CITOKINSKI ODGOVOR U BOLESNIKA SA SISTEMSKOM SKLEROZOM

Željka, Kardum

Doctoral thesis / Disertacija

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:899981

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Željka Kardum

CITOKINSKI ODGOVOR U BOLESNIKA SA SISTEMSKOM SKLEROZOM

Doktorska disertacija

Osijek, 2023.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Željka Kardum

CITOKINSKI ODGOVOR U BOLESNIKA SA SISTEMSKOM SKLEROZOM

Doktorska disertacija

Osijek, 2023.

Mentor rada: prof. dr. sc. Jasminka Milas - Ahić

Rad ima 90 stranica.

Predgovor radu

„Ako jedan padne, drugi će mu pomoći da ustane. Ali teško onome tko radi sam! Kad padne, nema nikog da ga podigne.“

Propovjednik 4:10

Zahvaljujem svima zbog kojih nisam bila sama u izradi ove disertacije, koji su me nebrojeno puta podigli…

Zahvaljujem svojoj mentorici **prof. dr. sc. Jasminki Milas-Ahić,** na prihvaćanju mentorstva, na svom strpljenju, savjetima, idejama i znanju koje je podjelila sa mnom, ali iznad svega hvala na pravom prijateljstvu, vječnoj pozitivnosti i ohrabrenju, koji je uvijek bio poticaj da ponovno ustanem, od mojih prvih radnih dana kao specijalizant, pa sve do danas.

Zahvaljujem svojoj, sada umirovljenoj, voditeljici Zavoda za reumatologiju, kliničku imunologiju i alergologiju **doc. dr. sc. Višnji Prus,** na poticajima, ohrabrenju i povjerenju koje mi je iskazala kroz sve godine koje smo provele radeći zajedno, što je nesebično podjelila svoje znanje, ali i životno iskustvo sa mnom, njezina uzrečica „Bolje završen, nego savršen!“ je ponekad bila najbolji motivator za dovršiti pisanje.

Zahvaljujem **dr. sc. Kristini Kralik** na velikoj pomoći u izradi statističke analize podataka, na strpljenju i spremnosti za odgovor na svako pitanje, ma koliko besmisleno bilo.

Velika zahvala **dr. sc**. **Ines Šahinović, mag. med. biochem., spec. med. biokemije i laboratorijske medicine** na savjetima i pomoći oko izrade laboratorijskih metoda disertacije.

Zahvaljujem svim kolegicama Odjela za reumatologiju, kliničku imunologiju i alergologiju **(dr. I. Kovačević, dr. A. M. Masle, dr A. Šimac, dr. K. Stranski Kovačević, dr. M. Lucić, dr. D. Uršić, dr. I. Madunović i dr. A. Marošević**) oko prikupljanja podataka o bolesnicima, također velika zahvala medicinkim sestrama Odjela, osobito **Evi Matijević, bacc. med. techn., Ivki Blažević, mag. med. techn., med. sestri Editi Kneif, Kristini Boban, bacc. med. techn. i Mariji Rajkovači, mag. med. techn.**, za svesrdnu pomoć, od vađenje uzoraka, pa sve do sudjelovanja u istraživanju kao dio zdrave kontrolne skupine, ali i na ohrabrenju i podršci koju sam imala u njima kroz sve godine moga rada na odjelu.

Posebna zahvala mojim prekrasnim roditeljima, **Miri i Berislavu Utković,** koji su mi uvijek bili vjetar u leđa, podrška i oslonac, bez kojih ni jedan moj uspjeh ne bi bio moguć, koji

su uvijek, pa i danas, moju sreću i sreću moje djece stavljali ispred svojih potreba i želja, koji su me naučili pravom značenju bezuvjetne roditeljske ljubavi.

Hvala mom bratu **Branimiru**, na svoj ljubavi i podršci, čak i kad nismo jedno kraj drugog znam da je uvijek uz (i za) mene.

Najveća zahvala pripada mom suprugu **Darjanu**, bez njega ni jedan redak ove disertacije ne bi bio napisan, hvala na podršci, uputama, korekcijama, idejama, ali iznad svega hvala na svakom trenutku očinstva i ljubavi koje svakodnevno gledam.

