, a uočen je i znatno veći titar ovih antitela kod bolesnika sa degenerativnim oboljenjima zglobova nego kod zdravih osoba ($p=0.0019$).

Nije bilo razlike u nivou IgG antitela na proteine kravljeg mleka između grupa ($p=0.0982$), osim što su pacijenti sa degenerativnim reumatskim bolestima imali viši titar ovih antitela u odnosu na zdrave kontrole ($p=0.027$).

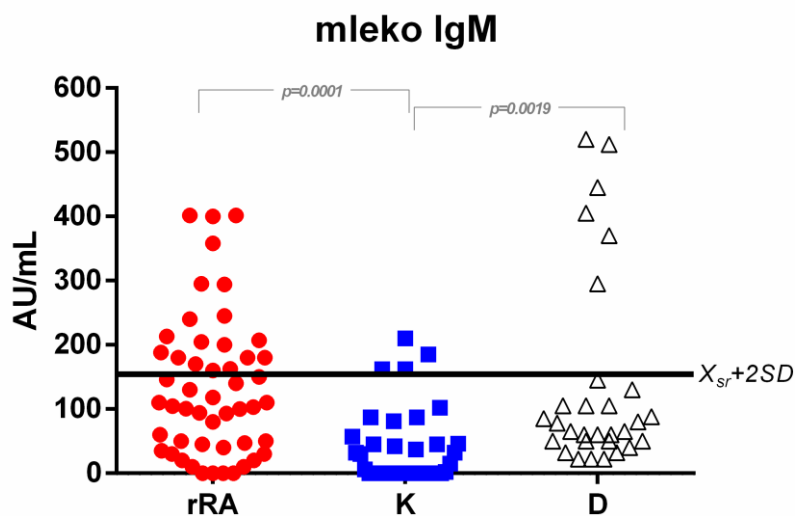
Distribucija antitela na proteine kravljeg mleka IgA, IgG i IgM klase u serumu bolesnika sa ranim reumatoidnim artritisom, bolesnika sa degenerativnim oboljenjima zglobova i kod zdravih kontrola prikazana je na graficima 2.1., 2.2. i 2.3.



Grafik 2.1. Nivoi antitela na proteine iz kravljeg mleka IgA klase u serumu pacijenata sa ranim reumatoidnim artritisom (rRA), zdravih kontrola (K) i bolesnika sa degenerativnim bolestima zglobova (D).



Grafik 2.2. Nivoi antitela na proteine iz kravljeg mleka IgG klase u serumu pacijenata sa ranim reumatoidnim artritisom (rRA), zdravih kontrola (K) i bolesnika sa degenerativnim bolestima zglobova (D).



Grafik 2.3. Nivoi antitela na proteine iz kravljeg mleka IgM klase u serumu pacijenata sa ranim reumatoidnim artritismom (rRA), zdravih kontrola (K) i bolesnika sa degenerativnim bolestima zglobova (D).

Vrednosti nivoa IgA antitela prema proteinima kravljeg mleka iznad graničnih (koje su dobijene analizom uzoraka zdravih osoba), uočene su kod 7 od 50 pacijenata sa ranim reumatoidnim artritismom, zatim vrednosti IgG klase ovih antitela iznad graničnih primećene su kod 6 od 50 pacijenata sa rRA, a u IgM klasi 18 pacijenata je imalo povišene vrednosti antitela u krvi. Povišeni titar antitela na glijadin u IgA klasi detektovan je kod 4 od 50 pacijenata, dok je u IgG klasi šestoro pacijenata imalo vrednosti iznad graničnih. Ukratko, 25 od 50 analiziranih bolesnika sa rRA imalo je neki vid povišene imunoreaktivnosti na neki od antigena iz hrane.

4.2 Stimulacija proliferacije mononuklearnih ćelija periferne krvi antigenima hrane

Stimulacija limfocitne proliferacije u prisustvu glijadina ispitivana je kod 48 pacijenata sa ranim reumatoidnim artritismom, 30 osoba sa degenerativnim oboljenjima zglobova i kod 38 zdravih osoba. Rezultati ispitivanja prikazani su u tabeli 7.

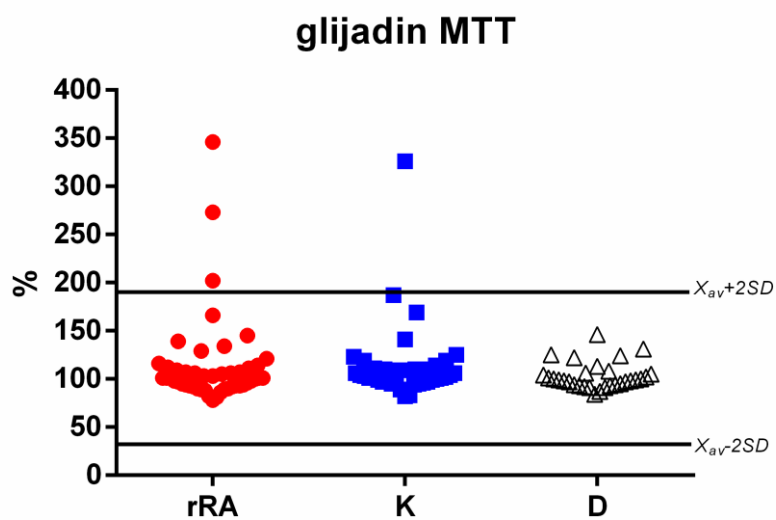
Tabela 7. Stimulacija proliferacije limfocita u prisustvu glijadina, mleka i fitohemaglutinina (PHA) kod bolesnika sa ranim reumatoidnim artritismom (rRA), bolesnika sa degenerativnim oboljenjima zglobova (D) i kod zdravih kontrola.

Grupa ispitanika	glijadin	mleko	PHA
rRA	113,9±47,33	113,4±47,39	120,6±39,72*
D	103±14	100,1±15,38	174,1±35,9
K	113,9±40,74	114,3±43,59	174,6±45,85

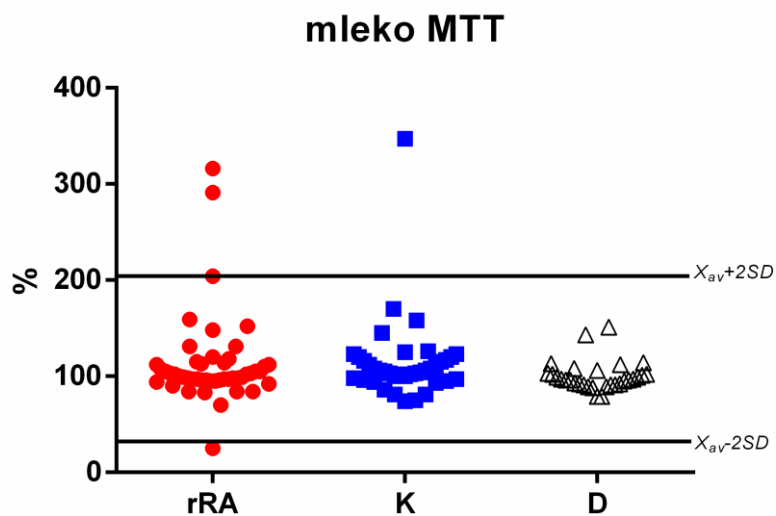
** p < 0.0001 u odnosu na zdrave osobe i bolesnike sa degenerativnim reumatizmom*

Stimulacija proliferacije limfocita u prisustvu glijadina nije se značajno razlikovala izmedju ispitivanih grupa pacijenata sa rRA, zdravih kontrola i bolesnika sa degenerativnim reumatizmom ($p=0.2459$, $p=0.7264$, $p=0.1064$, respektivno). U prisustvu proteina kravljeg mleka, takodje nije uočena značajna razlika izmedju ispitivanih grupa ($p=0.3459$, $p=0.0715$, $p=0.0684$, respektivno). Stimulacija proliferacije limfocita u prisustvu samo fitohemaglutinina je bila smanjena kod pacijenata sa rRA u odnosu na druge dve kontrolne grupe ($p < 0.0001$, $p < 0.0001$, respektivno).

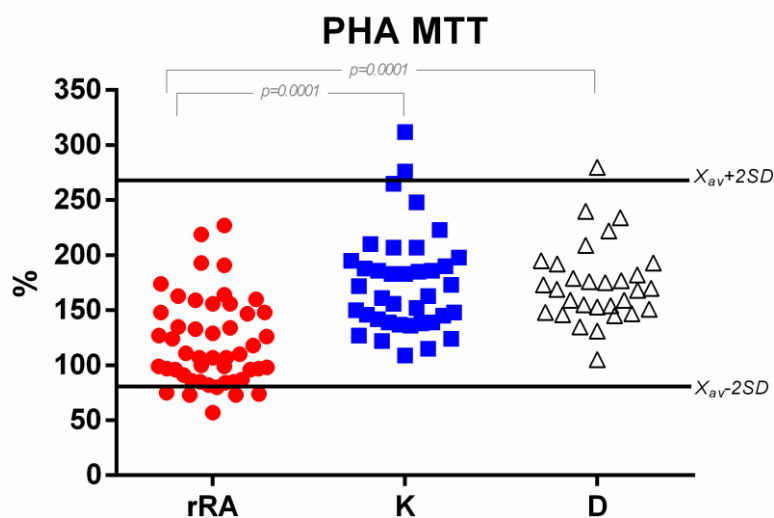
Distribucija stimulacije proliferacije limfocita u prisustvu glijadina, mleka i fitohemaglutinina kod bolesnika sa ranim reumatoidnim artritismom, bolesnika sa degenerativnim oboljenjima zglobova i kod zdravih kontrola prikazana je na graficima 3.1., 3.2. i 3.3.



Grafik 3.1. Stimulacija limfocitne proliferacije u prisustvu glijadina kod pacijenata sa ranim reumatoidnim artritismom (rRA), zdravih kontrola (K) i bolesnika sa degenerativnim bolestima zglobova (D).



Grafik 3.2. Stimulacija limfocitne proliferacije u prisustvu mleka kod pacijenata sa ranim reumatoidnim artritismom (rRA), zdravih kontrola (K) i bolesnika sa degenerativnim bolestima zglobova (D).



Grafik 3.3. Stimulacija limfocitne proliferacije u prisustvu fitohemaglutinina (PHA) kod pacijenata sa ranim reumatoidnim artritisom (rRA), zdravih kontrola (K) i bolesnika sa degenerativnim bolestima zglobova (D).

Uz fitohemaglutinin kao mitogen, limfocitna stimulacija u prisustvu glijadina i mleka bila je značajno niža kod pacijenata sa rRA nego kod zdravih osoba ($p < 0.0001$) i nego kod osoba sa degenerativnim reumatizmom ($p < 0.0001$), podaci prikazani u tabeli 8.

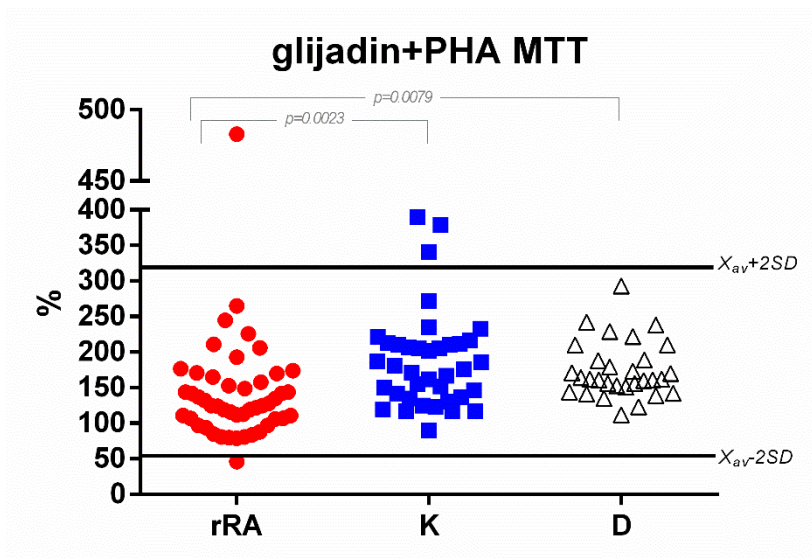
Tabela 8. Stimulacija proliferacije limfocita u prisustvu kombinacije glijadina/mleka i fitohemaglutinina (PHA) kod bolesnika sa ranim reumatoidnim artritisom (rRA), bolesnika sa degenerativnim oboljenjima zglobova (D) i kod zdravih kontrola.

Grupa ispitanika	glijadin+PHA	mleko+PHA
rRA	141,2±67,87*	143,4±47,39**
D	174,5±39,83	171,3±44,03
K	187,9±68,37	203,7±84,52

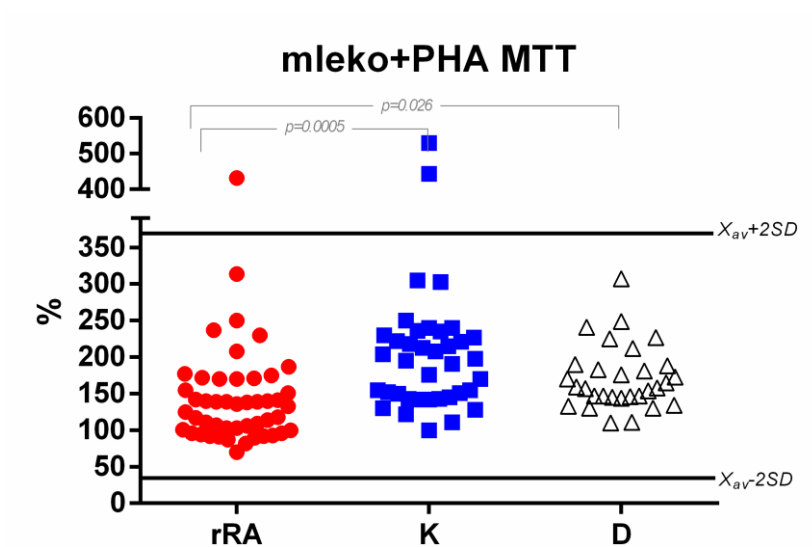
* $p < 0.0001$ u odnosu na zdrave osobe i bolesnike sa degenerativnim reumatizmom, ** $p < 0.0001$ u odnosu na zdrave osobe i bolesnike sa degenerativnim reumatizmom

Distribucija stimulacije proliferacije limfocita u prisustvu glijadina, mleka i fitohemaglutinina kod bolesnika sa ranim reumatoidnim artritisom, bolesnika sa

degenerativnim oboljenjima zglobova i kod zdravih kontrola prikazana je na graficima 4.1. i 4.2.



Grafik 4.1. Stimulacija limfocitne proliferacije u prisustvu kombinacije glijadina i fitohemaglutinina (PHA) kod pacijenata sa ranim reumatoidnim artritismom (rRA), zdravih kontrola (K) i bolesnika sa degenerativnim bolestima zglobova (D).



Grafik 4.2. Stimulacija limfocitne proliferacije u prisustvu kombinacije mleka i fitohemaglutinina (PHA) kod pacijenata sa ranim reumatoidnim artritismom (rRA), zdravih kontrola (K) i bolesnika sa degenerativnim bolestima zglobova (D).

4.3 Ekspresija IgG receptora na efektorским ćelijama imunog sistema

4.3.1 Učestalost i ekspresija CD16 na limfocitima

Određivanje ekspresije CD16 antigena (FcγIII receptora) na površini membrane limfocita i granulocita, kao i CD56 antigena na površini membrane limfocita, odnosno ispitivanje procentualne zastupljenosti CD16+ limfocita i granulocita, kao i CD16+CD56+ limfocita vršena je na uzorcima pune krvi bolesnika sa ranim reumatoidnim artritisom, bolesnika sa degenerativnim oboljenjima zglobova i zdravih osoba. Procentualna zastupljenost specifičnih subpopulacija imunskih ćelija određivana je u odnosu na populaciju ukupnih leukocita (engl. *total*, t), i u odnosu na određenu tj. „gejtovanu“ (engl. *gated*, g) populaciju leukocita (populacija limfocita ili populacija granulocita). Referentne vrednosti određene su kao $X_{av} \pm SD$, na osnovu rezultata analize zdravih osoba.

Učestalost CD16+ limfocita u populaciji leukocita (t) i u populaciji limfocita (g) i vrednosti srednjeg intenziteta fluorescencije (engl. *mean fluorescence intensity*, MFI) na površini ovih ćelija, u navedenim grupama ispitanika prikazana je u tabeli 9.

Tabela 9. Učestalost i ekspresija CD16+ limfocita kod bolesnika sa ranim reumatoidnim artritisom (rRA), zdravih osoba (K) i bolesnika sa degenerativnim oboljenjima zglobova (D).

Grupe ispitanika	% CD16+ Ly (t)	% CD16+ Ly (g)	MFI CD16
rRA	1,74±1,49 ^a	12,3±1,4 ^b	665,5±68,9 ^c
K	2,95±1,45	19,1±1,1	384,9±64,5
D	2,99±2,16	18,6±1,9	1144±121,9 ^d

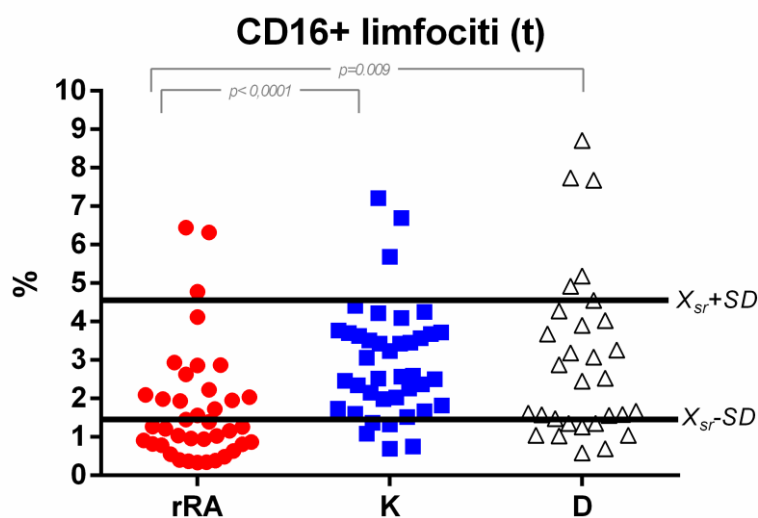
^a $p=0.0003$ u odnosu na zdrave osobe, $p=0.0110$ u odnosu na bolesnike sa degenerativnim reumatizmom,

^b $p=0.0005$ u odnosu na zdrave kontrole, $p=0.0019$ u odnosu na bolesnike sa degenerativnim reumatizmom,

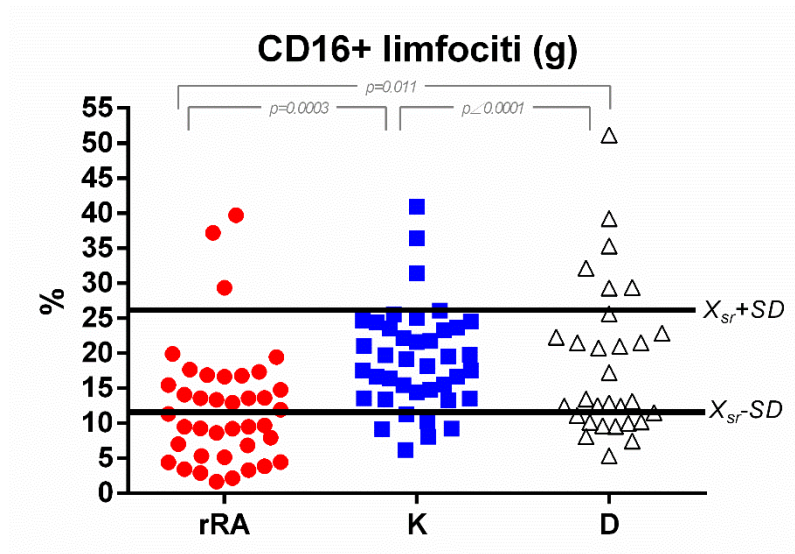
^c $p=0.0039$ u odnosu na zdrave kontrole, $p=0.0013$ u odnosu na bolesnike iz grupe degenerativnih oboljenja zglobova

^d $p < 0.0001$ u odnosu na zdrave kontrole

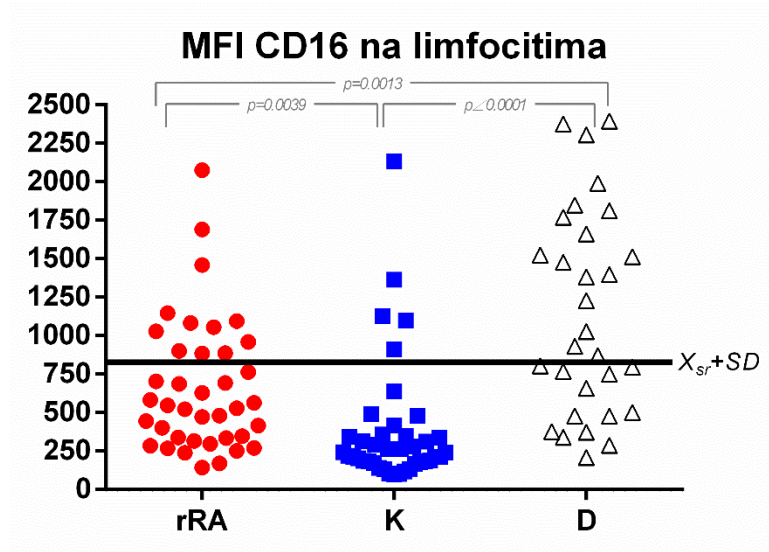
Značajno niži procenat CD16 pozitivnih limfocita zapažen je kod pacijenata sa ranim RA u odnosu na kontrolnu grupu zdravih osoba ($p=0.0003$) i u odnosu na grupu bolesnika sa degenerativnim reumatizmom ($p=0.0110$). Pored toga, zdrave kontrole i bolesnici iz grupe degenerativnih oboljenja imali su značajno viši procenat CD16+ ćelija u ukupnoj populaciji leukocita u odnosu na pacijente sa ranim reumatoidnim artritismom ($p=0,0005$ i $p=0.0019$). Uočeno je i da je ekspresija ovog molekula (Fc γ III receptora) na površini limfocita (MFI) značajno veća kod pacijenata sa rRA nego kod zdravih osoba ($p=0.0039$), ali i značajno niža nego kod bolesnika iz grupe degenerativnih oboljenja zglobova ($p=0.0013$). Pored toga, bolesnici iz grupe D imali su značajno višu ekspresiju CD16 molekula na površini limfocita u odnosu na zdrave kontrole ($p<0.0001$). Distribucija učestalosti CD16+ limfocita u populaciji leukocita (t) i u populaciji limfocita (g), kao i ekspresija CD16 na limfocitima kod bolesnika sa ranim reumatoidnim artritismom, zdravim dobrovoljcima i osobama sa degenerativnim oboljenjem zglobova prikazana je na graficima 5.1, 5.2 i 5.3.