Ovaj doktorat posvećujem mojoj djeci, moja tri prekrasna Božja dara, moja tri srca - **Benjaminu, Mateju i Elizi**, zbog njih sve što radim ima smisao…

Sadržaj

Popis kratica……..IV

1. UVOD.……...…...1

1.1. Etiopatogeneza bolesti…….…….....1

1.1.1. Genetski čimbenici……..…….....1

1.1.2. Okolišni čimbenici ……..…..2

1.1.3. Izmijenjeni imunosni odgovor……..……4

1.2. Patofiziologija bolesti…….....6

1.2.1. Vaskularna ozljeda……..……..7

1.2.2. Fibroza…….....8

1.2.3. Citokinski odgovor u sistemskoj sklerozi……..9

1.3. Klinička slika sistemske skleroze…….……...13

1.3.1. Vaskularne manifestacije bolesti ……13

1.3.2. Zahvaćanje kože u sistemskoj sklerozi……15

1.3.3. Zahvaćanje mišićno-koštanog sustava u sistemskoj sklerozi…….…….17

1.3.4. Zahvaćanje pluća u sistemskoj sklerozi……...18

1.3.5. Zahvaćanje bubrega u sistemskoj sklerozi….……..20

1.3.6. Zahvaćanje srca u sistemskoj sklerozi…….…….……20

1.3.7. Zahvaćanje probavnog sustava u sistemskoj sklerozi…….…….……21

1.3.8. SICCA sindrom u sistemskoj sklerozi……..……21

1.4. Dijagnoza sistemske skleroze…….22

1.4.1. Protutijela specifična za sistemsku sklerozu……....22

1.4.2. Kapilaroskopija……...23

1.5. Liječenje sistemske skleroze……...24

1.5.1. Imunosupresijski lijekovi …..……..……...24

1.5.2. Vazoaktivni lijekovi ……..……..25

1.5.3. Antifibrotski lijekovi…...……...…….25

1.5.4. Ostali lijekovi koji se primjenjuju sistemskoj sklerozi……26

1.5.5. Autologna transplantacija koštane srži……26

2. Hipoteza…….27

3. Ciljevi istraživanja...……..28

4. Ispitanici i metode……..29

4.1. Ustroj studije……..……..29

4.2. Ispitanici…….29

4.3.Metode……..…….....30

4.3.1. Anamneza i podatci iz medicinske dokumentacije..……30

4.3.2. Klinički pregled i dijagnostičke pretrage…….31

4.3.3. Laboratorijske pretrage…….....31

4.3.4. Statističke metode……35

5. Rezultati……..……..…….37

5.1. Obilježja bolesnika sa sistemskom sklerozom i kontrolne skupine…….37

5.2. Vrijednosti IL-17, IL-22 i TGFβ u bolesnika sa sistemskom sklerozom i kontrolnoj skupini……...…38

5.3. Vrijednosti IL-17, IL-22 i TGFβ u odnosu na klinička obilježja i zahvaćenost organa….42

5.4. Vrijednosti IL-17, IL-22 i TGFβ u odnosu na laboratorijske, funkcijske i kliničke pretrage……..……44

5.5. Vrijednosti IL-17, IL-22 i TGFβ u odnosu na tip bolesti, tip protutijela, ANA i kapilaroskopski nalaz……48

5.6. Vrijednosti IL-17, IL-22 i TGFβ u odnosu na terapiju……51

6. Rasprava……..…..53

6.1. Interleukin 17……..……53

6.2. Interleukin 22 …….……59

6.3. Pretvorbeni čimbenik rasta beta……..63

6.4. Ograničenja istraživanja……66

7. Zaključak ……...…...68

8. Sažetak……..….69

9. Summary…….……..70

10. Literatura…….…71

11. Životopis……..……87

Popis kratica

6MWT	6.-minutni test hoda, prema engl. 6-minute walk test
ACA	anticentromerna protutijela
ACEI	inhibitori angiotenzin-konvertaze, prema engl. angiotensin-convertase inhibitor
ACR	Američki kolegij reumatologije, prema engl. American college of rheumatology
Anti-RNApol3	anti-RNA polimeraza III protutijela
ATA	Anti-topoizomeraza protutijela
AUC	površina ispod krivulje, prema engl. area under the curve
AZA	azatioprin
BAFF	B-stanični aktivirajući faktor
BLM	bleomicin-mišji modeli
cGVHD	kronična bolest presatka protiv primatelja, prema engl. chronic graft-versus-host disease
CI	interval pouzdanosti, prema engl. confidence interval
CIK	ciklofosfamid
CK	kreatin-kinaza
CMV	citomegalovirus
CT	kompjuterska tomografija
DAMP	prema engl engl. damage-associated molecular patterns
DKK1	Dickkopf WNT signalizirajući put inhibitor 1
dkSSc	difuzna kutana sistemska skleroza
DLCO	difuzijski kapacitet za ugljični monoksid