Grafik 5.1. Učestalost CD16+ limfocita u populaciji leukocita kod bolesnika sa ranim reumatoidnim artritismom (rRA), zdravih osoba (K) i bolesnika sa degenerativnim oboljenjima zglobova (D).



Grafik 5.2. Učestalost CD16+ limfocita kod bolesnika sa ranim reumatoidnim artritisom (rRA), zdravih osoba (K) i bolesnika sa degenerativnim oboljenjima zglobova (D).



Grafik 5.3. Ekspresija CD16+ limfocita kod bolesnika sa ranim reumatoidnim artritisom (rRA), zdravih osoba (K) i bolesnika sa degenerativnim oboljenjima zglobova (D).

4.3.2 Učestalost CD16+CD56+ ćelija

Učestalost limfocita koji na svojoj površini ekspimiraju i CD16 i CD56 antigen u populaciji limfocita (g), kao i u populaciji ukupnih leukocita (t) u grupama ispitanika predstavljena je u tabeli 10.

Tabela 10. Učestalost CD16+CD56+ limfocita kod bolesnika sa ranim reumatoidnim artritisom (rRA), kontrolne grupe zdravih (K) i bolesnika sa degenerativnim reumatizmom (D).

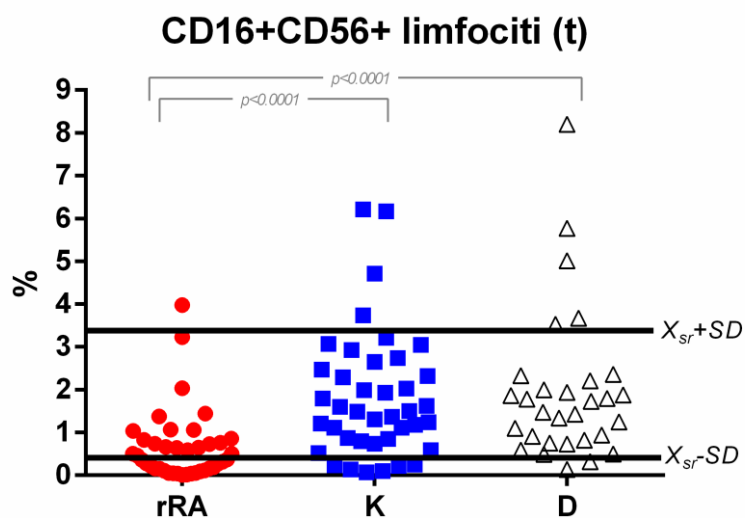
Grupe ispitanika	% CD16+CD56+ Ly (t)	% CD16+CD56+ Ly (g)
rRA	0,66±0,82*	4,8±0,8**
K	1,84±1,48	10,9±1,0
D	1,96±1,76	11,8±1,5

* $p < 0.0001$ u odnosu na zdrave osobe, $p < 0.0001$ u odnosu na bolesnike sa degenerativnim reumatizmom

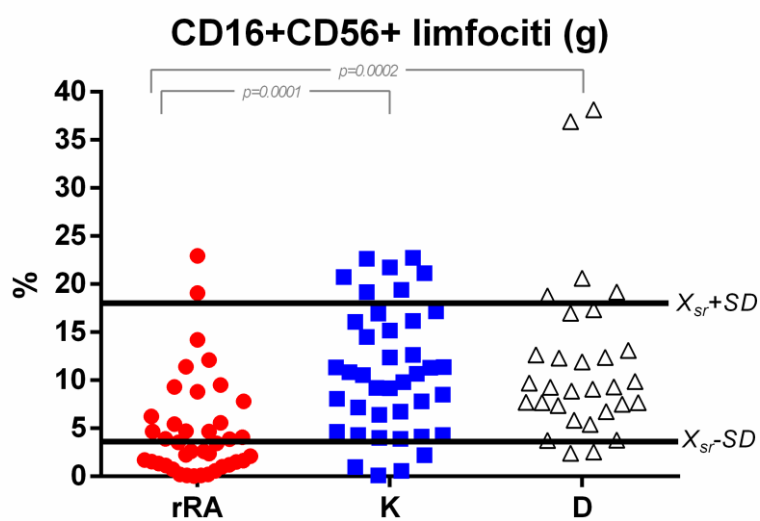
** $p < 0.0001$ u odnosu na zdrave osobe, $p = 0.0002$ u odnosu na bolesnike sa degenerativnim reumatizmom

Bolesnici sa ranim reumatoidnim artritisom imali su statistički značajno niži procenat CD16+CD56+ limfocita u populaciji leukocita u odnosu na zdrave osobe ($p < 0,0001$), ali i u odnosu na bolesnike sa degenerativnim reumatizmom ($p < 0,0001$). Procenat CD16+CD56+ limfocita u populaciji limfocita je bio značajno snižen kod pacijenata sa ranim RA u odnosu na zdrave kontrole i bolesnike sa degenerativnim reumatizmom ($p < 0.0001$, $p = 0.0002$). Nije bilo razlike u učestalosti ovih ćelija između grupe kontrolnih osoba i bolesnika sa degenerativnim reumatizmom.

Relativna učestalost CD16+CD56+ limfocita u ukupnoj populaciji leukocita (t) i u populaciji limfocita (g) kod bolesnika sa ranim reumatoidnim artritisom, bolesnicima sa degenerativnim oboljenjem zglobova i zdravih osoba, prikazana je na graficima 5.4 i 5.5.



Grafik 5.4. Učestalost CD16+CD56 limfocita u ukupnoj populaciji leukocita (t) kod bolesnika sa ranim reumatoidnim artritisom (rRA), zdravih osoba (K) i bolesnika sa degenerativnim oboljenjima zglobova (D).



Grafik 5.5. Učestalost CD16+CD56+ limfocita u populaciji limfocita (g) kod bolesnika sa ranim reumatoidnim artritisom (rRA), zdravih osoba (K) i bolesnika sa degenerativnim oboljenjima zglobova (D).

4.3.3 Učestalost i ekspresija CD16 na granulocitima

Učestalost CD16+ granulocita u populaciji leukocita (t) i populaciji granulocita (g), kao i ekspresija CD16 na površini ovih ćelija u grupama ispitanika prikazana je u tabeli 11.

Tabela 11. Učestalost i ekspresija CD16+ granulocita kod bolesnika sa ranim reumatoidnim artritismom (rRA), zdravih osoba (K) i bolesnika sa degenerativnim oboljenjima zglobova (D).

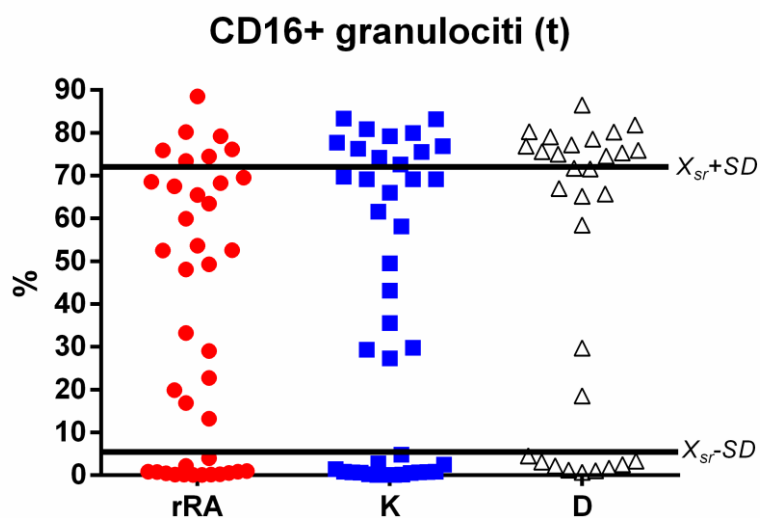
Grupe ispitanika	% CD16+ Gra (t)	% CD16+ Gra (g)	MFI CD16 Gra
rRA	36,26±32,03	57,6±7,3	338,2±51,8*
K	38,89±34,26	52,2±7,1	103,0±15,6
D	49,52±34,34	64,4±8,1	259,1±46,4**

* $p < 0.0001$ u odnosu na zdrave kontrole

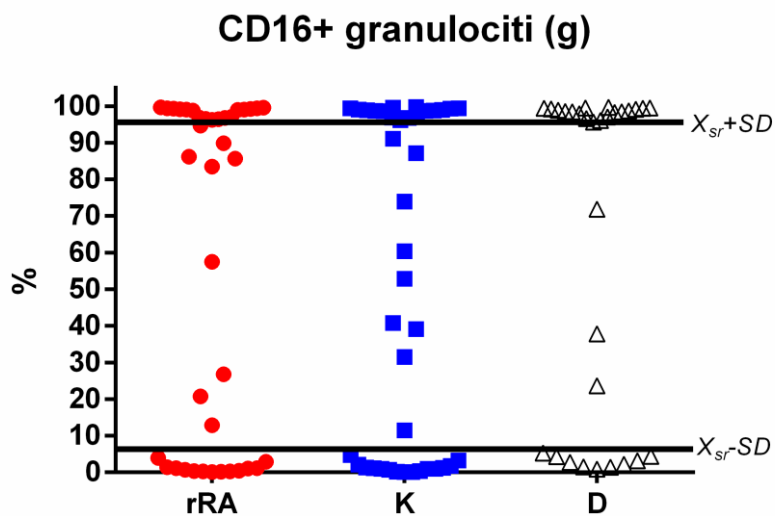
** $p=0.0030$ u odnosu na zdrave kontrole

Procenat CD16+ granulocita u populaciji granulocita (g) i u populaciji leukocita (t) se nije razlikovao između ispitivanih grupa ($p=0.5347$, $p=0.2418$), ali je zato ekspresija ovog molekula na površini granulocita (mean fluorescence intensity - MFI) bila značajno veća kod pacijenata sa ranim RA u odnosu na zdrave kontrole ($p < 0.0001$) i nije se razlikovala od vrednosti pronadjene kod bolesnika iz grupe degenerativnih oboljenja ($p=0.2594$). MFI CD16 na granulocitima bolesnika iz grupe D bio je značajno viši nego kod zdravih kontrola ($p=0.0030$).

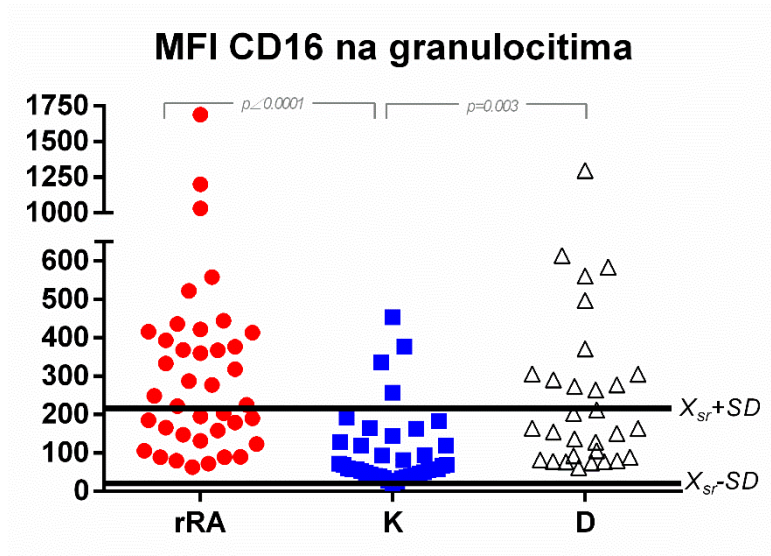
Distribucija procenta CD16+ granulocita u populaciji leukocita (t) i u populaciji granulocita (g), kao i ekspresija CD16 na površini granulocita (MFI) kod bolesnika sa ranim reumatoidnim artritismom, bolesnicima sa degenerativnim promenama i zdravih osoba, prikazana je na graficima 5.6, 5.7 i 5.8.



Grafik 5.6. Učestalost CD16+ granulocita u populaciji leukocita kod bolesnika sa ranim reumatoidnim artritismom (rRA), zdravih osoba (K) i bolesnika sa degenerativnim oboljenjima zglobova (D).



Grafik 5.7. Učestalost CD16+ granulocita u populaciji granulocita kod bolesnika sa ranim reumatoidnim artritismom (rRA), zdravih osoba (K) i bolesnika sa degenerativnim oboljenjima zglobova (D).



Grafik 5.7. Ekspresija CD16 na površini granulocita u populaciji granulocita kod bolesnika sa ranim reumatoidnim artritisom (rRA), zdravih osoba (K) i bolesnika sa degenerativnim oboljenjima zglobova (D).

4.3.4 Učestalost limfocita i granulocita u populaciji leukocita

Učestalost limfocita i granulocita u populaciji leukocita kod bolesnika sa ranim reumatoidnim artritisom, bolesnicima sa degenerativnim reumatizmom i zdravih osoba prikazana je u tabeli 12.

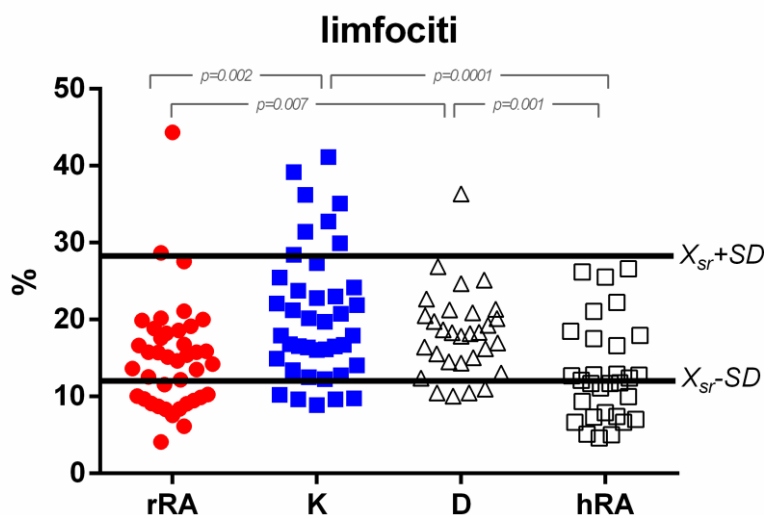
Tabela 12. Procenat limfocita i granulocita kod pacijenata sa ranim reumatoidnim artritisom (rRA), zdravih kontrola (K) i kod bolesnika sa degenerativnim oboljenjima zglobova (D).

Grupe ispitanika	% Ly	% Gra
rRA	15,1±1,1*	72,6±1,7
K	20,6±1,3	68,6±1,7
D	18,2±1,0	76,1±1,1**

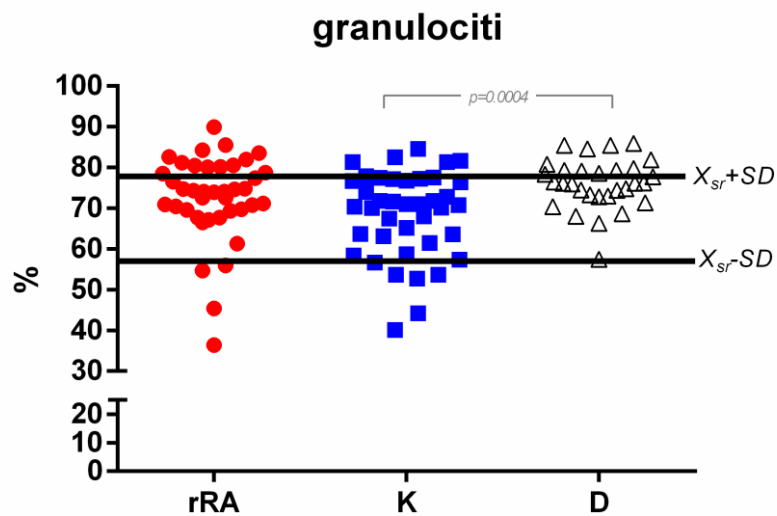
* p= 0.0023 u odnosu na zdrave osobe, p= 0.0451 u odnosu na bolesnike sa degenerativnim reumatizmom
 ** p= 0.0004 u odnosu na zdrave ispitanike

Procenat granulocita se nije razlikovao izmedju grupe bolesnika sa rRA i zdravih osoba ($p=0.095$), kao i sa bolesnicima grupe D ($p=0.0844$), ali je postojala značajna razlika izmedju procenta granulocita izmedju kontrolne grupe zdravih osoba i bolesnika sa degenerativnim oboljenjima zglobova ($p= 0.0004$). Zapažen je i značajno niži procenat limfocita kod pacijenata sa ranim RA u odnosu na zdrave kontrole ($p= 0.0023$), ali i na bolesnike iz grupe D ($p= 0.0451$) i to može biti razlog smanjenog procenta CD16+ i CD16+CD56+ ćelija u krvi bolesnika sa rRA.

Distribucija procenta limfocita i granulocita kod bolesnika sa ranim reumatoidnim artritismom, bolesnicima sa degenerativnim reumatizmom i zdravih osoba prikazana je na graficima 5.8 i 5.9.



Grafik 5.8. Učestalost limfocita u populaciji leukocita kod bolesnika sa ranim reumatoidnim artritismom (rRA), zdravih osoba (K), bolesnika sa degenerativnim oboljenjima zglobova (D) i bolesnika sa hroničnim reumatoidnim artritismom (hRA).



Grafik 5.9. Učestalost granulocita u populaciji leukocita kod bolesnika sa ranim reumatoidnim artritismom (rRA), zdravih osoba (K) i bolesnika sa degenerativnim oboljenjima zglobova (D).

U 14 od 40 analiziranih bolesnika sa ranim RA, uočen je smanjeni procenat limfocita. Povišeni nivoi IgA antitela na antigene iz hrane uočeni su kod 5 od 14 pacijenata sa sniženim procentom limfocita, povišeni nivoi IgG antitela na analizirane proteine iz hrane uočeni su kod 5 pacijenata, a kod 4 pacijenta od četrnaestoro koji su imali sniženi procenat limfocita, prisutni su bili povišeni nivoi IgM antitela na neki od ispitivanih antigena iz hrane. Medju pacijentima sa smanjenim procentom limfocita, devetoro je imalo IgG i/ili IgA i/ili IgM imunoreaktivnost na antigene hrane.

4.4 Ekspresija dipeptidil peptidaze IV na površini mononuklearnih ćelija periferne krvi

4.4.1 Ekspresija CD26 antigena na limfocitima

Učestalost CD26+ limfocita u populaciji leukocita (t) i populaciji limfocita (g) i vrednosti ekspresije CD26 na limfocitima u grupama ispitanika prikazani su u tabeli 13.

Tabela 13. Učestalost CD26+ limfocita u populaciji leukocita (t) i populaciji limfocita (g) i srednji intenzitet fluorescencije ekspresije CD26 na površini limfocita kod bolesnika sa ranim reumatoidnim artritismom (rRA), zdravim kontrolama (K), kod bolesnika sa degenerativnim oboljenjima zglobova (D) i kod bolesnika sa hroničnim reumatoidnim artritismom (hRA).

Grupe ispitanika	CD26+ Ly (t)	CD26+ Ly (g)	MFI CD26 Ly
rRA	6.6±3.4 ^a	46.6±11.9	328.6±298.7
K	11.3±5.3	50.3±11.9	278.4±138.8
D	9,8±0,6 ^b	50,9±2,1	325,0±58,3
hRA	6.9±3.5 ^c	52.8±13.4 ^d	161.0±59.9 ^e

^a $p < 0.001$ u odnosu na zdrave osobe

^b $p=0.0002$ u odnosu na pacijente sa ranim RA

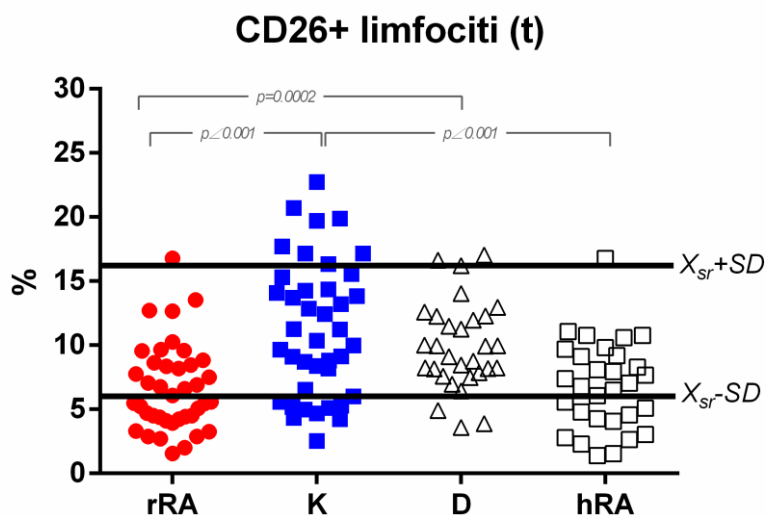
^c $p < 0.001$ u odnosu na zdrave osobe

^d $p=0.046$ u odnosu na pacijente sa ranim RA

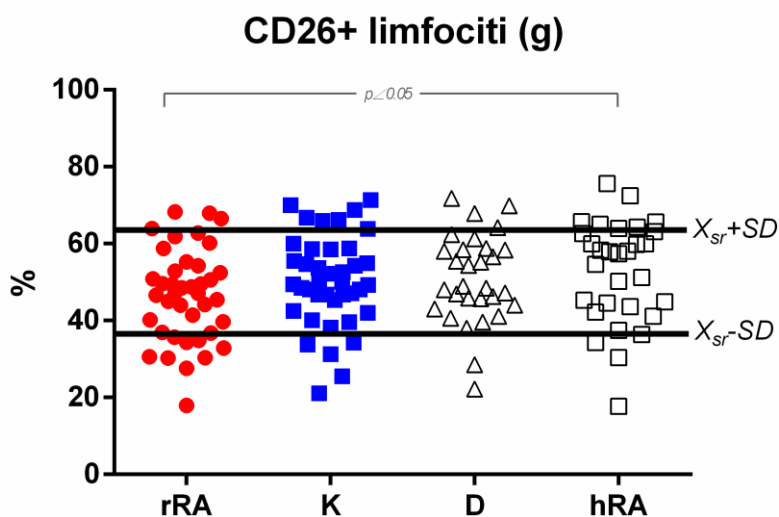
^e $p<0.0001$ u odnosu na pacijente sa rRA, $p=0.0003$ u odnosu na zdrave osobe, $p=0.0005$ u odnosu na bolesnike sa degenerativnim reumatizmom

Analiza ekspresije DPPIV/CD26 molekula na površini limfocita pokazala je značajno niži procenat CD26+ limfocita u populaciji leukocita kod pacijenata sa ranim i hroničnim reumatoidnim artritismom u odnosu na zdrave osobe ($p < 0.001$, $p < 0.001$, respektivno), podaci prikazani u Tabeli 13. Nije uočena razlika u procentu ovih ćelija između pacijenata sa ranim i hroničnim reumatoidnim artritismom ($p=0.8166$), ali je razlika bila statistički značajna između grupe pacijenata sa ranim reumatoidnim artritismom i bolesnika sa degenerativnim reumatizmom ($p=0.0002$). Kontrolne grupe zdravih osoba i osoba sa degenerativnim oboljenjima zglobova nisu se značajno razlikovale u vrednostima ispitivanog parametra ($p=0.1897$). Donja granična vrednost ovog pokazatelja je dobijena na osnovu vrednosti zdravih kontrola kao $X_{sr}-SD$ (6%). Podaci na grafiku 5.10 pokazuju da je 20 pacijenata sa ranim RA imalo vrednosti CD26+ limfocita u populaciji leukocita ispod donje granične vrednosti, dok je samo 9 od 40 zdravih osoba imalo snižene vrednosti ispod donje granice.