DSA	digitalna suptrakcijska angiografija (DSA),
EBV	Ebstein-Barr virus
ECM	ekstracelularni matriks
EKG	elektrokardiogram
ERA	anatgonist endotelnih receptora, prema engl. endothelial receptor antagonist
EULAR	Europska liga protiv reumatizma, prema engl. European League Against Rheumatism
EUSTAR	Europske udruga za istraživanje sistemske skleroze, prema engl. European Scleroderma Trials and Research
FEV1	forsirani ekspiratorni volumen u 1. sekundi
FOXP3	prema engl. forkhead box P3
FVC	forsirani vitalni kapacitet
GAVE	gastrična antralna vaskularna ektazija
GM CSF	čimbenik stimuliranja kolonija makrofaga, prema engl. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HLA	prema engl. human leukocyte antigen
HRCT	kompjuterska tomografija visoke rezolucije, prema engl. high resolution computed tomography
IBP	intersticijska bolest pluća
IFN	interferon
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
IPF	idiopatska plućna fibroza
IPP	inhibitori protonske pumpe
IRF	interferonski regulatorni faktor

IVIG	intarvenski imunoglobulini
JAK2	Janus-kinaza 2
KBC	Klinički bolnički centar
LDH	laktat-dehidrogenaza
lkSSc	limitirana kutana sistemska skleroza
MCH	prosječni sadržaj hemoglobina u eritrocitima, prema engl. mean corpuscular hemoglobin
MCHC	prosječna koncentracija hemoglobina po eritrocitu, prema engl. mean corpuscular hemoglobin concentration
MCV	srednji volumen eritrocita, prema engl. mean corpuscular volume
MHC	kompleks tkivne snošljivosti, prema engl. major histocompatibility complex
miRNK	mikro ribonukleinska kiselina
MMF	mikofenolat-mofetil
mPAP	srednji plućni arterijski tlak, prema engl. mean pulmonary artery pressure (mPAP)
MR	magnetska rezonancija
mRSS	modificirani Rodnanov kožni test, prema engl. modified Rodnan skin score
MTX	metotreksat, prema engl. methotrexate
NET	neutrofilna vanstanična mreža, prema engl. neutrophil extracellular traps
NSIP	nespecifična intersticijska pneumonija
nt-pro-BNP	N terminal inaktivni pro-B tip natrijuretski peptida
NVC	kapilaroskopija ležišta nokta, prema engl. nailfold videocapillaroscopy
PaH	plućna arterijska hipertenzija

PAMP	prepoznavanje molekularnih obrazaca povezanih s patogenima, prema engl. pathogen-associated molecular patterns
pDC	plazmacitoidna dendritična stanica
PDE-5	fosfodiesteraza - 5, prema engl. phosphodiesterase
PDGF	trombocitni čimbenik rasta, prema engl. platelet-derived growth factor
PRR	receptori za prepoznavanje strukturnih "predložaka", prema engl. pattern recognition receptors
PSA	prostata specifični antigen
RA	reumatodni artritis
RyF	Raynaudov fenomen
SFRP1	prema engl. secreted frizzled-related protein 1
SIBO	bakterijsko prerastanje tankog crijeva, prema engl. small intestinal bacterial overgrowth
SLE	sistemski eritemski lupus
SMA	glatki mišićni aktin, prema engl. smooth muscle actin
SpO2	periferna kapilarna zasićenost kisikom, prema engl. peripheral capillary oxygen saturation
SRK	skleroderma renalna kriza
SS	Sjögrenov sindrom
SSc	sistemska skleroza
TCR	T-stanični receptor, prema engl. T cell receptor
TGFβ	pretvorbeni čimbenik rasta beta; prema engl. transforming growth factor β
Th	pomoćnički limfociti T, prema engl. T-helper
TIBC	ukupni kapacitet vezanja željeza, prema engl. total iron-binding capacity

TK	tirozin kinaza
TLR	Tollu-slični receptor, prema engl. toll-like receptor
TNFα	čimbenik tumorske nekroze α, prema engl. tumor necrosis factor α
Treg	regulatorni limfociti T
UIBC	nezasićeni kapacitet vezanja željeza, prema engl. unsaturated iron binding capacity
UIP	uobičajena intersticijska pneumonija
VEGF	endotelni vaskularni čimbenik rasta, prema engl. vascular endothelial growth factor
VSMC	vaskularna glatka mišićna stanica, prema engl. vascular smooth muscle cell