Distribucija učestalosti CD26+ limfocita u populaciji leukocita (t) i populaciji limfocita (g), kao i srednji intenzitet fluorescencije ekspresije CD26 na površini limfocita kod ispitivanih grupa prikazani su na graficima 5.10, 5.11 i 5.12.

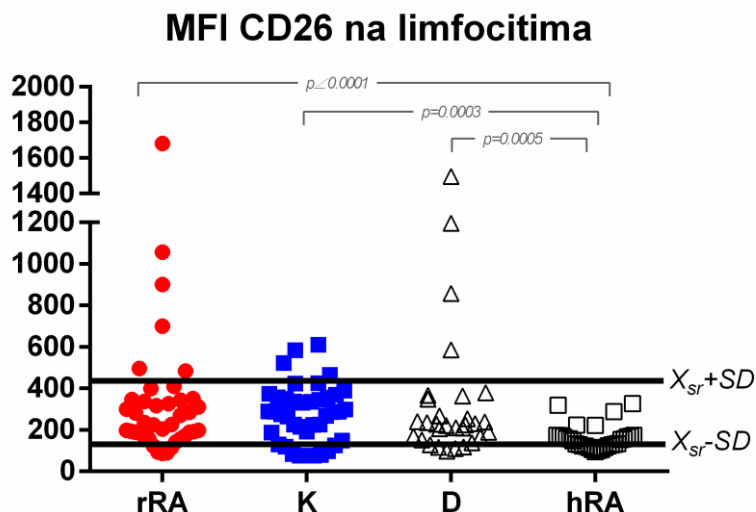


Grafik 5.10. Učestalost CD26+ limfocita u populaciji leukocita (t) kod bolesnika sa ranim reumatoidnim artritisom (rRA), zdravim kontrolama (K), kod bolesnika sa degenerativnim oboljenjima zglobova (D) i kod bolesnika sa hroničnim reumatoidnim artritisom (hRA).



Grafik 5.11. Učestalost CD26+ limfocita u populaciji limfocita (t) kod bolesnika sa ranim reumatoidnim artritisom (rRA), zdravim kontrolama (K), kod bolesnika sa

degenerativnim oboljenjima zglobova (D) i kod bolesnika sa hroničnim reumatoidnim artritisom (hRA).



Grafik 5.12. Srednji intenzitet fluorescencije (MFI) ekspresije CD26 na površini limfocita kod bolesnika sa ranim reumatoidnim artritisom (rRA), zdravim kontrolama (K), kod bolesnika sa degenerativnim oboljenjima zglobova (D) i kod bolesnika sa hroničnim reumatoidnim artritisom (hRA).

Prosečne vrednosti procenta CD26+ limfocita kod pacijenata sa ranim RA bile su niže u odnosu na prosečne vrednosti zdravih kontrola, ali ova razlika nije bila značajna ($p=0.162$). Dalje, procenat CD26+ limfocita kod pacijenata sa hroničnim RA je bio značajno veći u odnosu na grupu ranog reumatoidnog artritisa ($p=0.046$), a nije uočena razlika između grupe pacijenata sa hroničnim RA i zdravih kontrola, kao ni sa grupom bolesnika sa degenerativnim oboljenjima zglobova. Procenat CD26+ limfocita se nije razlikovao ni između grupe bolesnika sa ranim RA i grupe degenerativnog reumatizma. Ekspresija CD26 molekula (MFI) na površini limfocita kod pacijenata sa ranim reumatoidnim artritisom se nije značajno razlikovala od ekspresije ovog molekula kod zdravih kontrola ($p=0.338$). Međutim, MFI CD26 na limfocitima kod pacijenata sa hroničnim reumatoidnim artritisom je bila značajno niža u poredjenju sa vrednošću ovog pokazatelja kod pacijenata sa ranim reumatoidnim artritisom, zdravih kontrola i kod bolesnika sa degenerativnim reumatizmom ($p<0.0001$, $p=0.0003$, $p=0.0005$, respektivno).

Analiza procenta limfocita pokazala je da pacijenti sa ranim RA i hroničnim RA imaju značajno niži procenat ovih ćelija u krvi u odnosu na zdrave osobe ($p=0.002$, $p=0.0001$, respektivno), ali i u odnosu na grupu bolesnika sa degenerativnim oboljenjima zglobova ($p=0.0072$, $p=0.0011$). Upravo ovaj sniženi procenat limfocita bi mogao biti razlog smanjenog procenta CD26+ ćelija u ukupnoj populaciji leukocita.

4.4.2 Ekspresija CD26 antigena na monocitima

Učestalost CD26+ monocita u populaciji monocita i vrednosti ekspresije CD26 na monocitima u grupama ispitanika prikazani su u tabeli 14.

Tabela 14. Učestalost CD26+ monocita u populaciji monocita i srednji intenzitet fluorescencije ekspresije CD26 na površini monocita kod bolesnika sa ranim reumatoidnim artritismom (rRA), kod zdravih kontrola (K), kod bolesnika sa degenerativnim oboljenjima zglobova (D) i kod bolesnika sa hroničnim reumatoidnim artritismom (hRA).

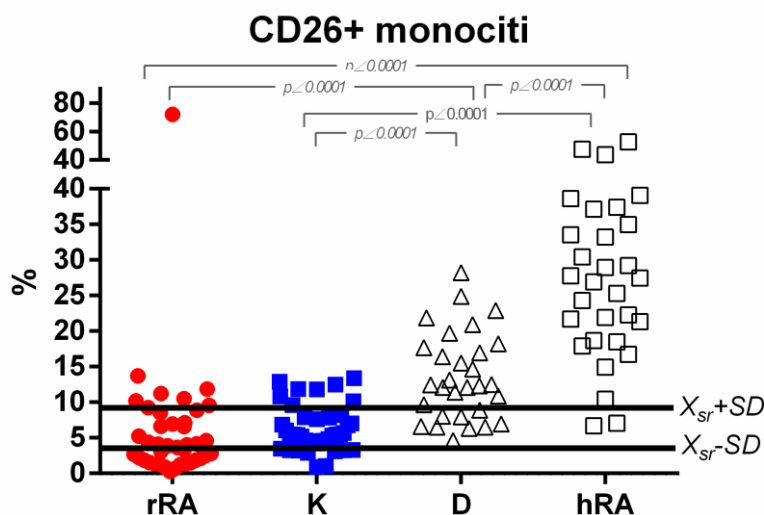
Grupe ispitanika	CD26+ Mo	MFI CD26 Mo	Mo %
rRA	46.6±11.9	353.4±816.1	2.0±1.9
K	50.3±11.9	345.4±785.5	1.8±1.4
D	50.9±2.1	398.4±254.2	1.7±0.1
hRA	52.8±13.4*	52.4±30.9**	2.4±1.4

* $p < 0.0001$ u odnosu na pacijente sa rRA, $p < 0.0001$ u odnosu na zdrave osobe

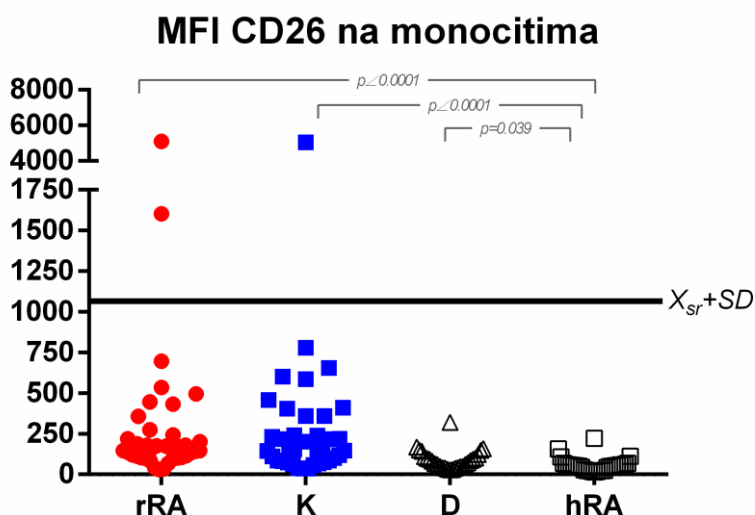
** $p < 0.0001$ u odnosu na pacijente sa ranim RA, $p < 0.0001$ u odnosu na zdrave osobe, $p = 0.039$ u odnosu na pacijente sa degenerativnim reumatizmom

Nisu uočene značajne razlike u procentu CD26+ monocita između grupe bolesnika sa ranim RA i grupe zdravih osoba ($p=0.904$). Međutim, značajno veći procenat CD26+ monocita zabeležen je kod osoba sa degenerativnim reumatizmom i kod bolesnika sa hroničnim RA u odnosu na pacijente sa ranim RA ($p < 0.0001$, $p < 0.0001$, respektivno).

Razlika u ispitivanom pokazatelju je bila značajna i izmedju grupe hroničnog RA i degenerativne grupe obolelih ($p < 0.0001$), ali i izmedju kontrolnih grupa zdravih i obolelih od degenerativnog reumatizma ($p < 0.0001$). Podaci prikazani na grafikonu 5.13.



Grafik 5.13. Učestalost CD26+ monocita u populaciji monocita kod bolesnika sa ranim reumatoidnim artritisom (rRA), kod zdravih kontrola (K), kod bolesnika sa degenerativnim oboljenjima zglobova (D) i kod bolesnika sa hroničnim reumatoidnim artritisom (hRA).

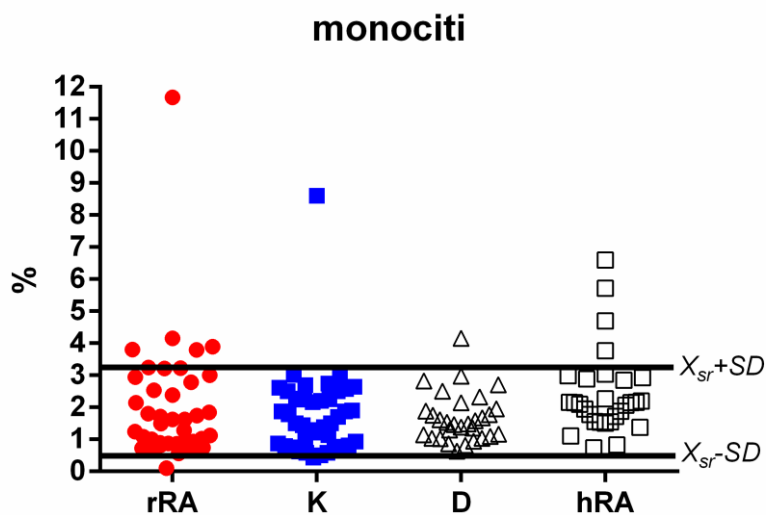


Grafik 5.14. Srednji intenzitet fluorescencije (MFI) ekspresije CD26 na površini monocita kod bolesnika sa ranim reumatoidnim artritisom (rRA), kod zdravih kontrola

(K), kod bolesnika sa degenerativnim oboljenjima zglobova (D) i kod bolesnika sa hroničnim reumatoidnim artritismom (hRA).

Analiza ekspresije DPPIV/CD26 molekula na površini monocita nije pokazala značajnu razliku izmedju pacijenata sa ranim RA i zdravih dobrovoljaca. Dalje, MFI CD26 ekspresije na monocitima bio je značajno niži kod pacijenata sa hroničnim RA u odnosu na grupu pacijenata sa ranim RA ($p < 0.0001$), ali i u odnosu na grupu zdravih osoba ($p < 0.0001$) i osoba sa degenerativnim reumatizmom ($p = 0.039$). Nije uočena značajna razlika u ekspresiji CD26 na monocitima izmedju ispitanika sa ranim RA i ispitanika iz grupe degenerativnih oboljenja zglobova ($p = 0.8751$).

Procenat monocita ispitanika u svim studijskim grupama nije bio značajno različit ($p = 0.09$), podaci prikazani na grafiku 5.15.



Grafik 5.15. Učestalost monocita kod bolesnika sa ranim reumatoidnim artritismom (rRA), kod zdravih kontrola (K), kod bolesnika sa degenerativnim oboljenjima zglobova (D) i kod bolesnika sa hroničnim reumatoidnim artritismom (hRA).

4.5 Enzimaska aktivnost DPPIV u serumu

Rezultati određivanja enzimske aktivnosti DPPIV u serumu u ispitivanim grupama prikazani su u tabeli 15. Aktivnost DPPIV izražena je u IU/L.

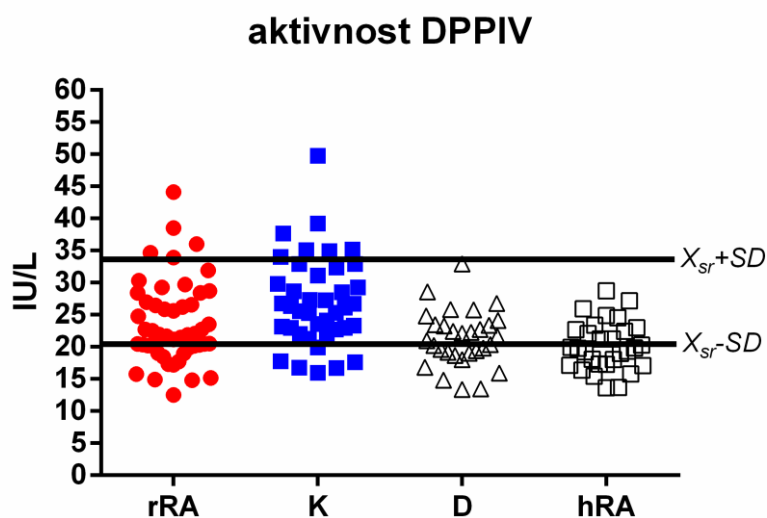
Tabela 15. Enzimaska aktivnost DPPIV u serumu bolesnika sa ranim reumatoidnim artritismom (rRA), kod bolesnika sa degenerativnim promenama u zglobovima (D), kod zdravih osoba (K) i kod bolesnika sa hroničnim reumatoidnim artritismom (hRA).

Grupe ispitanika	aktivnost DPPIV
rRA ^a	23.7±6.5
K	27.0±7.0
D ^b	21,3±0,8
hRA ^c	20.1±3.8

^a p=0.024 u odnosu na zdrave ispitanike
^b p< 0.0001 u odnosu na zdrave ispitanike
^c p< 0.0001 u odnosu na zdrave ispitanike

Merenje aktivnosti DPPIV u serumu ispitanika pokazalo je značajno nižu serumsku aktivnost ovog enzima kod pacijenata sa ranim RA, hroničnim RA, ali i kod bolesnika sa degenerativnim oboljenjima zglobova u odnosu na zdrave ispitanike (p=0.024 za rani RA, p< 0.0001 za hronični RA i p< 0.0001 za obolele od degenerativnog reumatizma). Smanjena DPPIV aktivnost u serumu uočena je kod 12 pacijenata sa ranim reumatoidnim artritismom, kod 17 osoba sa hroničnim reumatoidnim artritismom i kod 12 bolesnika sa degenerativnim reumatizmom. U kontrolnoj grupi zdravih ispitanika smanjenu serumsku aktivnost DPPIV imalo je samo 6 osoba (donja granična vrednost dobijena od zdravih kontrola kao $X_{sr}-SD$ je bila 20.03 IU/L).

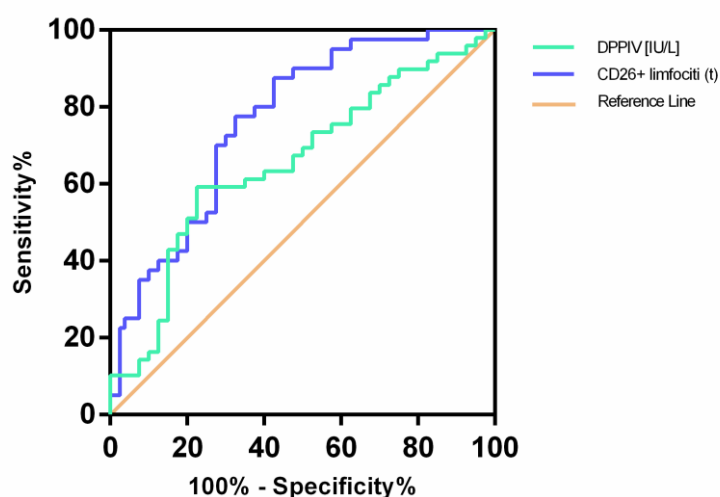
Distribucija vrednosti za enzimsku aktivnost DPPIV u serumu bolesnika sa ranim reumatoidnim artritismom, kod bolesnika sa degenerativnim promenama u zglobovima, kod zdravih osoba i kod bolesnika sa hroničnim reumatoidnim artritismom prikazana je na grafiku 5.16.



Grafik 5.16. Enzimaska aktivnost DPPIV u serumu kod bolesnika sa ranim reumatoidnim artritismom (rRA), kod zdravih kontrola (K), kod bolesnika sa degenerativnim oboljenjima zglobova (D) i kod bolesnika sa hroničnim reumatoidnim artritismom (hRA).

Povišena serumska aktivnost ovog enzima uočena je kod 7 zdravih dobrovoljaca i kod 4 pacijenta sa ranim reumatoidnim artritismom (gornja granična vrednost je bila 34.03 IU/L, $X_{sr}+SD$). Nijedan ispitanik iz grupe hroničnog reumatoidnog artritisa i grupe degenerativnih oboljenja zglobova nije imao povišenu serumsku aktivnost DPPIV.

Kako bismo ocenili dijagnostički kvalitet varijabli za serumsku aktivnost i ekspresiju DPPIV, koristili smo ROC (The Receiver Operating Characteristic) analizu koja je kontrolisana putem površine ispod krive (AUC) sa manuelno izabranim najboljim graničnim vrednostima za grupu pacijenata. Ova analiza je pokazala da je optimalna granična vrednost za serumsku aktivnost DPPIV ($p=0.023$, AUC 0.668) ona od 25 IU/L koja ima senzitivnost od 65% i specifičnost od 60%. Drugi pokazatelj ekspresije CD26 koji je pokazao značajnost je procenat CD26+ limfocita u populaciji leukocita ($p=0.01$, AUC 0.750), sa optimalnom graničnom vrednošću (9.7%) koja je odgovarala senzitivnosti od 85.4% i specifičnosti od 57.5%.



Grafik 5.17. ROC kriva i najbolja granična vrednost enzimske aktivnosti DPPIV u serumu i CD26+ limfocita u populaciji leukocita (t) u odnosu na postojanje ranog reumatoidnog artritisa.

5.5.1 Pacijenti sa ranim RA vs pacijenti sa veoma ranim RA

Pacijenti sa ranim RA koji nisu bili u grupi vrlo ranog reumatoidnog artritisa (ne-vrRA) su imali značajno nižu serumsku aktivnost DPPIV u odnosu na pacijente iz grupe veoma ranog RA (vrRA) ($p=0.032$, srednja vrednost DPPIV aktivnosti 21.7 IU/L vs 25.5 IU/L, respektivno). U pogledu ekspresije CD26 na mononuklearnim ćelijama periferne krvi, nije uočena značajna razlika između ove dve grupe pacijenata. Dodatno, serumska aktivnost i ekspresija CD26 na limfocitima se nije razlikovala kod bolesnika sa niskom/umerenim i visokom aktivnošću bolesti.

4.6 Povezanost kliničkih karakteristika ranog reumatoidnog artiritisa sa ispitivanim pokazateljima

4.6.1 Povezanost kliničkih karakteristika bolesti i imunoreaktivnosti na proteine iz hrane

Aktivnost bolesti (DAS28) nije bila povezana ni sa humoralnim ni sa celularnim imunitetom na proteine hrane. Međutim, broj otečenih zglobova (komponenta DAS28 skora) je pokazao direktnu povezanost sa nivoom IgA i IgM antitela na glijadin ($p=0.028$,

$\rho=0.311$ za IgA i $p=0.020$, $\rho=0.329$ za IgM antitela). Druga komponenta DAS28 skora, pacijentova procena aktivnosti bolesti – VAS, bila je granične povezanosti sa procentom CD16+ limfocita ($p=0.056$, $\rho=0.308$). Dalje, koncentracija C reaktivnog proteina bila je značajno povezana sa nivoom anti-glijadinskih IgA antitela ($p=0.012$, $\rho=0.374$), dok je trajanje simptoma bolesti bilo u granično značajnoj pozitivnoj korelaciji sa procentom CD16+ granulocita.

Ispitivana korelacija izmedju antitela na proteine hrane pokazala je da postoji direktna povezanost antitela IgA klase na mleko sa antitelima IgG i IgM klase na ovaj antigen ($p<0.0001$, $\rho=0.493$ za IgG i $p<0.0001$, $\rho=0.479$ za IgM). Dodatno, ova antitela su korelirala i sa anti-glijadinskim antitelima IgA i IgM klase ($p=0.043$, $\rho=0.288$ i $p=0.015$, $\rho=0.341$, respektivno). Uočena je pozitivna povezanost IgA antitela na proteine iz kravljeg mleka sa sitmulacijom limfocita u prisustvu ovog antigena ($p=0.019$, $\rho=0.336$). Antitela IgA klase na glijadin su korelirala sa nivoom anti-glijadinskih antitela u IgG klasi ($p=0.036$, $\rho=0.297$), dok su IgG antitela na glijadin pokazala direktnu povezanost sa procentom CD16+ limfocita ($p=0.025$, $\rho=0.360$), ali i sa ekspresijom CD16 molekula na površini granulocita ($p=0.023$, $\rho=0.363$). Ekspresija CD16 molekula na NK ćelijama (CD16+CD56+) nije bila povezana sa ispitivanim pokazateljima humoralne i celularne imunoreaktivnosti na proteine hrane.

4.6.2 Povezanost kliničkih karakteristika bolesti i serumske aktivnosti i ekspresije DPPIV/CD26 kod pacijenata sa ranim reumatoidnim artritisom

Analiza korelacije podataka je pokazala da postoji značajna negativna povezanost izmedju trajanja simptoma i serumske aktivnosti DPPIV, što je duže trajanje simptoma to je serumska aktivnost ovog enzima manja ($p=0.02$, $\rho=-0.308$). Aktivnost bolesti nije pokazala značajnu povezanost sa ekspresijom CD26 na mononuklearnim ćelijama krvi, niti sa serumskom aktivnošću DPPIV. Medjutim, granična povezanost je uočena izmedju koncentracije C reaktivnog proteina i serumske aktivnosti DPPIV ($p=0.057$, $\rho=-0.268$). U celoj grupi pacijenata sa ranim reumatoidnim artritisom nije zapažena povezanost CD26 ekspresije i DPPIV aktivnosti u serumu sa RF/ACPA antitelima. Ali, u grupi RF pozitivnih pacijenata uočena je direktna korelacija izmedju titra RF i aktivnosti DPPIV u serumu ($p=0.03$, $\rho=0.367$). Dodatno, kod RF pozitivnih pacijenata značajno povezani su

bili trajanje simptoma bolesti i ekspresija CD26 molekula na monocitima ($p=0.03$, $\rho = 0.406$). Pacijenti sa prisutnim ACPA antitelima nisu pokazali povezanost ovih antitela sa ekspresijom CD26 molekula, niti sa serumskom aktivnošću DPPIV enzima, ali jaka negativna povezanost je primećena između procenta CD26+ limfocita u populaciji leukocita i broja otečenih zglobova ($p= 0.03$, $\rho = -0.821$). Nizak titar ACPA antitela i procenat CD26+ limfocita u populaciji leukocita je pokazao jaku negativnu korelaciju ($p=0.01$, $\rho = -0.883$).

Procenat CD26+ limfocita u populaciji leukocita direktno je korelirao sa procentom CD26+ limfocita ($p < 0.001$, $\rho = 0.445$), ali i sa ekspresijom ovog molekula na limfocitima ($p=0.046$, $\rho = 0.213$), a pogotovo jaku pozitivnu povezanost pokazao je sa procentom ukupnih limfocita ($p < 0.001$, $\rho = 0.811$). Procenat ukupnih limfocita nije bio povezan sa aktivnošću DPPIV u serumu.

4.6.3 Povezanost pokazatelja imunoreaktivnosti na proteine hrane sa serumskom aktivnošću i ekspresijom DPPIV/CD26 kod pacijenata sa ranim reumatoidnim artritismom

Ekspresija CD26 molekula na površini limfocita pokazala je značajnu pozitivnu povezanost sa nivoom IgA i IgG antitela na mleko ($p=0.030$, $\rho= -0.344$ za IgA, $p=0.037$, $\rho= -0.330$ za IgG)., dok su IgM antitela na ovaj antigen bila direktno povezana sa sa procentom CD26+ monocita ($p=0.024$, $\rho= 0.347$).

Između nivoa anti-glijadinskih antitela IgA klase i procenta CD26+ limfocita uočena je negativna povezanost ($p=0.011$, $\rho= -0.399$), dok su IgG antitela na ovaj antigen bila u korelaciji sa CD26+ limfocitima u populaciji leukocita ($p=0.05$, $\rho= -0.312$).

Primećena je značajna povezanost između ekspresije CD16 molekula na površini limfocita sa ekspresijom CD26 na limfocitima ($p=0.027$, $\rho= 0.355$).

5. DISKUSIJA

Mukoza gastrointestinalnog trakta je stalno izložena ogromnom broju egzogenih antigena kakvi su hrana, metaboliti, patogene bakterije, normalna flora intestinalnog trakta. Kako bi se odvojili nutrijenti od potencijalno oštećujućih antigena, brojne strukturne i imunološke determinante su uključene u proces koji se naziva oralna tolerancija (Vickery i sar, 2011). Strukturne komponente ovog procesa odnose se na postojanje tzv. mukoznog štita (eng. *mucosal firewall*) koga čine epitelne ćelije creva, mukus i antimikrobni peptidi koje one luče i imunoglobulin IgA (Macpherson i sar, 2009). Mukus predstavlja fizičku barijeru na luminalnoj strani crevnog epitela, te tako onemogućava direktan kontakt stranih antigena sa sluznicom creva. Antimikrobni peptidi kakvi su α -defensini koji se konstitutivno luče od strane epitela ili kao što je lektin RegIII γ koji ima direktni baktericidni efekat na Gram - pozitivne bakterije (Cash i sar, 2006; Brandl i sar, 2008; Mukherjee i sar, 2009; Ismail i sar, 2011), doprinose održavanju distance između crevnog epitela i komensalnih bakterija crevnog trakta, tzv “demilitarizovane zone” (Vaishnava i sar, 2011). IgA imunoglobulin potiče od B ćelija koje se nalaze u Peyerovim pločama submukoze creva, a kojima epitelne dendritske ćelije prezentuju prepoznate antigene iz lumena creva (Macpherson i Uhr, 2004). Karakteristika ovakvog odgovora je da nema nastanka memorijskih klonova imunskih ćelija, što omogućava mukoznom imunom sistemu da odgovori na veoma promenljive antigene iz lumena creva (Hapfelmeier i sar, 2010). Imunološke komponente oralne tolerancije odnose se na prisustvo imunskih ćelija u *lamini propriae* crevne sluznice koje imaju važnu ulogu u razdvajanju korisnih od opasnih antigena. Tu su najpre makrofagi i epitelne dendritske ćelije, koje su prva linija odbrane. Makrofagi direktno eliminišu strani sadržaj, dok dendritske ćelije fagocituju antigen i prezentuju ga T i B ćelijama u *lamini propriae* sluzokože creva, ali i limfocitima u regionalnom limfnom čvoru (Belkaid i Hand, 2014). Nakon prezentacije dolazi do diferencijacije T ćelija u regulatorne T ćelije (T regs) ili u proinflamatorno orjentisane Th17 ćelije. U kom će pravcu ići ova ravnoteža, zavisi od lokalnih činilaca kakvi su metaboliti, citokini, hormoni i od odgovora lokalnih imunskih ćelija.

Novija istraživanja ukazuju da mikroflora creva ima jednu od važnijih uloga u oblikovanju imunskog odgovora već u ranom detinjstvu (Kau i sar, 2011), a u adultnom

dobu može uticati na regulaciju imunskog odgovora (Feng i Elson, 2011). Crevna mikroflora predstavlja najveću mikrobnu zajednicu sa preko 10^{14} bakterija, među kojima se izdvajaju dva roda: *Bacteroides spp* (Gram negativne bakterije) i *Firmicutes spp* (Gram pozitivni organizmi), mada u nekih individua rodovi *Actinobacteria spp* i *Protobacteria spp* mogu biti dominantni sojevi u crevima (Eckburg i sar, 2005; Zoetendal i sar, 2006; Louis i sar, 2007). Ljudska crevna mikroflora poseduje više gena nego humani genom, a zajedno se smatraju “super-organizmom” (Ley i sar, 2006). Intestinalna mikroflora značajno pomaže preživljavanju ljudskog organizma: razlaže kompleksne ugljene hidrate kakvi su skrob ili biljna vlakna, kao i različite proteine do jednostavnih ugljenih hidrata, masnih kiselina kratkih lanaca, aminokiselina, etanola i gasova, olakšavajući tako apsorpciju hranljivih materija. Pored toga, produkuje vitamine (vitamin B12, piridoksal fosfat – aktivnu formu vitamina B6, vitamin B5, vitamin B3, biotin, tetrahidrofolat, vitamin K) i konvertuje polifenole u aktivne metabolite (Macfarlane i Macfarlane, 2003; Falony i sar, 2006). Dodatno, pokazano je da korišćenje prebiotika (oligofruktoza) povećava broj intestinalnih bakterija, pogotovo bifidobakterija, pojačavajući tako integritet epitelijalne barijere putem povećane ekspresije tzv. bliskih veza (eng. “*tight junctions*”) (Cani i sar, 2008). Na taj način, crevna mikroflora sprečava proboj patogenih bakterija u submukozu (Bosscher i sar, 2009).

Veoma važna uloga komensalnih bakterija crevnog trakta jeste indukcija i održavanje oralne tolerancije. Crevna sluznica je svakodnevno izložena ogromnom broju antigena porekla crevne mikroflore, hrane, metabolita i patogena. Kako bi se održala tkivna homeostaza, potrebna je veoma složena mreža regulatornih puteva. Komensali crevne flore su ključni i aktivni induktori ovih regulatornih odgovora. Naime, pokazano je da uspostavljanje imunske tolerancije (aktivne supresije inflamatornih odgovora na hranu i druge oralno unesene antigene) nije moguće u odsustvu signala iz crevne flore (Kiyono i sar, 1982; Sudo i sar, 1997; Weiner i sar, 2011). Poslednjih godina velika pažnja posvećena je Foxp3+ regulatornim T ćelijama (eng. *Forkhead box P3*, Foxp3+) koje su preuzele glavnu ulogu u održavanju imunske tolerancije. Ove ćelije održavaju i perifernu i mukoznu homeostazu i njen prekid može rezultovati gubitkom oralne tolerancije i razvojem abnormalnog efekorskog odgovora u crevima (Worbs i sar, 2006; Mucida i sar, 2007; Josefowicz i sar, 2012). Iako ove T regulatorne ćelije nastaju i diferenciraju se u timusu, gastrointestinalni trakt predstavlja mesto nastanka indukovanih T regulatornih

ćelija kao odgovor na oralne antigene (Coombes i sar, 2007; Mucida i sar, 2007; Sun i sar, 2007). Smatra se da optimalno održavanje tolerancije na komensalne bakterije i antigene spoljne sredine zahteva udruženo delovanje T regulatornih ćelija iz timusa i iz gastrointestinalnog trakta (Lathrop i sar, 2011; Josefowicz i sar, 2012; Cebula i sar, 2013). Ova mogućnost crevne sluznice da indukuje T regulatorne ćelije može se delom objasniti i prisustvom posebnih populacija antigen-prezentujućih ćelija kakve su CD103+CD11b+ dendričke ćelije, koje imaju sposobnost da proizvode TGF- β i retinoičnu kiselinu (metabolit vitamina A) čime indukuju nastanak T regulatornih ćelija (Coombes i sar, 2007; Mucida i sar, 2007; Sun i sar, 2007).

Sve je veći broj radova koji ukazuje da sastav i funkcija komensalnih bakterija u crevima utiče delom na nutricionu vrednost hrane, ali i obrnuto, da hrana koju svakodnevno unosimo može oblikovati crevni mikrobiom (Goodman i sar, 2011; Muegge i sar, 2011). Veza između metabolizma nutrijenata i imunskog sistema opisana je na više nivoa, počevši od endokrine signalizacije do direktnog detektovanja prisustva nutrijenata od strane imunskih ćelija (Kau i sar, 2011). Tako leptin, plejotropni citokin koji reguliše apetit, može da indukuje predominantno odgovor Th1 ćelija u odnosu na Th2 ćelije (La Cava i Matarese, 2004), istovremeno inhibišući proliferaciju T regulatornih ćelija (De Rosa i sar, 2007). Niski nivoi leptina u periodima nutritivne deprivacije (dijete) može biti odgovoran za smanjeni celularni imunitet (Lord i sar, 1998). Ovaj citokin utiče i na ćelije urođenog imuniteta, od aktivacije neutrofila i njihove migracije, do aktivacije monocita i makrofaga (La Cava i Matarese, 2004). Nutrijenti kao što su glukoza i aminokiseline (triptofan, arginin, glutamin i cistein) direktno utiču na metaboličke potrebe T ćelija, tako delujući i na njihovu aktivaciju i funkciju. Poznato je da stimulacija T ćelijskog receptora (TCR) u odsustvu kostimulatornog signala vodi T ćeliju u anergiju, a upravo ta nemogućnost kostimulacije se dovodi u vezu sa smanjenim preuzimanjem aminokiselina i gvožđa od strane T ćelija i posledičnim poremećajem ćelijskog metabolizma u samoj ćeliji (Fox i sar, 2005; Michalek i Rathmell, 2010). Masne kiseline kratkih lanaca i njihov uticaj na crevnu mikrofloru su jedan od bolje ispitivanih primera kako ishrana i mikrobiom utiču na oblikovanje imunskog odgovora. Masne kiseline kratkih lanaca (butirat, acetat) su krajnji produkt razgradnje biljnih polisaharida koje ljudski organizam nije u stanju da razloži, jer humani genom ne kodira hidrolaze i polisaharidne lijaze potrebne za presecanje glikozidnih veza prisutnih u ovim glikanima. Ove enzime

produkuju crevne bakterije. Koncentracija masnih kiselina kratkih lanaca u lumenu creva zavisi od količine unetih vlakana putem ishrane, a to utiče dalje na sastav crevne mikroflore (Lupton 2004). Pored toga što predstavljaju izvor energije za domaćina, masne kiseline kratkih lanaca utiču značajno i na imunski odgovor domaćina. Niski nivoi butirata mogu modifikovati profil produkcije citokina od strane Th ćelija u submukozni creva (Bird i sar, 1998) i pomoći u očuvanju integriteta epitelne barijere (Peng i sar, 2007). Produkcija acetata od strane crevnog mikrobioma putem direktne aktivacije receptora vezanog za G-protein GPR43 smanjuje intestinalnu inflamaciju (Maslowski i sar, 2009). Istraživanje Fukude i sar. je pokazalo važnu ulogu acetata u prevenciji infekcije enteropatogenom *Escherichia coli* (0157:H7), putem sposobnosti acetata da održi stabilnu funkciju epitelne barijere (Fukuda i sar, 2011). Vitamin A se u crevima metaboliše u svoj aktivni oblik retinoičnu kiselinu koja putem *Toll like Receptor 2* (TLR2) receptora može da aktivira dendritske ćelije u crevnoj mukozni i indukuje diferencijaciju T regulatornih ćelija (Agace i Persson, 2012). Sa druge strane, retinoična kiselina inhibira polarizaciju u pravcu Th17 ćelija i tako održava ravnotežu između regulatornih i efektornih ćelija u mukozni creva (Wohlfert i Belkaid, 2010).

Poznato je da ćelije urodjene imunosti mogu prepoznati posebne sekvence mikroorganizama, tzv MAMP (eng. *microbe-associated molecular patterns*) putem receptora na površini ovih ćelija (TLR4, mTOR, AHR). Novija istraživanja ukazuju na mogućnost ovih ćelija da putem istih receptora prepoznaju i prisustvo različitih nutrijenata u lumenu creva. Toll-like Receptor 4 (TLR4) može detektovati prisustvo slobodnih masnih kiselina (Nguyen i sar, 2007), a adenzin tri-fosfat (ATP) predstavlja važni aktivator inflamazoma (Mariathasan i sar, 2006). Serin/treonin kinaza mTOR (eng. *mammalian target of rapamycin*) utiče i na urodjeni i na stečeni imunski sistem: deluje na maturaciju i efektorsku aktivnost dendritskih ćelija, inhibiše razvoj T regulatornih ćelija, promovise diferencijaciju Th1 i Th17 ćelija, reguliše funkciju CD8+ T ćelija i inhibira stvaranje memorijskih T ćelija (Thomson i sar, 2009; Araki i sar, 2010). Aril hidrokarbon receptor (AHR) menja diferencijaciju dendritskih ćelija (Platzer i sar, 2009), usmerava diferencijaciju Th17 i T regulatornih ćelija i menja njihovu aktivnost (Quintana i sar, 2008; Veldhoen i sar, 2008).

Pored uticaja nutrijenata, i sama crevna flora može menjati imunski odgovor. Dobro je poznat uticaj *Bacteroides fragilis*-a, bakterije koja je čest stanovnik intestinalne flore, na

inhibiciju Th17 diferencijacije. Polisaharid A ove bakterije putem TLR2 receptora direktno utiče na dendritske ćelije, koje preko IL-10 utiču na inhibiciju Th17 ćelija (Round i Mazmanian, 2010). Laktobacili (Agace i Persson, 2012) i bifidobakterije mogu usmeriti diferencijaciju dendritskih ćelija ka manje zreloom, nediferenciranom fenotipu (Davies i sar, 2009). Druge intestinalne bakterije mogu inhibirati signalni NF-KB put preko stalne stimulacije TLR receptora i povećane produkcije defensina (Zeng i sar, 2006). Sa druge strane, segmentirane filamentozne bakterije su u stanju da u murinim modelima autoimunog artritisa izazovu aktivaciju Th17 ćelija, putem IL-23 porekla dendritskih ćelija (Ivanov i sar, 2009). Dodatno, ove bakterije mogu stimulisati produkciju IgA imunoglobulina u crevima murinih modela autoimunskog artritisa (Macpherson i sar, 2012).

Prekid ili oštećenje oralne tolerancije može rezultovati aktivacijom imunskog odgovora u crevima koje potom, vodi u oboljenje. Jedan od načina prekida tolerancije jeste posttranslaciona modifikacija proteina koja se javlja pri različitim ćelijskim odgovorima kakvi su starenje, inflamacija, trauma i nekroza (Doyle i Mamula, 2012). Ovako izmenjene proteine mogu da fagocituju i obrade antigen prezentujuće ćelije koje potom novonastale modifikovane antigene prezentuju T i B limfocitima. Kao rezultat ove aktivacije dolazi do infiltracije tkiva autoreaktivnim ćelijama gde modifikovani antigen doprinosi daljoj amplifikaciji imunskog odgovora, što dovodi do nastanka autoimunosti. Danas su poznate brojne autoimunske bolesti kod kojih je autoantigen zapravo posttranslaciono modifikovani protein: fosforilisani α B - kristalin i citrulisani MBP protein u multiploj sklerozi, oksidovani β 2 - glikoprotein 1 u antifosfolipidnom sindromu, citrulisani vimentin, filagrin, fibrin, kolagen u reumatoidnom artritisu, oksidisani α - lanac insulina u dijabetes melitusu tip 1, modifikovani Pso27 u psorijazi, kolagen tip IV u *Goodpasteur*-ovoj bolesti (Doyle i Mamula, 2012). Jedna od bolje ispitanih posttranslacionih modifikacija proteina sa prekidom oralne tolerancije jeste deamidacija glutena putem tkivne transglutaminaze 2 u celijačnoj bolesti. Gluten je protein dugačkog lanca sa brojnim delovima bogatim prolinom. Zahvaljujući tome, gluten je visoko rezistentan na delovanje crevnih proteolitičkih enzima, te se dobar deo unetog glutena u vidu velikih polipeptidnih lanaca dugo resorbuje u crevima (Shan i sar, 2005). Raniji stavovi su bili da se gluten najvećim delom transportuje kroz epitelnu membranu paracelularnim putevima, kroz oštećene paracelularne bliske veze („tight junctions“)

između ćelija crevnog epitela (Schulzke i sar, 1998). Međutim, novija istraživanja su pokazala da se ovaj transport odigrava transcelularno i to pomoću solubilnog IgA (Lebreton i sar, 2012), gde se glutenski peptidi najpre vezuju za sekretorni IgA molekul i kao takav kompleks, preko površinskog CD71 molekula na luminalnoj strani enterocita, transportuju kroz ćelije epitela creva u submukozu (Schumann i sar, 2017). Nakon transporta, enzim tkivna transglutaminaza 2 (TTG2) koja je u crevima veoma aktivna, prepoznaje prolinske sekvence u glutenu i procesom deamidacije formira rezidue glutamata u glutenskom peptidu. Upravo ove rezidue predstavljaju epitop koji će se vezati za HLA-DQ2.5, HLA-DQ2.2 i HLA-DQ8. (u sklopu MHC molekula II klase) na površini antigen prezentujućih ćelija (Bergsens i sar, 2008) kakve su dendritske ćelije, makrofagi ali i intraepitelijalni B limfociti. Ovako prezentovan deamidovani gluten specifično aktivira CD4+ T limfocite koji počinju da luče IFN- γ i IL-21 (Ebert 2009) koji aktiviraju citotoksične intraepitelijalne limfocite zaslužne za oštećenje epitela i atrofiju vilusa. Pored toga, ove aktivirane T ćelije indukuju i aktivaciju B ćelija (Stamnaes i Sollid, 2015) koje zatim sekretuju anti-glijadinska antitela i antitela na tkivnu transglutaminazu (koja se koriste kao visoko senzitivno dijagnostičko sredstvo u celijačnoj bolesti). Dobro je ispitana reakcija B ćelija u celijačnoj bolesti koja se odnosi na produkciju IgA antitela na glijadin i/ili na tkivnu transaminazu (Heap i van Heel, 2009). Slično celijačnoj bolesti, u reumatoidnom artritisu dokazana je reakcija imunskog sistema na modifikovane proteine (antitela na peptide izmenjene citrulinacijom), kao i značajna povezanost sa alelima HLA sistema (HLA-DR) (Koning i sar, 2015). Slično celijakiji, i u reumatoidnom artritisu aktivacija T ćelija B ćelijskom prezentacijom antigena može imati važnu ulogu u patogenezi (Koning 2015).

Pored celijačne bolesti, Shor i saradnici su 2012. godine (Shor i sar, 2012) pokazali da su IgG antitela na glijadin prisutna kod bolesnika sa Kronovom bolešću, koja je autoimunsko oboljenje Th1/Th17 tipa (kao i rani reumatoidni artritis). U ovoj bolesti povećana produkcija IFN- γ od strane CD4 ćelija i aktiviranih makrofaga koji luče TNF- α i IL-12 imaju ulogu u hroničnoj intestinalnoj inflamaciji (Di Sabatino i sar, 2013). Manji broj radova je analizirao prisustvo antitela na glijadin u reumatoidnom artiritisu. Hvatum i saradnici (Hvatum i sar, 2006) su pokazali da su IgM antitela na glijadin u serumu značajno povišeni kod pacijenata sa RA u odnosu na zdrave kontrole. Novija studija (Li i sar, 2016) je pokazala da su i nivoi IgG antitela na kravlje mleko značajno povišeni kod

pacijenata sa RA. Rezultati u našoj studiji su pokazali da su povišeni nivoi IgG antitela na glijadin, ali i IgA i IgM antitela na proteine kravljeg mleka prisutni kod pacijenata sa ranim reumatoidnim artritismom. Dodatno, uočeni su i povišeni nivoi IgG antitela na ovaj antigen kod pacijenata sa veoma ranim reumatoidnim artritismom. Ovi podaci se slažu sa prethodno publikovanim radovima o povišenoj imunoreaktivnosti na glijadin i na kravlje mleko (O'Farrelly i sar, 1988; Paimela i sar, 1995).

Antitela u IgG klasi imaju posebno mesto u patogenezi reumatoidnog artritisa (ACPA su u najvećem procentu upravo ove klase imunoglobulina). IgG antitela mogu imati veoma raznovrsne efekte, medju najznačajnijima su opsonizacija i fagocitoza, aktivacija komplementa, neutralizacija toksina, uloga u antitelima posredovanoj ćelijskoj citotoksičnosti (ADCC), ali i u transkripciji gena za citokine i oslobađanje zapaljenjskih medijatora (Dijstelbloem i sar, 2001). Ova antitela ostvaruju svoj efekat putem vezivanja za IgG receptore, tzv. Fc γ R receptore. Postoje tri klase ovih receptora: Fc γ IR (CD64), Fc γ RII (CD32) i Fc γ RIII (CD16). Receptori Fc γ RII i Fc γ RIII mogu se naći u vidu izoformi: a, b i c za Fc γ RII, a Fc γ RIII u obliku a i b izoforme. Fc γ RI je visoko afinitetni receptor koji prevashodno vezuje monomerne molekule IgG, dok su Fc γ RII i Fc γ RIII receptori niskog afiniteta koja vezuju IgG molekule u imunskim kompleksima (Hulett i Hogarth, 1994). Svi Fc γ R receptori vrše aktivaciju, osim Fc γ RIIb. Receptori za IgG antitela se nalaze na površini brojnih ćelija imunskog sistema: na monocitima, makrofagima, dendritskim ćelijama, neutrofilima, prirodnim ubica ćelijama (eng. *Natural killer cells*, NK) i na B limfocitima (Parren i sar, 1992; van de Winkel i Capel, 1993; Boruchov i sar, 2005; Dhodapkar i sar, 2005). Koristeći animalne modele, pokazano je da Fc γ R, a pogotovo Fc γ RIII (CD16) imaju ključnu ulogu u indukciji artritisa kod miševa, dok Fc γ RIIb receptori imaju protektivno dejstvo na zglobove (Kleinau i sar, 2000; van Lent i sar, 2000; DÍaz de Ståhl i sar, 2002). Magnusson je sa svojom grupom saradnika (Magnusson i sar, 2014) utvrdila da nivo ACPA antitela IgG klase koreliše sa ekspresijom Fc γ RIII receptora na monocitima pacijenata sa reumatoidnim artritismom, kao i da monociti na svojoj površini imaju značajno više vezanog IgG u odnosu na zdrave kontrole.

Važno je istaći da se određeni polimorfizmi gena koji kodiraju receptore za IgG značajno češće javljaju kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom nego kod zdravih kontrola. Morgan i saradnici su pokazali da Britanci, Pakistanci i Indijci nosioci polimorfizma

158V/F gena za Fc γ RIIIa imaju povećan rizik za razvoj reumatoidnog artritisa nego osobe koje nisu nosioci ovog alela (Morgan i sar, 2000; Morgan i sar, 2006). Isti autori su uočili i da je težina bolesti povezana sa pomenutim alelom kod Britanaca. Polimorfizam Fc γ RIIIa 158V/F prisutan je i u kohorti španskih bolesnika sa reumatoidnim artritisom (Nieto i sar, 2000), polimorfizam Fc γ RIIIa 158VV u kohorti švedskih bolesnika (Kastbom i sar, 2005). U Japanu, nosioci „podeljenog epitopa“ (eng. *Shared epitope*, SE) HLA-DRB1 i polimorfizma 176 F/F gena za Fc γ RIIIa imaju povećan rizik za nastanak reumatoidnog artritisa (Kyogoku i sar, 2002). Meta analiza Lee-ja i saradnika je polimorfizam Fc γ RIIa i Fc γ RIIIa dovela u vezu sa pojavom reumatoidnog artritisa, dok nisu potvrdili povezanost ove bolesti sa Fc γ RIIIb polimorfizmom (Lee i sar, 2015).

U našem istraživanju uočen je sniženi procenat CD16⁺ limfocita i NK ćelija (CD16⁺CD56⁺) kod pacijenata sa ranim reumatoidnim artritisom. Takodje, ekspresija ovih površinskih molekula na limfocitima je bila povećana kod pacijenata sa ranim reumatoidnim artritisom u odnosu na kontrolnu grupu zdravih. Ovi rezultati su delimično u saglasnosti sa ranije objavljenom studijom Aramaki i saradnika (Aramaki i sar, 2009), koji su pokazali da kod pacijenata sa hroničnim reumatoidnim artritisom postoji snižen procenat limfocita i NK ćelija, ali i snižena ekspresija CD16 molekula na površini NK ćelija. Ukoliko se uzme u obzir da je ispitivana grupa pacijenata u našem istraživanju bila sa ranim reumatoidnim artritisom, uočena povišena ekspresija CD16 molekula na limfocitima i NK ćelijama može biti deo ranih događaja u patogenezi reumatoidnog artritisa. Interesantno je da se procenat CD16⁺ limfocita kod bolesnika sa degenerativnim oboljenjima zglobova nije razlikovao u odnosu na kontrolnu grupu zdravih dobrovoljaca, ali je gustina CD16 molekula na limfocitima bila značajno viša nego kod zdravih osoba. Naši rezultati potvrđuju ranije publikovani stav Stock-a i sar., da aktivacija IgG receptora nema ulogu u oštećenju hrskavice kod eksperimentalne osteoartroze (Stock i sar, 2015).

Procenat CD16⁺ granulocita se nije razlikovao izmedju ispitivanih grupa u našoj studiji, ali su pacijenti sa ranim reumatoidnim artritisom imali značajno veću ekspresiju CD16 molekula na granulocitima u odnosu na kontrolnu grupu zdravih osoba. Slične rezultate publikovani su i ranije (Paoliello-Paschoalato i sar, 2014).

Korelaciona analiza pokazatelja imunoreaktivnosti na proteine iz hrane u našem istraživanju pokazala je pozitivnu povezanost izmedju IgG antitela na glijadin i procenta

CD16+ limfocita, ali i direktnu povezanost sa ekspresijom ovog molekula na površini granulocita. Ovo je prva studija koja je ispitala moguću povezanost ovih antitela i receptora za IgG (Fc γ III receptor) na belim ćelijama krvi. Mora se istaći da ovo ispitivanje nije uključilo specifične podgrupe limfocita i granulocita. Ovaj rezultat bi mogao ukazati na to da IgG antitela na glijadinu mogu imati ulogu u aktivaciji efektorskih ćelija imunog sistema putem vezivanja za upravo IgG (Fc γ III) receptor. Kao posledica ovog vezivanja može doći do produkcije proinflammatoryh citokina kao što je TNF- α , ali i do pokretanja antitelom posredovane ćelijske citotoksičnosti (ADCC) (Clemenceau i sar, 2008). Sa druge strane, imunski kompleksi putem Fc γ R receptora aktiviraju neutrofile i započinju oslobađanje reaktivnih kiseoničnih radikala i proteaza, kao i produkciju hemokina i citokina (Fairhurst i sar, 2007). Na taj način, neutrofil regrutuju i menjaju funkciju drugih ćelija kao što su monociti, dendritske ćelije, NK ćelije i limfociti, čineći tako vezu između urođene i stečene imunosti (Mantovani i sar, 2011; Pitzalis i sar, 2014). Dodatno, pokazano je da IgG frakcija antitela specifičnih u reumatoidnom artritisu povećava formiranje neutrofilnih ekstracelularnih zamki (eng. *neutrophil extracellular traps*, NETs) (Khandpur i sar, 2013), fenomen u kome neutrofil doprinose stvaranju posttranslaciono izmenjenih proteina, autoantigena i imunostimulatornih molekula. Proces stvaranja NETova praćen je oslobađanjem enzima peptidil arginin deiminaze 2 i 4 (Spengler i sar, 2015), koji mogu izvršiti proces citrulinacije ekstracelularnih peptida. Ovako nastali citrulinisani peptidi bi mogli biti izvor autoantitela na citrulinisane peptide (ACPA) za koje se zna da imaju značajnu ulogu pogotovo u ranom stadijumu reumatoidnog artritisa (Corsiero i sar, 2016). Korelacija između IgG anti-glijadinskih antitela i ekspresije CD16 molekula na površini granulocita uočena u našoj studiji, sugerira da bi upravo ova antitela mogla biti okidač za aktivaciju granulocita (a među njima i neutrofila) i mogla započeti formiranje neutrofilnih zamki.

Nema puno podataka u literaturi o efektima antigena iz hrane na limfocitnu proliferaciju kod pacijenata sa reumatoidnim artritisom. Uočeno je da kod pacijenata sa reumatoidnim artritisom, fitohemaglutinin dovodi do poremećaja regulacije limfocitne proliferacije, međutim sa kontroverznim zaključcima: snižena stimulacija proliferacije limfocita pokazana je od strane Percy-ja i saradnika (Percy i sar, 1978), dok je Ponchel sa saradnicima pokazao pozitivne efekte fitohemaglutinina na stimulaciju atipičnih podgrupa T ćelija (Ponchel i sar, 2002). Uticaj glijadina na proliferaciju limfocita kod

pacijenata sa reumatoidnim artritismom nije dovoljno ispitan. Najveći deo podataka o uticaju glijadina na proliferaciju imunskih ćelija dobijen je na osnovu istraživanja celijačne bolesti. O’Keeffe je sa saradnicama pokazao da kod pacijenata sa celijakijom, glijadin može da indukuje produkciju IL-2, IL-6 i IFN- γ (O’Keeffe i sar, 1999). Medjutim, veoma su zanimljivi podaci o uticaju glijadina na proliferaciju limfocita bolesnika sa dijabetes melitusom tip 1 (Mojibian i sar, 2009) koji su pokazali da postoji povećana proliferacija mononuklearnih ćelija periferne krvi u prisustvu glijadina, uz lučenje citokina koji odgovaraju Th1/Th17 profilu (IFN- γ , IL-6, TNF- α i IL-17a), i to uglavnom kod bolesnika nosioca HLA-DR4 gena. Podaci o uticaju proteina iz kravljeg mleka na stimulaciju proliferacije limfocita kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom gotovo da nema. Medjutim, kod pacijenata sa hipersenzitivnošću na proteine kravljeg mleka, uočen je pozitivan proliferativni efekat na limfocitni odgovor na ovaj antigen (Motrich i sar, 2003). Značajno sniženje stimulacije limfocitne proliferacije u prisustvu fitohemaglutinina i u prisustvu kombinacije fitohemaglutinina i glijadina/ proteina kravljeg mleka je uočena kod pacijenata sa ranim reumatoidnim artritismom. Razlog smanjene proliferacije limfocita u prisustvu antigena iz hrane koja je primećena u našoj studiji se može objasniti različitom (imunološki više supresivnom) prezentacijom imunogenih epitopa glijadina/proteina kravljeg mleka i fitohemaglutinina kada su eksprimirani u kombinaciji nego kada su eksprimirani sami.

Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije bila su usmerena i na određivanje ekspresije CD26/DPPIV antigena na površini limfocita i monocita, kao i na određivanje enzimske aktivnosti DPPIV u serumu kod bolesnika sa ranim reumatoidnim artritismom, bolesnika sa degenerativnim oboljenjima zglobova i zdravih osoba, a u cilju rasvetljavanja moguće uloge CD26/DPPIV u razvoju reumatoidnog artritisa. CD26/DPPIV je multifunkcionalni protein, koji ima značajnu regulatornu ulogu u brojnim fiziološkim procesima zavisno od tipa ćelija i uslova u kojima se nalazi (Boonacker i Van Noorden, 2003). Uloga dipeptidil peptidaze IV (CD26) u patogenezi reumatoidnog artritisa još uvek nije rasvetljena, uprkos sve većem broju istraživanja i literature na tu temu. Poznato je da DPPIV/CD26 ima važnu ulogu u razvoju, sazrevanju, aktivaciji i diferencijaciji T ćelija, kao i da utiče na njihovu funkciju u imunskom sistemu (Fan i sar, 2003). Površinski CD26 molekul na T ćelijama služi kao kostimulatorni molekul u antigen-stimulisanoj aktivaciji T limfocita (Ohnuma i sar, 2008), i kao receptor

za adenozin deaminazu (ADA), može imati važnu ulogu u regulaciji imunskog odgovora (Dong i sar, 1997). Promene u aktivnosti ovog molekula pronađene su i u drugim bolestima. Niski nivoi DPPIV aktivnosti ili solubilnog CD26, uočeni su u imunosupresivnim stanjima, uključujući neke tumore, dok su visoki nivoi pronađeni kod drugih tumora, nekih infekcija, zapaljenjskih bolesti i oboljenja jetre (Cordero i sar, 2009). Pokazano je da DPPIV kod nekih tipova malignih tumora može imati tumor-suprimirajuću ulogu, ali i suprotno, tumor-promovišuću ulogu kod drugih tipova malignih tumora. Smatra se da tumor-promovišuća, odnosno tumor-suprimirajuća uloga ovog multifunkcionalnog proteina zavisi od nivoa ekspresije DPPIV, kao i interakcija sa specifičnim biomolekulima uključenim u inicijaciju, razvoj i progresiju malignih tumora (Havre i sar, 2008; Cordero i sar, 2009). Slične kvalitativne ili kvantitativne promene mogu biti važne u patogenezi reumatoidnog artritisa, pošto DPPIV reguliše hemotaktičke odgovore na inflamatorne hemokine kakvi su CCL3-5, 11 i 22, CXCL2, 9-12 (Cuchacovich i sar, 2001), uključujući SDF-1 (Proost i sar, 2004; Narducci i sar, 2006). Dodatno, DPPIV reguliše i druge biološki aktivne peptide kakvi su neuropeptid Y (NPY) i vazoaktivni intestinalni peptid (VIP), za koje je skoro pokazano da imaju ulogu i u reumatoidnom artritisu (Buljevic i sar, 2013).

Ekspresija DPPIV/CD26 na T ćelijama u perifernoj krvi i sinovijalnoj tečnosti je povećana kod pacijenata sa reumatoidnim artritisom (Mizokami i sar, 1996). Kod pacijenata sa hroničnim, dugogodišnjim reumatoidnim artritisom, CD26+ T ćelije indukuju inflamaciju i oštećenje tkiva tako što migriraju u sinoviju zglobova, gde postaju aktivne. Rezultati ovog istraživanja su pokazali da se procenat CD26+ limfocita kod pacijenata sa ranim nelečenim reumatoidnim artritisom nije razlikovao od procenta ovih ćelija kod zdravih osoba, dok je procenat CD26+ limfocita bio značajno viši u grupi bolesnika sa hroničnim reumatoidnim artritisom nego kod pacijenata sa ranim RA, ali se nije razlikovao od zdravih osoba. Ovi nalazi delimično su u kontrastu sa do sada publikovanim rezultatima gde je uočen povišen procenat CD26+ T limfocita kod pacijenata sa dugogodišnjim reumatoidnim artritisom (Sedo i sar, 2005). Mora se istaći da ova studija nije uključila specifične podgrupe T limfocita. Dalje, značajno niži procenat CD26+ limfocita u populaciji ukupnih leukocita kod ranog i hroničnog reumatoidnog artritisa koji je detektovan u ovom ispitivanju može biti posledica smanjenog procenta limfocita u ukupnoj populaciji belih ćelija krvi (koja je uočena i u

još jednoj kohorti pacijenata sa reumatoidnim artritisom (Cordero i sar, 2015)). Uočeno sniženje procenta limfocita, koji predstavljaju jedan od najznačajnijih izvora solubilne forme DPPiV u serumu, moglo bi da bude uzrokovano promenama u „homing“-u limfocita (engl. *lymphocyte homing*, proces u kome pojedine subklase limfocita selektivno naseljavaju pojedina tkiva) indukovanim promenama u gradijentu hemokina (Comerford i sar, 2014). Ovo je prva studija o CD26 ekspresiji na limfocitima u ukupnoj populaciji leukocita kod pacijenata sa ranim reumatoidnim artritisom. Ova bolest se smatra da ima različit ćelijski i citokinski profil, pre svega uključujući Th17 limfocite, IL-17 i IL-23 (Cascão i sar, 2010). Bengsch sa saradnicima (Bengsch i sar, 2012) je pokazao da se subpopulacije Th-17 diferenciranih ćelija fenotipski karakterišu povišenom ekspresijom CD26 molekula. Povećanje Th1 populacije, koje takodje ima povišenu ekspresiju CD26 molekula, je uočeno i u drugim autoimunskim poremećajima Th1/Th17 tipa, kakva je, na primer, multipla skleroza ili Kronova bolest (Hildebrandt i sar, 2001; Tejera-Alhambra i sar, 2014). Međutim, ovi rezultati potvrđuju skorašnje ispitivanje (Cordero i sar, 2015) koje upućuje da su ovi porasti u ekspresiji najpre posledica umanjenja CD4+CD26- podgrupe limfocita rano u patogenezi, a ne povećanja podgrupa Th1/Th17 limfocita sa povećanom ekspresijom CD26. Imajući na umu da je ispitivana grupa bolesnika imala rani, nelečeni reumatoidni artritis, ovi rezultati bi mogli upućivati na to da je povećanje CD26+ limfocita najverovatnije kasniji događaj u imunskom odgovoru kod pacijenata sa reumatoidnim artritisom.

Premda je uočena povećana ekspresija CD26 molekula na površini mononuklearnih ćelija periferne krvi kod pacijenata sa ranim reumatoidnim artritisom, ova razlika nije bila značajna u poredjenju sa zdravim osobama. Ovi rezultati su delom u kontrastu sa publikovanim istraživanjem Ellingsen-a (Ellingsen i sar, 2012), koji je detektovao povećanu ekspresiju CD26 na monocitima, ali bez razlike u ekspresiji CD26 molekula na CD4+ T limfocitima kod pacijenata sa ranim RA u odnosu na zdrave kontrole. Ekspresija CD26 na limfocitima i monocitima pacijenata sa hroničnim reumatoidnim artritisom u našoj studiji pokazala je značajno nižu gustinu CD26 molekula na ovim ćelijama kod pacijenata sa ranim reumatoidnim artritisom nego kod zdravih kontrola. Ovakav rezultat se može delimično objasniti korišćenjem lekova koji menjaju tok bolesti, pogotovo metotreksata čiji su efekti na CD26 gustinu molekula od ranije poznati (Ellingsen i sar, 2007; Cordero i sar, 2015).

Uočena je značajno snižena serumska enzimsko aktivnost DPPIV kod pacijenata sa ranim reumatoidnim artritismom. Ovo je prva studija koja je publikovala ove promene serumske aktivnosti u ranom stadijumu reumatoidnog artritisa. Dodatno, grupa pacijenata sa hroničnim reumatoidnim artritismom je takodje imala sniženu aktivnost DPPIV u serumu u odnosu na grupu pacijenata sa ranim reumatoidnim artritismom, ali i u odnosu na grupu zdravih ispitanika. Podaci iz literature za referentne vrednosti za enzimsku aktivnost DPPIV u serumu se značajno razlikuju u pojedinim studijama što zavisi od eksperimentalne procedure, kao i od broja zdravih osoba koji su učestvovali u studiji, dok su referentne vrednosti za aktivnost DPPIV u serumu dobijene u ovom istraživanju u skladu sa sa nekim od objavljenih radova (Scharpé i sar, 1988; Durinx i sar, 2000; Mannucci i sar, 2005). Naši rezultati govore u prilog tome da je DPPIV uključena u rane događaje kompleksne patogeneze reumatoidnog artritisa, ne samo u hroničnom stadijumu bolesti kako je ranije objavljeno (Cuchacovich i sar, 2001). Dalje, pozitivna korelacija izmedju dužine trajanja simptoma i enzimsko aktivnosti DPPIV u serumu dodatno potvrđuje ove rezultate. Medjutim, serumska aktivnost ovog enzima je pokazala samo ograničenu upotrebljivost u dijagnozi bolesti, nižu nego što je ona za ekspresiju CD26 u celoj populaciji leukocita. Optimalna granična vrednost za CD26+ limfocite u ukunjoj populaciji leukocita koja je određena u našoj studiji, može biti početni korak ka ispitivanju potencijalnih markera za rano otkrivanje reumatoidnog artritisa, pogotovo za ekspresiju CD26 molekula na različitim subpopulacijama Th limfocita.

Osim povezanosti trajanja simptoma i serumske aktivnosti DPPIV, nije uočena značajna povezanost kliničkih i laboratorijskih pokazatelja ranog reumatoidnog artritisa i ekspresije CD26 na limfocitima, niti sa serumskom aktivnošću ovog enzima. Granična, negativna povezanost izmedju koncentracije C-reaktivnog proteina i aktivnosti DPPIV je bila prisutna kod pacijenata sa ranim RA. Slične povezanosti serumske aktivnosti DPPIV sa C-reaktivnim proteinom, brojem otečenih zglobova i sa DAS28 skorom, uočena je kod pacijenata sa hroničnim reumatoidnim artritismom (Küllertz i Boigk, 1986; Cordero i sar, 2001; Sedo i sar, 2005). Još uvek ostaje nerazjašnjeno u kom trenutku rani reumatoidni artritis postaje hronična bolest.

Podaci u literaturi koji opisuju ACPA/RF status i njihov odnos sa ekspresijom i serumskom aktivnošću DPPIV su veoma šturi. Ellingsen i saradnici (Ellingsen i sar, 2012) su pronašli da je povećana gustina CD26 na cirkulišućim monocitima povezana sa

radiografskom progresijom bolesti kod ACPA pozitivnih pacijenata sa ranim reumatoidnim artritismom. Rezultati u ovoj studiji pokazuju da postoji negativna korelacija izmedju procenta CD26+ limfocita u ukupnoj populaciji leukocita i broja otečenih zglobova kod ACPA negativnih pacijenata. Pored toga, uočena je i jaka negativna korelacija izmedju niskog titra ACPA i ukupnih CD26+ leukocita kod ovih pacijenata. Značaj ovakvih nalaza bi trebalo vrlo oprezno interpretirati zbog malog broja ACPA negativnih pacijenata sa ranim reumatoidnim artritismom. Moguće objašnjenje za ove rezultate bi moglo biti da neki drugi, nezavisni faktor, kakva su antitela na CD26, utiče i menja ekspresiju i serumsku aktivnost DPPIV. Anti-CD26 antitela mogu biti odgovorna i za niske vrednosti DPPIV enzima u serumu pacijenata sa reumatoidnim artritismom (Cuchacovich i sar, 2001), upućujući tako na CD26 kao jedan od autoantigena. Takođe, trebalo bi uzeti u obzir još i ranije opisani biološki fenomen koji može promeniti aktivnost enzima DPPIV bez uticaja na nivo samog enzima. Naime, pokazano je da prisustvo određenih cirkulišućih molekula može imati sposobnost da menja enzimsku aktivnost DPPIV (Nazarian i sar, 2014).

Prisustvo antitela na glijadin i na proteine iz kravljeg mleka u serumu pacijenata sa ranim neležanim reumatoidnim artritismom u odnosu na zdrave ispitanike upućuje na njihovu moguću ulogu u patogenezi ove bolesti. Ova imunoreaktivnost se ne može pripisati oštećenoj sluznici creva od strane nesteroidnih antiinflamatornih lekova i povećanom permeabilnošću za antigene iz hrane (Bjarnason i Peters, 1996; Hvatum i sar, 2006), ali može biti deo „modela sa multiplim uzrocima“ u nastanku bolesti (van Gaalen i sar, 2005). Pri tome, imunski poremećaji koji stoje u osnovi oboljenja uključuju i smanjenu aktivnost T regulatornih ćelija (Ehrenstein i sar, 2004) i izmenjenu ranu B ćelijsku toleranciju (Samuels i sar, 2005). Dodatno, izmenjena enzimska aktivnost DPPIV i njena ekspresija na mononuklearnim ćelijama krvi je prisutna veoma rano u patogenezi reumatoidnog artritisa. Ovaj enzim ima važnu ulogu u aktivaciji T ćelijskog imunskog odgovora, a naši rezultati pokazuju da može biti potencijalan dijagnostički pokazatelj pri ranom otkrivanju bolesti. Ova studija nije potvrdila povezanost izmedju nivoa ovih antitela u krvi i kliničkih parametara aktivnosti bolesti, te se ne može zaključiti da postoji direktan uticaj ishrane na aktivnost bolesti. Medjutim, uočena povezanost izmedju IgG antitela na glijadin i povišene ekspresije receptora za IgG na limfocitima i granulocitima pacijenata sa ranim reumatoidnim artritismom govori u prilog mogućoj ulozi antitela na

ispitivane proteine hrane u aktivaciji ovih ćelija i pokretanju imunskog odgovora. Rezultati ove teze upućuju na to da antigeni hrane koji se svakodnevno unose u organizam mogu indukovati odgovor imunskog sistema, te doprineti pojavi hronične imunske stimulacije i nastanku autoreaktivnih klonova. Ova imunoreaktivnost na proteine iz hrane kakvi su glijadin, kravlje mleko i fitohemaglutinin, upućuje na sluznicu creva kao mogući izvor autoimunskih fenomena u reumatoidnom artritisu. Stoga treba imati na umu da bi kod ovih pacijenata hronična stimulacija ćelija imunskog odgovora uzrokovana nekim od stalno prisutnih proteina hrane mogla doprineti bržoj progresiji bolesti, ali i smanjenju efikasnosti primenjene terapije. Posmatrano sa terapijskog aspekta, uvođenje dijeta sa restrikcijom unosa identifikovanog aktivirajućeg antigena hrane, uz redovnu konvencionalnu terapiju, bi moglo doprineti bržem smirenju inflamatornog procesa, te smanjenju destrukcije zglobova i održavanju duže remisije ili niske aktivnosti bolesti.

6. ZAKLJUČCI

1. U serumu pacijenata obolelih od ranog reumatoidnog artritisa prisutna su antitela na glijadin i na proteine kravljeg mleka, i to:
 - a. značajno viši nivoi IgG antitela na glijadin u odnosu na kontrole
 - b. značajno viši nivoi IgA i IgM antitela na proteine kravljeg mleka u odnosu na zdrave kontrole
2. Stimulacija proliferacije limfocita je kod pacijenata sa ranim reumatoidnim artritisom značajno snižena u prisustvu fitohemaglutinina, ali i u prisustvu kombinacije glijadina/ mleka i fitohemaglutinina u odnosu na kontrole
3. Bolesnici sa ranim reumatoidnim artritisom imaju:
 - a. sniženi procenat limfocita koji na svojoj površini imaju receptor za IgG (Fc γ III/CD16), ali je gustina ovih receptora znatno povećana u odnosu na kontrolnu grupu zdravih
 - b. povećanu gustinu receptora za IgG (Fc γ III/CD16) na površini granulocita u odnosu na kontrolne grupe
4. Uočeno prisustvo IgG antitela na glijadin i njihova direktna povezanost sa ekspresijom receptora za IgG (Fc γ III) na površini limfocita i granulocita može biti razlog aktivacije imunokompetentnih ćelija i pokretanja imunskog odgovora u ranom stadijumu reumatoidne bolesti
5. Serumska aktivnost DPPIV kod pacijenata sa ranim reumatoidnim artritisom je značajno snižena u odnosu na kontrolnu grupu zdravih, ali je viša nego kod pacijenata sa degenerativnim oboljenjima zglobova i kod bolesnika sa hroničnim reumatoidnim artritisom
6. Ekspresija CD26 molekula na limfocitima i monocitima kod pacijenata sa ranim reumatoidnim artritisom ne pokazuje razlike u odnosu na zdrave ispitanike, ali je značajno veća u odnosu na bolesnike sa hroničnim oblikom bolesti, što upućuje na veoma ranu disregulaciju funkcije DPPIV/CD26 u patogenezi ove bolesti

7. Povezanost parametara aktivnosti i ekspresije DPPIV/CD26 sa kliničkim i biohemijskim pokazateljima bolesti ukazuje na ulogu ovog enzima veoma rano u patogenezi reumatoidnog artritisa
8. Ekspresija DPPIV/CD26 na ukupnim leukocitima može biti početna tačka u ispitivanju mogućih biomarkera za rani reumatoidni artritis.

8. LITERATURA

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Innate Immunity. Cellular and Molecular Immunology. Schmitt W. 2014. Philadelphia, Saunders Elsevier.
- Abdel-Nasser AM, Rasker JJ, Valkenburg HA. Epidemiological and clinical aspects relating to the variability of rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 1997;27(2): 123-40.
- Agace WW, Persson EK. How vitamin A metabolizing dendritic cells are generated in the gut mucosa. *Trends Immunol* 2012;33(1): 42-8.
- Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO 3rd, Birnbaum NS, Burmester GR, Bykerk VP, Cohen MD, Combe B, Costenbader KH, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Hazes JM, Hobbs K, Huizinga TW, Kavanaugh A, Kay J, Kvien TK, Laing T, Mease P, Ménard HA, Moreland LW, Naden RL, Pincus T, Smolen JS, Stanislawska-Biernat E, Symmons D, Tak PP, Upchurch KS, Vencovský J, Wolfe F, Hawker G. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* 2010;62(9): 2569-81.
- Andrieu T, Thibault V, Malet I, Laporte J, Bauvois B, Agut H, Cahour A. Similar increased serum dipeptidyl peptidase IV activity in chronic hepatitis C and other viral infections. *J Clin Virol* 2003;27(1): 59-68.
- Ankit Saxena, Raychaudhuri SK, Raychaudhuri SP. Rheumatoid Arthritis: Disease Pathophysiology. Inflammation, Advancing Age and Nutrition. 2014. Rahman I, Elsevier.
- Araki K, Youngblood B, Ahmed R. The role of mTOR in memory CD8 T-cell differentiation. *Immunol Rev* 2010;235(1): 234-43.
- Aramaki T, Ida H, Izumi Y, Fujikawa K, Huang M, Arima K, Tamai M, Kamachi M, Nakamura H, Kawakami A, Origuchi T, Matsuoka N, Eguchi K. A significantly impaired natural killer cell activity due to a low activity on a per-cell basis in rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 2009;19(3): 245-52.
- Ayude D, Páez de la Cadena M, Cordero OJ, Nogueira M, Ayude J, Fernández-Briera A, Rodríguez-Berrocal FJ. Clinical interest of the combined use of serum CD26 and

- alpha-L-fucosidase in the early diagnosis of colorectal cancer. *Dis Markers* 2003-2004;19(6): 267-72.
- Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* 2007;132(6): 2131-57.
- Bank U, Bohr UR, Reinhold D, Lendeckel U, Ansorge S, Malfertheiner P, Tager M. Inflammatory bowel diseases: multiple benefits from therapy with dipeptidyl- and alanyl-aminopeptidase inhibitors. *Front Biosci* 2008;13: 3699-713.
- Barton A, Eyre S, Ke X, Hinks A, Bowes J, Flynn E, Martin P, YEAR Consortium, BIRAC Consortium, Wilson AG, Morgan AW, Emery P, Steer S, Hocking LJ, Reid DM, Harrison P, Wordsworth P, Thomson W, Worthington J. Identification of AF4/FMR2 family, member 3 (AFF3) as a novel rheumatoid arthritis susceptibility locus and confirmation of two further pan-autoimmune susceptibility genes. *Hum Mol Genet* 2009;18: 2518-2522.
- Belkaid Y, Hand TW. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell* 2014; 157(1): 121-41.
- Bensch B, Seigel B, Flecken T, Wolanski J, Blum HE, Thimme R. Human Th17 cells express high levels of enzymatically active dipeptidylpeptidase IV (CD26). *J Immunol* 2012;188(11): 5438-47.
- Bergseng E, Sidney J, Sette A, Sollid LM. Analysis of the binding of gluten T-cell epitopes to various human leukocyte antigen class II molecules. *Hum Immunol* 2008;69(2): 94-100.
- Bernatsky S, Dekis A, Hudson M, Pineau CA, Boire G, Fortin PR, Bessette L, Jean S, Chetaille AL, Belisle P, Bergeron L, Feldman DE, Joseph L. Rheumatoid arthritis prevalence in Quebec. *BMC Res Notes* 2014;7(937).
- Besu I, Jankovic L, Magdu IU, Konic-Ristic A, Raskovic S, Juranic Z. Humoral immunity to cow's milk proteins and gliadin within the etiology of recurrent aphthous ulcers? *Oral Dis* 2009;15(8): 560-4.
- Bird JJ, Brown DR, Mullen AC, Moskowitz NH, Mahowald MA, Sider JR, Gajewski TF, Wang CR, Reiner SL. Helper T cell differentiation is controlled by the cell cycle. *Immunity* 1998;9(2): 229-37.
- Bjarnason I, Peters TJ. Influence of anti-rheumatic drugs on gut permeability and on the gut associated lymphoid tissue. *Baillieres Clin Rheumatol* 1996;10(1): 165-76.

- Bongi SM, Manetti R, Melchiorre D, Turchini S, Boccaccini P, Vanni L, Maggi E. Anticyclic citrullinated peptide antibodies are highly associated with severe bone lesions in rheumatoid arthritis anti-CCP and bone damage in RA. *Autoimmunity* 2004;37(6-7): 495-501.
- Boonacker E, Van Noorden CJ. The multifunctional or moonlighting protein CD26/DPPIV. *Eur J Cell Biol* 2003;82(2): 53-73.
- Boruchov AM, Heller G, Veri MC, Bonvini E, Ravetch JV, Young JW. Activating and inhibitory IgG Fc receptors on human DCs mediate opposing functions. *J Clin Invest* 2005;115(10): 2914-23.
- Bosscher D, Breynaert A, Pieters L, Hermans N. Food-based strategies to modulate the composition of the intestinal microbiota and their associated health effects. *J Physiol Pharmacol* 2009;60(6): 5-11.
- Brandl K, Plitas G, Mihiu CN, Ubeda C, Jia T, Fleisher M, Schnabl B, DeMatteo RP, Pamer EG. Vancomycin-resistant enterococci exploit antibiotic-induced innate immune deficits. *Nature* 2008;455: 804-807.
- Broxmeyer HE, Capitano M, Campbell TB, Hangoc G, Cooper S. Modulation of Hematopoietic Chemokine Effects In Vitro and In Vivo by DPP-4/CD26. *Stem Cells Dev* 2016;25(8): 575-85.
- Brusca SB, Abramson SB, Scher JU. Microbiome and mucosal inflammation as extra-articular triggers for rheumatoid arthritis and autoimmunity. *Curr Opin Rheumatol* 2014;26(1): 101-7.
- Buljevic S, Detel D, Pucar LB, Mihelic R, Madarevic T, Sestan B, Varljen J. Levels of dipeptidyl peptidase IV/CD26 substrates neuropeptide Y and vasoactive intestinal peptide in rheumatoid arthritis patients. *Rheumatol Int* 2013;33(11): 2867-74.
- Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, Burcelin R. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 2008;57(6): 1470-81.
- Capellino S, Cosentino M, Wolff C, Schmidt M, Grifka J, Straub RH. Catecholamine-producing cells in the synovial tissue during arthritis: modulation of sympathetic neurotransmitters as new therapeutic target. *Ann Rheum Dis* 2010;69(10): 1853-60.

- Cascão R, Moura RA, Perpétuo I, Canhão H, Vieira-Sousa E, Mourão AF, Rodrigues AM, Polido-Pereira J, Queiroz MV, Rosário HS, Souto-Carneiro MM, Graca L, Fonseca JE. Identification of a cytokine network sustaining neutrophil and Th17 activation in untreated early rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2010;12(5): R196.
- Cash HL, Whitham CV, Behrendt CL, Hooper LV. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science* 2006;313(5790): 1126-30.
- Catrina AI, Joshua V, Klareskog L, Malmström V. Mechanisms involved in triggering rheumatoid arthritis. *Immunol Rev* 2016;269(1): 162-74.
- Cebula A, Seweryn M, Rempala GA, Pabla SS, McIndoe RA, Denning TL, Bry L, Kraj P, Kisielow P, Ignatowicz L. Thymus-derived regulatory T cells contribute to tolerance to commensal microbiota. *Nature* 2013;497(7448): 258-62.
- Chang K, Yang SM, Kim SH, Han KH, Park SJ, Shin JI. Smoking and rheumatoid arthritis. *Int J Mol Sci* 2014;15(12): 22279-95.
- Choy E, Sattar N. Interpreting lipid levels in the context of high-grade inflammatory states with a focus on rheumatoid arthritis: a challenge to conventional cardiovascular risk actions. *Ann Rheum Dis* 2009;68(4): 460-9.
- Clemenceau B, Vivien R, Berthome M, Robillard N, Garand R, Gallot G, Vollant S, Vie H. Effector memory alpha beta T lymphocytes can express Fc gamma RIIIa and mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Immunol* 2008;180(8): 5327-34.
- Cobb J.E, Plant D, Flynn E, Tadjeddine M, Dieudé P, Cornélis F, Ärlestig L, Dahlqvist SR, Goulielmos G, Boumpas DT, Sidiropoulos P, Krintel SB, Ørnbjerg LM, Hetland ML, Klareskog L, Haeupl T, Filer A, Buckley CD, Raza K, Witte T, Schmidt RE, FitzGerald O, Veale D, Eyre S, Worthington J. Identification of the tyrosineprotein phosphatase non-receptor type 2 (PTPN2) as a rheumatoid arthritis susceptibility locus in Europeans. *PLoS One* 2013;8: e66456.
- Comerford I, Kara EE, McKenzie DR, McColl SR. Advances in understanding the pathogenesis of autoimmune disorders: focus on chemokines and lymphocyte trafficking. *Br J Haematol* 2014;164(3): 329-41.
- Coombes JL, Siddiqui KR, Arancibia-Cárcamo CV, Hall J, Sun CM, Belkaid Y, Powrie F. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces

- Foxp3⁺ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med* 2007;204(8): 1757-64.
- Cordero OJ, Salgado FJ, Mera-Varela A, Nogueira M. Serum interleukin-12, interleukin-15, soluble CD26, and adenosine deaminase in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2001;21(2): 69-74.
- Cordero OJ, Salgado FJ, Nogueira M. On the origin of serum CD26 and its altered concentration in cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2009;58: 1723-1747.
- Cordero OJ, Varela-Calviño R, López-González T, Calviño-Sampedro C, Viñuela JE, Mouriño C, Hernández-Rodríguez Í, Rodríguez-López M, Aspe de la Iglesia B, Pego-Reigosa JM. CD26 Expression on T Helper Populations and sCD26 Serum Levels in Patients with Rheumatoid Arthritis. *PLoS One* 2015;10(7): e0131992.
- Corsiero E, Pratesi F, Prediletto E, Bombardieri M, Migliorini P. NETosis as Source of Autoantigens in Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol* 2016;7: 485.
- Costenbader KH, Feskanich D, Mandl LA, Karlson EW. Smoking intensity, duration, and cessation, and the risk of rheumatoid arthritis in women. *Am J Med* 2006;119(503): e501–e509.
- Cuchacovich M, Gatica H, Pizzo SV, Gonzalez-Gronow M. Characterization of human serum dipeptidyl peptidase IV (CD26) and analysis of its autoantibodies in patients with rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Clin Exp Rheumatol* 2001;19(6): 673-80.
- Davies JM, Sheil B, Shanahan F. Bacterial signalling overrides cytokine signalling and modifies dendritic cell differentiation. *Immunology* 2009;128(1): e805-15.
- de Hair MJ, Zijlstra IA, Boumans MJ, van de Sande MG, Maas M, Gerlag DM, Tak PP. Hunting for the pathogenesis of rheumatoid arthritis: core-needle biopsy of inguinal lymph nodes as a new research tool. *Ann Rheum Dis* 2012;71(11): 1911-2.
- De Rosa V, Procaccini C, Calì G, Pirozzi G, Fontana S, Zappacosta S, La Cava A, Matarese G. A key role of leptin in the control of regulatory T cell proliferation. *Immunity* 2007;26(2): 241-55.
- Demoruelle MK, Deane KD, Holers VM. When and where does inflammation begin in rheumatoid arthritis? *Curr Opin Rheumatol* 2014;26(1): 64-71.

- Dhodapkar KM, Kaufman JL, Ehlers M, Banerjee DK, Bonvini E, Koenig S, Steinman RM, Ravetch JV, Dhodapkar MV. Selective blockade of inhibitory Fcγ receptor enables human dendritic cell maturation with IL-12p70 production and immunity to antibody-coated tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(8): 2910-5.
- Di Sabatino A, Rovedatti L, Vidali F, Macdonald TT, Corazza GR. Recent advances in understanding Crohn's disease. *Intern Emerg Med* 2013;8(2): 101-13.
- Díaz de Ståhl T, Andrén M, Martinsson P, Verbeek JS, Kleinau S. Expression of FcγRIII is required for development of collagen-induced arthritis. *Eur J Immunol* 2002;32(10): 2915-22.
- Dijstelbloem HM, van de Winkel JG, Kallenberg CG. Inflammation in autoimmunity: receptors for IgG revisited. *Trends Immunol* 2001;22(9): 510-6.
- Dong RP, Tachibana K, Hegen M, Munakata Y, Cho D, Schlossman SF, Morimoto C. Determination of adenosine deaminase binding domain on CD26 and its immunoregulatory effect on T cell activation. *J Immunol* 1997;159(12): 6070-6.
- Doyle HA, Mamula MJ. Autoantigenesis: the evolution of protein modifications in autoimmune disease. *Curr Opin Immunol* 2012;24(1): 112-8.
- Drucker DJ, Nauck MA. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet* 2006;368(9548): 1696-705.
- Durinx C, Lambeir AM, Bosmans E, Falmagne JB, Berghmans R, Haemers A, Scharpé S, De Meester I. Molecular characterization of dipeptidyl peptidase activity in serum: soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV is responsible for the release of X-Pro dipeptides. *Eur J Biochem* 2000;267(17): 5608-13.
- Ebert EC. Interleukin 21 up-regulates perforin-mediated cytotoxic activity of human intra-epithelial lymphocytes. *Immunology* 2009;127(2): 206-15.
- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 2005;208(5728): 1635-8.
- Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, Moore S, Warnes G, Isenberg DA, Mauri C. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFα therapy. *J Exp Med* 2004;200(3): 277-85.

- Ellingsen T, Hansen I, Thorsen J, Kuno Møller B, Tarp U, Jacobsen S, Lund Hetland M, Vestergaard A, Hørslev-Petersen K, Stengaard-Pedersen K. Up-regulated dipeptidyl-peptidase IV (CD26) on monocytes was unaffected by effective DMARD treatment in early steroid and DMARD-naive rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2012;30(1): 58-63.
- Ellingsen T, Hornung N, Møller BK, Hjelm-Poulsen J, Stengaard-Pedersen K. In active chronic rheumatoid arthritis, dipeptidyl peptidase IV density is increased on monocytes and CD4(+) T lymphocytes. *Scand J Immunol* 2007;66(4): 451-7.
- Erić-Nikolić A, Matic IZ, Dorđević M, Milovanović Z, Marković I, Džodić R, Inić M, Srdić-Rajić T, Jevrić M, Gavrilović D, Cordero OJ, Juranić ZD. Serum DPPIV activity and CD26 expression on lymphocytes in patients with benign or malignant breast tumors. *Immunobiology* 2011;216(8): 942-6.
- Fairhurst AM, Wallace PK, Jawad AS, Goulding NJ. Rheumatoid peripheral blood phagocytes are primed for activation but have impaired Fc-mediated generation of reactive oxygen species. *Arthritis Res Ther* 2007;9(2): R29.
- Falony G, Vlachou A, Verbrugghe K, De Vuyst L. Cross-feeding between *Bifidobacterium longum* BB536 and acetate-converting, butyrate-producing colon bacteria during growth on oligofructose. *Appl Environ Microbiol* 2006;72(12): 7835-41.
- Fan H, Yan S, Stehling S, Marguet D, Schuppan D, Reutter W. Dipeptidyl peptidase IV/CD26 in T cell activation, cytokine secretion and immunoglobulin production. *Dipeptidyl aminopeptidases in health and disease*. Hildebrandt M. 2003. New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers: 165–74.
- Farquharson D, Butcher JP, Culshaw S. Periodontitis, *Porphyromonas*, and the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Mucosal Immunol* 2012;5(2): 112-20.
- Feldmann M, Maini SR. Role of cytokines in rheumatoid arthritis: an education in pathophysiology and therapeutics. *Immunol Rev* 2008;223: 7-19.
- Feng T, Elson CO. Adaptive immunity in the host-microbiota dialog. *Mucosal Immunol* 2011;4(1): 15-21.
- Fox CJ, Hammerman PS, Thompson CB. Fuel feeds function: energy metabolism and the T-cell response. *Nat Rev Immunol* 2005;5(11): 844-52.

- Fox DA, Hussey RE, Fitzgerald KA, Acuto O, Poole C, Palley L, Daley JF, Schlossman SF, Reinherz EL. Ta1, a novel 105 KD human T cell activation antigen defined by a monoclonal antibody. *J Immunol* 1984;133(3): 1250-6.
- Fukuda S, Toh H, Hase K, Oshima K, Nakanishi Y, Yoshimura K, Tobe T, Clarke JM, Topping DL, Suzuki T, Taylor TD, Itoh K, Kikuchi J, Morita H, Hattori M, Ohno H. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* 2011;469(7331): 543-7.
- Gan RW, Trouw LA, Shi J, Toes RE, Huizinga TW, Demoruelle MK, Kolfenbach JR, Zerbe GO, Deane KD, Edison JD, Gilliland WR, Norris JM, Holers VM. Anti-carbamylated protein antibodies are present prior to rheumatoid arthritis and are associated with its future diagnosis. *J Rheumatol* 2015;42: 572-579.
- Gibofsky A. Epidemiology, pathophysiology, and diagnosis of rheumatoid arthritis: A Synopsis. *Am J Manag Care* 2014;20(7): 128-35.
- Gierut A, Perlman H, Pope RM. Innate immunity and rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 2010;36(2): 271-96.
- Gonzalez-Gronow M, Gawdi G, Pizzo SV. Characterization of the plasminogen receptors of normal and rheumatoid arthritis human synovial fibroblasts. *J Biol Chem* 1994;269(6): 4360-6.
- Gonzalez-Gronow M, Grenett HE, Weber MR, Gawdi G, Pizzo SV. Interaction of plasminogen with dipeptidyl peptidase IV initiates a signal transduction mechanism which regulates expression of matrix metalloproteinase-9 by prostate cancer cells. *Biochem J* 2001;355(Pt 2): 397-407.
- Goodman AL, Kallstrom G, Faith JJ, Reyes A, Moore A, Dantas G, Gordon JI. Extensive personal human gut microbiota culture collections characterized and manipulated in gnotobiotic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108(15): 6252-7.
- Gorrell MD, Gysbers V, McCaughan GW. CD26: a multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes. *Scand J Immunol* 2001;54(3): 249-64.
- Gotoh H, Hagihara M, Nagatsu T, Iwata H, Miura T. Activity of dipeptidyl peptidase IV and post-proline cleaving enzyme in sera from osteoporotic patients. *Clin Chem* 1988;34(12): 2499-501.

- Goulielmos GN, Zervou MI, Myrthianou E, Burska A, Niewold TB, Ponchel F. Genetic data: The new challenge of personalized medicine, insights for rheumatoid arthritis patients. *Gene* 2016;583(2): 90-101.
- Green PH, Lebwohl B, Greywoode R. Celiac disease. *J Allergy Clin Immunol* 2015;135(5): 1099-106.
- Hafstrom I, Ringertz B, Spangberg A, von Zweigbergk L, Brannemark S, Nylander I, Ronnelid J, Laasonen L, Klareskog L. A vegan diet free of gluten improves the signs and symptoms of rheumatoid arthritis: the effects on arthritis correlate with a reduction in antibodies to food antigens. *Rheumatology (Oxford)* 2001;40(10): 1175-9.
- Hapfelmeier S, Lawson MA, Slack E, Kirundi JK, Stoel M, Heikenwalder M, Cahenzli J, Velykoredko Y, Balmer ML, Endt K, Geuking MB, Curtiss R 3rd, McCoy KD, Macpherson AJ. Reversible microbial colonization of germ-free mice reveals the dynamics of IgA immune responses. *Science* 2010;328(5986): 1705-9.
- Harel-Meir M, Sherer Y, Shoenfeld Y. Tobacco smoking and autoimmune rheumatic diseases. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2007;3: 707-715.
- Hart JE, Laden F, Puett RC, Costenbader KH, Karlson EW. Exposure to traffic pollution and increased risk of rheumatoid arthritis. *Environ Health Perspect* 2009;117: 1065e9.
- Hashikawa T, Hooker SW, Maj JG, Knott-Craig CJ, Takedachi M, Murakami S, Thompson LF. Regulation of adenosine receptor engagement by ecto-adenosine deaminase. *FASEB J* 2004;18(1): 131-3.
- Havre PA, Abe M, Urasaki Y, Ohnuma K, Morimoto C, Dang NH. The role of CD26/dipeptidyl peptidase IV in cancer. *Front Biosci* 2008;13: 1634-45.
- Heap GA, van Heel DA. Genetics and pathogenesis of coeliac disease. *Semin Immunol* 2009;21(6): 346-54.
- Heliövaara M, Aho K, Aromaa A, Knekt P, Reunanen A. Smoking and risk of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1993;20: 1830-1835.
- Heliövaara M, Aho K, Knekt P, Impivaara O, Reunanen A, Aromaa A. Coffee consumption, rheumatoid factor, and the risk of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2000;59: 631-5.

- Helmick CG, Felson DT, Lawrence RC, Gabriel S, Hirsch R, Kwoh CK, Liang MH, Kremers HM, Mayes MD, Merkel PA, Pillemer SR, Reveille JD, Stone JH; National Arthritis Data Workgroup. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. *Arthritis Rheum* 2008;58(1): 15–25.
- Herlihy SE, Brown ML, Pilling D, Weeks BR, Myers LK, Gomer RH. Soluble dipeptidyl peptidase IV decreases inflammation in a murine model of arthritis. *Arthritis Rheumatol* 2015;67(10): 2634-8.
- Hildebrandt M, Rose M, Mayr C, Schüler C, Reutter W, Salama A, Klapp BF. Alterations in expression and in serum activity of dipeptidyl peptidase IV (DPPIV, CD26) in patients with hyporectic eating disorders. *Scand J Immunol* 1999;50(5): 536-41.
- Hildebrandt M, Rose M, Rüter J, Salama A, Mönnikes H, Klapp BF. Dipeptidyl peptidase IV (DP IV, CD26) in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2001;36(10): 1067-72.
- Hosono O, Ohnuma K, Dang NH, Morimoto C. CD26: a key molecule in immune regulation and autoimmune diseases. *Mod Rheumatol* 2003;13(3): 199-204.
- Hughes-Austin JM, Deane KD, Derber LA, Kolfenbach JR, Zerbe GO, Sokolove J, Lahey LJ, Weisman MH, Buckner JH, Mikuls TR, O'Dell JR, Keating RM, Gregersen PK, Robinson WH, Holers VM, Norris JM. Multiple cytokines and chemokines are associated with rheumatoid arthritis-related autoimmunity in first-degree relatives without rheumatoid arthritis: Studies of the Aetiology of Rheumatoid Arthritis (SERA). *Ann Rheum Dis* 2013;72: 901-7.
- Hulett MD, Hogarth PM. Molecular basis of Fc receptor function. *Adv Immunol* 1994;57(1-127).
- Hvatum M, Kanerud L, Hällgren R, Brandtzaeg P. The gut-joint axis: cross reactive food antibodies in rheumatoid arthritis. *Gut* 2006;55: 1240-7.
- Ismail AS, Severson KM, Vaishnava S, Behrendt CL, Yu X, Benjamin JL, Ruhn KA, Hou B, DeFranco AL, Yarovinsky F, Hooper LV. Gammadelta intraepithelial lymphocytes are essential mediators of host-microbial homeostasis at the intestinal mucosal surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108(21): 8743-8.
- Ivanov II, Atarashi K, Manel N, Brodie EL, Shima T, Karaoz U, Wei D, Goldfarb KC, Santee CA, Lynch SV, Tanoue T, Imaoka A, Itoh K, Takeda K, Umesaki Y,

- Honda K, Littman DR. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* 2009;139(3): 485-98.
- Iwaki-Egawa S, Watanabe Y, Kikuya Y, Fujimoto Y. Dipeptidyl peptidase IV from human serum: purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence. *J Biochem* 1998;124(2): 428-33.
- Jarmołowska B, Bielikowicz K, Iwan M, Sidor K, Kostyra E, Kaczmarek M. Serum activity of dipeptidyl peptidase IV (DPPIV; EC 3.4.14.5) in breast-fed infants with symptoms of allergy. *Peptides* 2007;28(3): 678-82.
- Josefowicz SZ, Niec RE, Kim HY, Treuting P, Chinen T, Zheng Y, Umetsu DT, Rudenski AY. Extrathymically generated regulatory T cells control mucosal Th2 inflammation. *Nature* 2012;482(7385): 395-9.
- Kajiyama H, Kikkawa F, Khin E, Shibata K, Ino K, Mizutani S. Dipeptidyl Peptidase IV overexpression induces up-regulation of E-cadherin and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases, resulting in decreased invasive potential in ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* 2003;63: 2278-2283.
- Kallberg H, Padyukov L, Plenge RM, Ronnelid J, Gregersen PK, van der Helm-van Mil AH, Toes RE, Huizinga TW, Klareskog L, Alfredsson L, Epidemiological investigation of rheumatoid arthritis study group. Gene-gene and gene-environment interactions involving HLA-DRB1, PTPN22, and smoking in two subsets of rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet* 2007;80: 867-875.
- Karlson EW, Mandl LA, Aweh GN, Grodstein F. Coffee consumption and risk of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48: 3055-60.
- Kasama T, Isozaki T, Takahashi R, Miwa Y. Clinical effects of tocilizumab on cytokines and immunological factors in patients with rheumatoid arthritis. *Int Immunopharmacol* 2016;35: 301-6.
- Kastbom A, Ahmadi A, Söderkvist P, Skogh T. The 158V polymorphism of Fc gamma receptor type IIIA in early rheumatoid arthritis: increased susceptibility and severity in male patients (the Swedish TIRA project). *Rheumatology (Oxford)* 2005;44(10): 1294-8.
- Kau AL, Ahern PP, Griffin NW, Goodman AL, Gordon JI. Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature* 2011;474(7351): 327-36.

- Khandpur R, Carmona-Rivera C, Vivekanandan-Giri A, Gizinski A, Yalavarthi S, Knight JS, Friday S, Li S, Patel RM, Subramanian V, Thompson P, Chen P, Fox DA, Pennathur S, Kaplan MJ. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med* 2013;5(178): 178ra40.
- Kiyono H, McGhee JR, Wannemuehler MJ, Michalek SM. Lack of oral tolerance in C3H/HeJ mice. *J Exp Med* 1982;155(2): 605-10.
- Kjeldsen-Kragh J, Haugen M, Borchgrevink CF, Laerum E, Eek M, Mowinkel P, Hovi K, Førre O. Controlled trial of fasting and one-year vegetarian diet in rheumatoid arthritis. *Lancet* 1991;338(8772): 899-902.
- Klareskog L, Stolt P, Lundberg K, Källberg H, Bengtsson C, Grunewald J, Rönnelid J, Harris HE, Ulfgren AK, Rantapää-Dahlqvist S, Eklund A, Padyukov L, Alfredsson L. A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum* 2006;54: 38-46.
- Kleinau S, Martinsson P, Heyman B. Induction and suppression of collagen-induced arthritis is dependent on distinct fcγ receptors. *J Exp Med* 2000;191(9): 1611-6.
- Kobayashi H, Hosono O, Mimori T, Kawasaki H, Dang NH, Tanaka H, Morimoto C. Reduction of serum soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV enzyme activity and its correlation with disease activity in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2002;29(9): 1858-66.
- Kojima J, Kanatani M, Kato M, Tojoh F, Nakamura N. Serum glycyproline dipeptidyl aminopeptidase activity in human hepatic cancer. *Clin Chim Acta* 1979;93(2): 181-7.
- Koning F. Recent insight in the pathophysiology of coeliac disease: relevance to rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2015;33(4 Suppl 92): S8-10.
- Koning F, Thomas R, Rossjohn J, Toes RE. Coeliac disease and rheumatoid arthritis: similar mechanisms, different antigens. *Nat Rev Rheumatol* 2015;11(8): 450-61.
- Krepela E, Kasářík E, Vicar J, Kraml J. An assay of dipeptidyl peptidase IV activity in human serum and serum of pregnant women with glycy-L-proline-1-

- naphthylamide and other glyceryl-L-proline-arylamides as substrates. *Physiol Bohemoslov* 1983;32(4): 334-45.
- Kroese FG, Baeten D, Huizinga TW. Autoimmunity: break-through in the diagnosis and treatment of immune-mediated inflammatory diseases. *Immunol Lett* 2014;162: 150-162.
- Küllertz G, Boigk J. Dipeptidyl peptidase IV activity in the serum and synovia of patients with rheumatoid arthritis. *Z Rheumatol* 1986;45(2): 52-6.
- Kyogoku C, Tsuchiya N, Matsuta K, Tokunaga K. Studies on the association of Fc gamma receptor IIA, IIB, IIIA and IIIB polymorphisms with rheumatoid arthritis in the Japanese: evidence for a genetic interaction between HLA-DRB1 and FCGR3A. *Genes Immun* 2002;3(8): 488-93.
- La Cava A, Matarese G. The weight of leptin in immunity. *Nat Rev Immunol* 2004;4(5): 371-9.
- Lakatos PL, Firneisz G, Rákóczy G, Selmezi L, Szalay F. Elevated serum dipeptidyl peptidase IV (CD26, EC 3.4.14.5) activity in patients with primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 1999;30(4): 740.
- Lambeir AM, Durinx C, Scharpé S, De Meester I. Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2003;40: 209-294.
- Lathrop SK, Bloom SM, Rao SM, Nutsch K, Lio CW, Santacruz N, Peterson DA, Stappenbeck TS, Hsieh CS. Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota. *Nature* 2011;478(7368): 250-4.
- Lebreton C, Ménard S, Abed J, Moura IC, Coppo R, Dugave C, Monteiro RC, Fricot A, Traore MG, Griffin M, Cellier C, Malamut G, Cerf-Bensussan N, Heyman M. Interactions among secretory immunoglobulin A, CD71, and transglutaminase-2 affect permeability of intestinal epithelial cells to gliadin peptides. *Gastroenterology* 2012;143(3): 698-707.
- Lee YH, Bae SC, Song GG. FCGR2A, FCGR3A, FCGR3B polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Clin Exp Rheumatol* 2015;33(5): 647-54.
- Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 2006;124(4): 837-48.

- Li J, Yan H, Chen H, Ji Q, Huang S, Yang P, Liu Z, Yang B. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis is Associated with Milk or Egg Allergy. *N Am J Med Sci* 2016;8(1): 40-6.
- Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* 1998;394(6696): 897-901.
- Löster K, Zeilinger K, Schuppan D, Reutter W. The cysteine-rich region of dipeptidyl peptidase IV (CD 26) is the collagen-binding site. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;217(1): 341-8.
- Louis P, Scott KP, Duncan SH, Flint HJ. Understanding the effects of diet on bacterial metabolism in the large intestine. *J Appl Microbiol* 2007;102(5): 1197-208.
- Lubberts E. Th17 cytokines and arthritis. *Semin Immunopathol* 2010;32(1): 43-53.
- Lupton JR. Microbial degradation products influence colon cancer risk: the butyrate controversy. *J Nutr* 2004;134(2): 479-82.
- Macfarlane S, Macfarlane GT. Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc Nutr Soc* 2003;62(1): 67-72.
- MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K, Silman AJ. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum* 2000;43(1): 30-7.
- Macpherson AJ, Geuking MB, McCoy KD. Homeland security: IgA immunity at the frontiers of the body. *Trends Immunol* 2012;33(4): 160-7.
- Macpherson AJ, Slack E, Geuking MB, McCoy KD. The mucosal firewalls against commensal intestinal microbes. *Semin Immunopathol* 2009;31(2): 145-9.
- Macpherson AJ, Uhr T. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science* 2004;303: 1662–1665.
- Maes M, De Meester I, Verkerk R, De Medts P, Wauters A, Vanhoof G, Vandoolaeghe E, Neels H, Scharpé S. Lower serum dipeptidyl peptidase IV activity in treatment resistant major depression: relationships with immune-inflammatory markers. *Psychoneuroendocrinology* 1997;22(2): 65-78.
- Maes M, Lin A, Bonaccorso S, Vandoolaeghe E, Song C, Goossens F, De Meester I, Degroote J, Neels H, Scharpé S, Janca A. Lower activity of serum peptidases in abstinent alcohol-dependent patients. *Alcohol* 1999;17(1): 1-6.

- Magnusson SE, Wennerberg E, Matt P, Lindqvist U, Kleinau S. Dysregulated Fc receptor function in active rheumatoid arthritis. *Immunol Lett* 2014;162(1 Pt A): 200-6.
- Mannucci E, Pala L, Ciani S, Bardini G, Pezzatini A, Sposato I, Cremasco F, Ognibene A, Rotella CM. Hyperglycaemia increases dipeptidyl peptidase IV activity in diabetes mellitus. *Diabetologia* 2005;48(6): 1168-72.
- Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2011;11(8): 519-31.
- Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, Lee WP, Weinrauch Y, Monack DM, Dixit VM. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 2006;440(7081): 228-32.
- Martín M, Huguet J, Centelles JJ, Franco R. Expression of ecto-adenosine deaminase and CD26 in human T cells triggered by the TCR-CD3 complex. Possible role of adenosine deaminase as costimulatory molecule. *J Immunol* 1995;155(10): 4630-43.
- Martínez A, Varadé J, Márquez A, Cénit MC, Espino L, Perdignes N, Santiago JL, Fernández-Arquero M, de la Calle H, Arroyo R, Mendoza JL, Fernández-Gutiérrez B, de la Concha EG, Urcelay E. Association of the STAT4 gene with increased susceptibility for some immune-mediated diseases. *Arthritis Rheum* 2008;58: 2598-2602.
- Maslowski KM, Vieira AT, Ng A, Kranich J, Sierro F, Yu D, Schilter HC, Rolph MS, Mackay F, Artis D, Xavier RJ, Teixeira MM, Mackay CR. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature* 2009;461(7268): 1282-6.
- Matić IZ, Đorđević M, Grozdanić N, Damjanović A, Kolundžija B, Erić-Nikolić A, Džodić R, Šašić M, Nikolić S, Dobrosavljević D, Rašković S, Andrejević S, Gavrilović D, Cordero OJ, Juranić ZD. "Serum activity of DPPIV and its expression on lymphocytes in patients with melanoma and in people with vitiligo." *BMC Immunol* 2012;13: 48.
- Matić IZ, Đorđić M, Đorđić M, Grozdanić N, Damjanović A, Kolundžija B, Vidović A, Bila J, Ristić S, Mihaljević B, Tomin D, Milanović N, Ristić D, Purić M, Gavrilović D, Cordero OJ, Juranić ZD. Dipeptidyl peptidase IV: serum activity

- and expression on lymphocytes in different hematological malignancies. *Leuk Lymphoma* 2013;54(12): 2071-6.
- McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2011;365(23): 2205-19.
- Mehta V, Kisalay S, Balachandran C. Leflunomide. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2009;75: 422-4.
- Metzemaekers M, Van Damme J, Mortier A, Proost P. Regulation of Chemokine Activity - A Focus on the Role of Dipeptidyl Peptidase IV/CD26. *Front Immunol* 2016;7: 483.
- Michalek RD, Rathmell JC. The metabolic life and times of a T-cell. *Immunol Rev* 2010;236: 190-202.
- Mikuls TR, Cerhan JR, Criswell LA, Merlino L, Mudano AS, Burma M, Folsom AR, Saag KG. Coffee, tea, and caffeine consumption and risk of rheumatoid arthritis: results from the Iowa Women's Health Study. *Arthritis Rheum* 2002;46: 83-91.
- Mikuls TR, Payne JB, Yu F, Thiele GM, Reynolds RJ, Cannon GW, Markt J, McGowan D, Kerr GS, Redman RS, Reimold A, Griffiths G, Beatty M, Gonzalez SM, Bergman DA, Hamilton BC 3rd, Erickson AR, Sokolove J, Robinson WH, Walker C, Chandad F, O'Dell JR. Periodontitis and *Porphyromonas gingivalis* in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol* 2014;66(5): 1090-100.
- Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. Interleukin-17 and type17 helper T cells. *N Engl J Med* 2009;369(9): 888-98.
- Mizokami A, Eguchi K, Kawakami A, Ida H, Kawabe Y, Tsukada T, Aoyagi T, Maeda K, Morimoto C, Nagataki S. Increased population of high fluorescence 1F7 (CD26) antigen on T cells in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1996;23(12): 2022-6.
- Mojibian M, Chakir H, Lefebvre DE, Crookshank JA, Sonier B, Keely E, Scott FW. Diabetes-specific HLA-DR-restricted proinflammatory T-cell response to wheat polypeptides in tissue transglutaminase antibody-negative patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 2009;58(8): 1789-96.
- Morgan AW, Barrett JH, Griffiths B, Subramanian D, Robinson JI, Keyte VH, Ali M, Jones EA, Old RW, Ponchel F, Boylston AW, Situnayake RD, Markham AF, Emery P, Isaacs JD. Analysis of Fcγ receptor haplotypes in rheumatoid

- arthritis: FCGR3A remains a major susceptibility gene at this locus, with an additional contribution from FCGR3B. *Arthritis Res Ther* 2006;8(1): R5.
- Morgan AW, Griffiths B, Ponchel F, Montague BM, Ali M, Gardner PP, Gooi HC, Situnayake RD, Markham AF, Emery P, Isaacs JD. Fcγ receptor type IIIA is associated with rheumatoid arthritis in two distinct ethnic groups. *Arthritis Rheum* 2000;43(10): 2328-34.
- Morimoto C, Schlossman SF. The structure and function of CD26 in the T-cell immune response. *Immunol Rev* 1998;161: 55-70.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65(1-2): 55-63.
- Motrich RD, Gottero C, Rezzonico C, Rezzonico C, Riera CM, Rivero V. Cow's milk stimulated lymphocyte proliferation and TNFα secretion in hypersensitivity to cow's milk protein. *Clin Immunol* 2003;109: 203-11.
- Mucida D, Park Y, Kim G, Turovskaya O, Scott I, Kronenberg M, Cheroutre H. Reciprocal Th17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science* 2007;317(5835): 256-60.
- Muegge BD, Kuczynski J, Knights D, Clemente JC, González A, Fontana L, Henrissat B, Knight R, Gordon JI. Diet drives convergence in gut microbiome functions across mammalian phylogeny and within humans. *Science* 2011;332(6032): 970-4.
- Mukherjee S, Partch CL, Lehotzky RE, Whitham CV, Chu H, Bevins CL, Gardner KH, Hooper LV. Regulation of C-type lectin antimicrobial activity by a flexible N-terminal prosegment. *J Biol Chem* 2009;284(8): 4881-8.
- Nadkarni S, Mauri C, Ehrenstein MR. Anti-TNF-α therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF-β. *J Exp Med* 2007;204(1): 33-9.
- Narducci MG, Scala E, Bresin A, Caprini E, Picchio MC, Remotti D, Ragone G, Nasorri F, Frontani M, Arcelli D, Volinia S, Lombardo GA, Baliva G, Napolitano M. Skin homing of Sézary cells involves SDF-1-CXCR4 signaling and down-regulation of CD26/dipeptidylpeptidase IV. *Blood* 2006;107(3): 1108-15.
- Nazarian A, Lawlor K, Yi SS, Philip J, Ghosh M, Yaneva M, Villanueva J, Saghatelian A, Assel M, Vickers AJ, Eastham JA, Scher HI, Carver BS, Lilja H, Tempst P.

- Inhibition of circulating dipeptidyl peptidase 4 activity in patients with metastatic prostate cancer. *Mol Cell Proteomics* 2014;13(11): 3082-96.
- Nenonen MT, Helve TA, Rauma AL, Hänninen OO. Uncooked, lactobacilli-rich, vegan food and rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1998;37(3): 274-81.
- Neovius M, Simard JF, Askling J; ARTIS study group. Nationwide prevalence of rheumatoid arthritis and penetration of disease-modifying drugs in Sweden. *Ann Rheum Dis* 2011;70(4): 624-629.
- Nguyen MT, Favelyukis S, Nguyen AK, Reichart D, Scott PA, Jenn A, Liu-Bryan R, Glass CK, Neels JG, Olefsky JM. A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *J Biol Chem* 2007;282(48): 35279-92.
- Nielen MM, van Schaardenburg D, Reesink HW, Twisk JW, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, de Gast T, Habibuw MR, Vandenbroucke JP, Dijkmans BA. Increased levels of C-reactive protein in serum from blood donors before the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50(8): 2423-7.
- Nieto A, Cáliz R, Pascual M, Matarán L, García S, Martín J. Involvement of Fcγ receptor IIIA genotypes in susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43(4): 735-9.
- O'Farrelly C, Marten D, Melcher D, McDougall B, Price R, Goldstein AJ, Sherwood R, Fernandes L. Association between villous atrophy in rheumatoid arthritis and a rheumatoid factor and gliadin-specific IgG. *Lancet* 1988;2: 819-22.
- O'Keefe J, Mills K, Jackson J, Feighery C. T cell proliferation, MHC class II restriction and cytokine products of gliadin-stimulated peripheral blood mononuclear cells (PBMC). *Clin Exp Immunol* 1999;117: 269-76.
- Ohno M, Abe T. Rapid colorimetric assay for the quantification of leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin-6 (IL-6). *J Immunol Methods* 1991;145(1-2): 199-203.
- Ohnuma K, Dang NH, Morimoto C. Revisiting an old acquaintance: CD26 and its molecular mechanisms in T cell function. *Trends Immunol* 2008;29(6): 295-301.

- Ohnuma K, Takahashi N, Yamochi T, Hosono O, Dang NH, Morimoto C. Role of CD26/dipeptidyl peptidase IV in human T cell activation and function. *Front Biosci* 2008;13: 2299-310.
- Oliver MA, Claire WST. Rheumatoid Arthritis - Treatment and Assessment. Primer on the rheumatic diseases. 2008. Klipperl J, Springer.
- Onozaki K. Etiological and biological aspects of cigarette smoking in rheumatoid arthritis *Inflamm Allergy Drug Targets* 2009;8: 364-368.
- Orozco G, Hinks A, Eyre S, Ke X, Gibbons LJ, Bowes J. Combined effects of three independent SNPs greatly increase the risk estimate for RA at 6q23. *Hum Mol Genet* 2009;(18).
- Ospelt C, Mertens JC, Jüngel A, Brentano F, Maciejewska-Rodriguez H, Huber LC, Hemmatazad H, Wüest T, Knuth A, Gay RE, Michel BA, Gay S, Renner C, Bauer S. Inhibition of fibroblast activation protein and dipeptidylpeptidase 4 increases cartilage invasion by rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2010;62(5): 1224-35.
- Otsa K, Tammaru M, Vorobjov S, Esko M, Pärsik E, Lang K. The prevalence of rheumatoid arthritis in Estonia: an estimate based on rheumatology patients' database. *Rheumatol Int* 2013;33(4): 955-8.
- Paimela L, Kurki P, Leirisalo-Repo M, Piirainen H. Gliadin immune reactivity in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 1995;13(5): 603-7.
- Paoliello-Paschoalato AB, Azzolini AE, Cruz MF, Marchi LF, Kabeya LM, Donadi EA, Lucisano-Valim YM. Isolation of healthy individuals' and rheumatoid arthritis patients' peripheral blood neutrophils by the gelatin and Ficoll-Hypaque methods: comparative efficiency and impact on the neutrophil oxidative metabolism and Fcγ receptor expression. *J Immunol Methods* 2014;412(70-7).
- Parren PW, Warmerdam PA, Boeije LC, Arts J, Westerdaal NA, Vlug A, Capel PJ, Aarden LA, van de Winkel JG. On the interaction of IgG subclasses with the low affinity Fc gamma RIIa (CD32) on human monocytes, neutrophils, and platelets. Analysis of a functional polymorphism to human IgG2. *J Clin Invest* 1992;90(4): 1537-46.
- Pedersen M, Jacobsen S, Klarlund M, Pedersen BV, Wiik A, Wohlfahrt J, Frisch M. Environmental risk factors differ between rheumatoid arthritis with and without

- auto-antibodies against cyclic citrullinated peptides. *Arthritis Res Ther* 2006;8: R133.
- Peng L, He Z, Chen W, Holzman IR, Lin J. Effects of butyrate on intestinal barrier function in a Caco-2 cell monolayer model of intestinal barrier. *Pediatr Res* 2007;61(1): 37-41.
- Percy JS, Davis P, Russell AS, Brisson E. A longitudinal study of in vitro tests for lymphocyte function in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1978;37(5): 416-20.
- Perner F, Gyuris T, Rákóczy G, Sárváry E, Görög D, Szalay F, Kunos I, Szönyi L, Péterfy M, Takács L. Dipeptidyl peptidase activity of CD26 in serum and urine as a marker of cholestasis: experimental and clinical evidence. *J Lab Clin Med* 1999;134(1): 56-67.
- Pieringer H, Pichler M. Cardiovascular morbidity and mortality in patients with rheumatoid arthritis: vascular alterations and possible clinical implications. *QJM* 2011;104(1): 13-26.
- Pitzalis C, Jones GW, Bombardieri M, Jones SA. Ectopic lymphoid-like structures in infection, cancer and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2014;14(7): 447-62.
- Platzer B, Richter S, Kneidinger D, Waltenberger D, Woisetschläger M, Strobl H. Aryl hydrocarbon receptor activation inhibits in vitro differentiation of human monocytes and Langerhans dendritic cells. *J Immunol* 2009;183(1): 66-74.
- Plenge RM, Seielstad M, Padyukov L, Lee AT, Remmers EF, Ding B, Liew A, Khalili H, Chandrasekaran A, Davies LR, Li W, Tan AK, Bonnard C, Ong RT, Thalamuthu A, Pettersson S, Liu C, Tian C, Chen WV, Carulli JP, Beckman EM, Altshuler D, Alfredsson L, Criswell LA, Amos CI, Seldin MF, Kastner DL, Klareskog L, Gregersen PK. TRAF1-C5 as a risk locus for rheumatoid arthritis—a genome-wide study. *N Engl J Med* 2007;357: 1199-1209.
- Ponchel F, Morgan AW, Bingham SJ, Quinn M, Buch, M, Verburg RJ, Henwood J, Douglas SH, Masurel A, Conaghan P, Gesinde M, Taylor J, Markham AF, Emery P, van Laar JM, Isaacs JD. Dysregulated lymphocyte proliferation and differentiation in patients with rheumatoid arthritis. *Blood* 2002;100(13): 4550-6.
- Pro B, Dang NH. CD26/dipeptidyl peptidase IV and its role in cancer. *Histol Histopathol* 2004;19(4): 1345-51.

- Proost P, Mahieu F, Schutyser E, Van Damme J. Posttranslational processing of chemokines. *Methods Mol Biol* 2004;239: 27-44.
- Quintana FJ, Basso AS, Iglesias AH, Korn T, Farez MF, Bettelli E, Caccamo M, Oukka M, Weiner HL. Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 2008;453(7191): 65-71.
- Raychaudhuri S, Remmers EF, Lee AT, Hackett R, Guiducci C, Burt NP, Gianniny L, Korman BD, Padyukov L, Kurreeman FA, Chang M, Catanese JJ, Ding B, Wong S, van der Helm-van Mil AH, Neale BM, Coblyn J, Cui J, Tak PP, Wolbink GJ, Crusius JB, van der Horst-Bruinsma IE, Criswell LA, Amos CI, Seldin MF, Kastner DL, Ardlie KG, Alfredsson L, Costenbader KH, Altshuler D, Huizinga TW, Shadick NA, Weinblatt ME, de Vries N, Worthington J, Seielstad M, Toes RE, Karlson EW, Begovich AB, Klareskog L, Gregersen PK, Daly MJ, Plenge RM. Common variants at CD40 and other loci confer risk of rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 2008;40: 1216-1223.
- Röhrborn D, Wronkowitz N, Eckel J. DPP4 in Diabetes. *Front Immunol* 2015;6: 386.
- Rosenblum MD, Remedios KA, Abbas AK. Mechanisms of human autoimmunity. *J Clin Invest* 2015;125(6): 2228-2233.
- Rosenstein ED, Greenwald RA, Kushner LJ, Weissmann G. Hypothesis: the humoral immune response to oral bacteria provides a stimulus for the development of rheumatoid arthritis. *Inflammation* 2004;28(311-8).
- Rossini M, Rossi E, Bernardi D, Viapiana O, Gatti D, Idolazzi L, Caimmi C, Derosa M, Adami S. Prevalence and incidence of rheumatoid arthritis in Italy. *Rheumatol Int* 2014;34(5): 659-664.
- Round JL, Mazmanian SK. Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107(27): 12204-9.
- Ruiz-Esquide V, Sanmartí R. Tobacco and other environmental risk factors in rheumatoid arthritis. *Reumatol Clin* 2012;8: 342-350.
- Sakkas LI, Bogdanos DP, Katsiari C, Platsoucas CD (2014). Anti-citrullinated peptides as autoantigens in rheumatoid arthritis-relevance to treatment. *Autoimmun Rev* 2014;13(11): 1114-20.

- Samuels J, Ng YS, Coupillaud C, Paget D, Meffre E. Impaired early B cell tolerance in patients with rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 2005;201(10): 1659-67.
- Scharpé S, De Meester I, Vanhoof G, Hendriks D, van Sande M, Van Camp K, Yaron A. Assay of dipeptidyl peptidase IV in serum by fluorometry of 4-methoxy-2-naphthylamine. *Clin Chem* 1988;34(11): 2299-301.
- Schulzke JD, Bentzel CJ, Schulzke I, Riecken EO, Fromm M. Epithelial tight junction structure in the jejunum of children with acute and treated celiac sprue. *Pediatr Res* 1998;43(4 Pt 1): 435-41.
- Schumann M, Siegmund B, Schulzke JD, Fromm M. Celiac Disease: Role of the Epithelial Barrier. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2017;3(2): 150-162.
- Sedo A, Duke-Cohan JS, Balaziová E, Sedová LR. Dipeptidyl peptidase IV activity and/or structure homologs: contributing factors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2005;7(6): 253-69.
- Shan L, Qiao SW, Arentz-Hansen H, Molberg Ø, Gray GM, Sollid LM, Khosla C. Identification and analysis of multivalent proteolytically resistant peptides from gluten: implications for celiac sprue. *J Proteome Res* 2005;4(5): 1732-41.
- Shor DB, Orbach H, Boaz M, Altman A, Anaya JM, Bizzaro N, Tincani A, Cervera R, Espinosa G, Stojanovich L, Rozman B, Bombardieri S, Vita SD, Damoiseaux J, Villalta D, Tonutti E, Tozzoli R, Barzilai O, Ram M, Blank M, Agmon-Levin N, Shoenfeld Y. Gastrointestinal-associated autoantibodies in different autoimmune diseases. *Am J Clin Exp Immunol* 2012;1(1): 49-55.
- Silman AJ, MacGregor AJ, Thomson W, Holligan S, Carthy D, Farhan A, Ollier WE. Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study. *Br J Rheumatol* 1993;32: 903-907.
- Simon TA, Thompson A, Gandhi KK, Hochberg MC, Suissa S. Incidence of malignancy in adult patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Arthritis Res Ther* 2015;17: 212.
- Sinnathurai P, Lau W, Vieira de Ribeiro AJ, Bachovchin WW, Englert H, Howe G, Spencer D, Manolios N, Gorrell MD. Circulating fibroblast activation protein and dipeptidyl peptidase 4 in rheumatoid arthritis and systemic sclerosis. *Int J Rheum Dis* 2016; doi: 10.1111/1756-185X.13031. [Epub ahead of print].

- Sköldstam L, Hagfors L, Johansson G. An experimental study of a Mediterranean diet intervention for patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2003;62(3): 208-14.
- Smolen JS, Breedveld FC, Burmester GR, Bykerk V, Dougados M, Emery P, Kvien TK, Navarro-Compán MV, Oliver S, Schoels M, Scholte-Voshaar M, Stamm T, Stoffer M, Takeuchi T, Aletaha D, Andreu JL, Aringer M, Bergman M, Betteridge N, Bijlsma H, Burkhardt H, Cardiel M, Combe B, Durez P, Fonseca JE, Gibofsky A, Gomez-Reino JJ, Graninger W, Hannonen P, Haraoui B, Kouloumas M, Landewe R, Martin-Mola E, Nash P, Ostergaard M, Östör A, Richards P, Sokka-Isler T, Thorne C, Tzioufas AG, van Vollenhoven R, de Wit M, van der Heijde D. Treating rheumatoid arthritis to target: 2014 update of the recommendations of an international task force. *Ann Rheum Dis* 2016;75(1): 3-15.
- Sokolove J, Bromberg R, Deane KD, Lahey LJ, Derber LA, Chandra PE, Edison JD, Gilliland WR, Tibshirani RJ, Norris JM, Holers VM, Robinson WH. Autoantibody epitope spreading in the pre-clinical phase predicts progression to rheumatoid arthritis. *PLoS One* 2012;7(5): e35296.
- Spengler J, Lugonja B, Ytterberg AJ, Zubarev RA, Creese AJ, Pearson MJ, Grant MM, Milward M, Lundberg K, Buckley CD, Filer A, Raza K, Cooper PR, Chapple IL, Scheel-Toellner D. Release of Active Peptidyl Arginine Deiminases by Neutrophils Can Explain Production of Extracellular Citrullinated Autoantigens in Rheumatoid Arthritis Synovial Fluid. *Arthritis Rheumatol* 2015;67(12): 3135-45.
- Sromova L, Mareckova H, Sedova L, Balaziova E, Sedo A. Dipeptidyl peptidase-IV in synovial fluid and in synovial fluid mononuclear cells of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Chim Acta* 2010;411(15-16): 1046-50.
- Stamnaes J, Sollid LM. Celiac disease: Autoimmunity in response to food antigen. *Semin Immunol* 2015;27(5): 343-52.
- Stock M, Distler A, Distler J, Beyer C, Ruiz-Heiland G, Ipseiz N, Seeling M, Krönke G, Nimmerjahn F, Schett G. Fc-gamma receptors are not involved in cartilage damage during experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2015;23(7): 1221-5.

- Stolt P, Bengtsson C, Nordmark B, Lindblad S, Lundberg I, Klareskog L, Alfredsson L. Quantification of the influence of cigarette smoking on rheumatoid arthritis: results from a population based case–control study, using incident cases. *Ann Rheum Dis* 2003;62: 835-841.
- Stolt P, Yahya A, Bengtsson C, Kallberg H, Ronnelid J, Lundberg I, Klareskog L, Alfredsson L, EIRA Study Group. Silica exposure among male current smokers is associated with a high risk of developing ACPA-positive rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2010;69: 1072-6.
- Stupar NV. Reumatoidni artritis. *Reumatologija*. Pilipović N. Beograd, Zavod za udzbenike i nastavna sredstva. 2000; 282-322.
- Sudo N, Sawamura S, Tanaka K, Aiba Y, Kubo C, Koga Y. The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. *J Immunol* 1997;159(4): 1739-45.
- Sun CM, Hall JA, Blank RB, Bouladoux N, Oukka M, Mora JR, Belkaid Y. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med* 2007;204(8): 1775-85.
- Sverdrup B, Källberg H, Bengtsson C, Lundberg I, Padyukov L, Alfredsson L, Klareskog L. Epidemiological investigation of Rheumatoid Arthritis Study Group. Association between occupational exposure to mineral oil and rheumatoid arthritis: results from the Swedish EIRA case–control study. *Arthritis Res Ther* 2005;7: R1296–R1303.
- Symmons D, Turner G, Webb R, Asten P, Barrett E, Lunt M, Scott D, Silman A. The prevalence of rheumatoid arthritis in the United Kingdom: new estimates for a new century. *Rheumatology (Oxford)* 2002;41(7): 793-800.
- Tanaka T, Camerini D, Seed B, Torimoto Y, Dang NH, Kameoka J, Dahlberg HN, Schlossman SF, Morimoto C. Cloning and functional expression of the T cell activation antigen CD26. *J Immunol* 1992;149(2): 481-6.
- Tanaka T, Kameoka J, Yaron A, Schlossman SF, Morimoto C. The costimulatory activity of the CD26 antigen requires dipeptidyl peptidase IV enzymatic activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90(10): 4586-90.
- Taylor LH, Twigg S, Worthington J, Emery P, Morgan AW, Wilson AG, Teare MD. Metaanalysis of the association of smoking and PTPN22 R620W genotype on

- autoantibody status and radiological erosions in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2013;40: 1048-1053.
- Tehlirian CV, Bathon JM. Clinical and laboratory manifestations of rheumatoid arthritis. *Primer on rheumatic diseases*. 2008; Klipperl J, Springer.
- Tejera-Alhambra M, Casrouge A, de Andrés C, Ramos-Medina R, Alonso B, Vega J, Albert ML, Sánchez-Ramón S. Low DPP4 expression and activity in multiple sclerosis. *Clin Immunol* 2014;150(2): 170-83.
- Thomson AW, Turnquist HR, Raimondi G. Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. *Nat Rev Immunol* 2009;9(5): 324-37.
- Tobón GJ, Youinou P, Saraux A. The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. *J Autoimmun* 2010;35(1): 10-4.
- Ulusoy H, Kamanli A, Ilhan N, Kuru O, Arslan S, Alkan G, Ozgocmen S. Serum levels of soluble CD26 and CD30 and their clinical significance in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2012;32(12): 3857-62.
- Vaishnava S, Yamamoto M, Severson KM, Ruhn KA, Yu X, Koren O, Ley R, Wakeland EK, Hooper LV. The antibacterial lectin RegIIIgamma promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. *Science* 2011;334: 255–258.
- van de Laar MA, van der Korst JK. Food intolerance in rheumatoid arthritis. I. A double blind, controlled trial of the clinical effects of elimination of milk allergens and azo dyes. *Ann Rheum Dis* 1992;51(3): 298-302.
- van de Winkel JG, Capel PJ. Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications. *Immunol Today* 1993;14(5): 215-21.
- Van Der Velden VH, Naber BA, Van Hal PT, Overbeek SE, Hoogsteden HC, Versnel MA. Peptidase activities in serum and bronchoalveolar lavage fluid from allergic asthmatics--comparison with healthy non-smokers and smokers and effects of inhaled glucocorticoids. *Clin Exp Allergy* 1999;29(6): 813-23.
- van Gaalen F, Ioan-Facsinay A, Huizinga TW, Toes RE. The devil in the details: the emerging role of anticitrulline autoimmunity in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 2005;175(9): 5575-80.
- van Heemst J, Jansen DT, Polydorides S, Moustakas AK, Bax M, Feitsma AL, Bontrop-Elferink DG, Barse M, van der Woude D, Wolbink GJ, Rispens T, Koning F, de Vries RR, Papadopoulos GK, Archontis G, Huizinga TW, Toes RE.

- Crossreactivity to vinculin and microbes provides a molecular basis for HLA-based protection against rheumatoid arthritis. *Nat Commun* 2015;6: 6681.
- van Lent PL, van Vuuren AJ, Blom AB, Holthuysen AE, van de Putte LB, van de Winkel JG, van den Berg WB. Role of Fc receptor gamma chain in inflammation and cartilage damage during experimental antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43(4): 740-52.
- Veldhoen M, Hirota K, Westendorf AM, Buer J, Dumoutier L, Renauld JC, Stockinger B. The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature* 2008;453(7191): 106-9.
- Vickery BP, Scurlock AM, Jones SM, Burks AW. Mechanisms of immune tolerance relevant to food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127(3): 576-84; quiz 585-6.
- Vieira SM, Pagovich OE, Kriegel MA. Diet, microbiota and autoimmune diseases. *Lupus* 2014;23(6): 518-26.
- Vossenaar ER, Smeets TJ, Kraan MC, Raats JM, van Venrooij WJ, Tak PP. The presence of citrullinated proteins is not specific for rheumatoid synovial tissue. *Arthritis Rheum* 2004;50(11): 3485-94.
- Weiner HL, da Cunha AP, Quintana F, Wu H. Oral tolerance. *Immunol Rev* 2011;241(1): 241-59.
- Wohlfert E, Belkaid Y. Plasticity of T reg at infected sites. *Mucosal Immunol* 2010;3(3): 213-5.
- Worbs T, Bode U, Yan S, Hoffmann MW, Hintzen G, Bernhardt G, Förster R, Pabst O. Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *J Exp Med* 2006;203(3): 519-27.
- Yamanaka H, Sugiyama N, Inoue E, Taniguchi A, Momohara S. Estimates of the prevalence of and current treatment practices for rheumatoid arthritis in Japan using reimbursement data from health insurance societies and the IORRA cohort (I). *Mod Rheumatol* 2014;24(1): 33-40.
- Yamaoka K. Janus kinase inhibitors for rheumatoid arthritis. *Curr Opin Chem* 2016;32: 29-33.
- Yu DM, Slaitini L, Gysbers V, Riekhoff AG, Kähne T, Knott HM, De Meester I, Abbott CA, McCaughan GW, Gorrell MD. Soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV

- enhances human lymphocyte proliferation in vitro independent of dipeptidyl peptidase enzyme activity and adenosine deaminase binding. *Scand J Immunol* 2011;73(2): 102-11.
- Zeng H, Wu H, Sloane V, Jones R, Yu Y, Lin P, Gewirtz AT, Neish AS. Flagellin/TLR5 responses in epithelia reveal intertwined activation of inflammatory and apoptotic pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290(1): G96-108.
- Zeng SY, Gong Y, Zhang YP, Chen SB, Chen JY, Lin CQ, Peng JH, Hou ZD, Zhong JQ, Liang HJ, Huang GH, Wang DM, Lai HY, Li LP, Zeng QY. Changes in the Prevalence of Rheumatic Diseases in Shantou, China, in the Past Three Decades: A COPCORD Study. *PLoS One* 2015;10(9): e0138492.
- Zlatković-Švenda MI, Stojanović RM, Šipetić-Grujičić SB, Guillemin F. Prevalence of rheumatoid arthritis in Serbia. *Rheumatol Int* 2014;34(5): 649-658.
- Zoetendal EG, Vaughan EE, de Vos WM. A microbial world within us. *Mol Microbiol* 2006;59(6): 1639-50.

Biografija autora

Milica Grujić rođena je 1982. godine u Jagodini, gde je završila osnovnu školu i gimnaziju, prirodno - matematički smer, obe kao nosilac Vukove diplome. Osnovne studije upisala je 2001/02 godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, gde je 2008. godine diplomirala sa prosečnom ocenom 9.20, čime je stekla stručno zvanje doktora medicine. Doktorske studije je upisala 2009/10 godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer molekularna medicina. Tokom 2009. godine bila je zaposlena u Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije, u Eksperimetalnoj laboratoriji Instituta kao istraživač saradnik. Autor ili koautor je u preko 20 naučno-istraživačkih bibliografskih jedinica (od toga originalni članci štampani *in extenso*: jedan rad M21 kategorije, 2 rada M22 kategorije, 1 rad M23 kategorije). Angažovana je na projektu 175011 Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije. Od jula 2010. godine je u stalnom radnom odnosu u Institutu za reumatologiju, gde radi kao lekar na specijalizaciji iz oblasti interne medicine. Učesnik je projekta Ministarstva zdravlja „Klinika za rani artritis“, redovan je učesnik Nacionalnog kongresa reumatologa 2011-2016, a učestvovala je i na Evropskom kongresu imunologa 2009. u Berlinu, Nemačka, kao i Internacionalnog kongresa imunologa 2010. u Kobeu, Japan. Tečno govori engleski jezik, dodatno nemački i francuski, aktivan je član Udruženja reumatologa Srbije.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani: Milica Grujić

Broj upisa: MM 01/09

Izjavljujem

Da je doktorska disertacija pod nazivom:

“Imunoreaktivnost na proteine iz hrane kod pacijenata sa ranim reumatoidnim artritisom“

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

U Beogradu, 18.04.2017.

Potpis doktoranda

Milica Grujić

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Milica Grujić

Broj upisa: MM 01/09

Studijski program: Molekularna medicina

Naslov rada: “Imunoreaktivnost na proteine iz hrane kod pacijenata sa ranim reumatoidnim artritismom“

Mentor: Prof dr Nemanja Damjanov

Potpisani: Milica Grujić

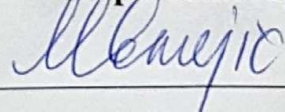
Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

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

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

U Beogradu, 18.04.2017.

Potpis doktoranda



Izjava o korišćenju

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

“Imunoreaktivnost na proteine iz hrane kod pacijenata sa ranim reumatoidnim artritismom“

koja je moje autorsko delo.

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

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

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

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponudjenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

U Beogradu, 18.04.2017.

Potpis doktoranda