1. Uvod

Sistemska skleroza (engl. systemic sclerosis, skr. SSc) je kronična, autoimunosna bolest karakterizirana upalom, vaskulopatijom, fibrozom kože i unutarnjih organa. Može se podijeliti ovisno o proširenosti zadebljanja kože na dva velika podtipa: limitirana kutana sistemska skleroza (lkSSc), ukoliko je zadebljanje kože prisutno distalno od laktova i koljena te difuzna kutana sistemska skleroza (dkSSc) koja može zahvatiti gotovo sve dijelove kože. Difuzna kutana sistemska skleroza je povezana s težim zahvaćanjem organa, iako su ona moguća i u limitiranom obliku (1).

Naziv sistemska skleroza ili sklerodermija dolazi od grčke riječi „sklerosis“ što znači otvrdnuće i „dermis“ što znači koža. Prvi opis sklerodermije dao je Hipokrat još u 4. st.pr.Kr., u svojoj raspravi „ O epidemijama“ gdje piše kako je liječio bolesnika iz Atene „čija je koža bila toliko tvrda da je nije bilo moguće podići u nabore“ (2). Naziv „sklerodermija“ prvi put upotrebljava liječnik Giovambattista Fantonetti (1791-1861), koji u svom radu „Skleroderma Generale" objavljenog 1836. godine u milanskom časopisu Effemeridi delle Scienze Mediche opisuje bolesnika koji je imao tamnu, zadebljanu kožu koja mu je zbog zatezanja uzrokovala probleme s pokretljivošću zglobova (3).

Sistemska skleroza je rijetka bolest, s procijenjenom prevalencijom od 7,2–33,9 na 100 000 pojedinaca te godišnjom incidencijom oko 0,6 – 2,3 na 100 000 pojedinaca u Europi (4).

1.1. Etiopatogeneza bolesti

Patogeneza SSc do danas nije u potpunosti razjašnjena, a dosadašnje spoznaje govore u prilog multifaktorijalnih uzroka, koji uključuju izmijenjeni imunosni odgovor, genetske i okolišne čimbenike.

1.1.1. Genetski čimbenici

Utjecaj HLA (skraćeno od engl. human leukocyte antigen) gena najviše je ispitivan kao potencijalni genetski čimbenik za razvoj SSc. Dosadašnja ispitivanja pokazala su povezanost sistemske skleroze s različitim alelima HLA sustava kod bolesnika europskog, afričkog i azijskog porijekla. Također, utvrđena je povezanost između određenih HLA alela i specifičnih autoprotutijela. U bolesnika afričkog porijekla aleli HLA-DRB1*08:04 i HLA-DRB1*11:02 vezani su s povećanim rizikom za razvoj SSc, a prisutnosti ovih alela veže se uz veću pojavu

antifibrilarnih protutijela (5). Među SSc-bolesnicima europskog porijekla alel HLA-DRB1*11:04 je utvrđen kao rizik za razvoj SSc (6, 7, 8). Različiti geni povezani s razvojem SSc nalaze se u ne-HLA domeni, a najčešće su ti geni vezani uz imunosni sustav, na primjer, polimorfizam gena interferonskog regulatornog faktora (IRF) , zatim gena interleukina 12 (IL-12) te njegovog signalnog puta, potom signalnog puta za čimbenik tumorske nekroze α (engl. tumor necrosis factor α, skr. TNFα), signalnog puta za STAT4 te gena koje su odgovorni za odlaganje ekstracelularnog matriksa (ECM), apoptozu i autofagiju (9).

S obzirom da genetska predispozicija samo djelomično objašnjava razvoj bolesti, moguće da su epigenetski procesi uključeni u patogenezu SSc, poput hipo ili hipermetilacije gena vezanih uz sintezu ECM (10).

Transkripcija gena također je regulirana s mikroRNK (miRNK). Cirkulirajući miRNK nađen je u većoj mjeri u SSc-bolesnika u usporedbi sa zdravom populacijom te je za određene miRNA, kao što je miR-21 i miR-155, utvrđen profibrotski učinak (11,12).

1.1.2. Okolišni čimbenici

Različiti okolišni čimbenici mogu djelovati kao okidač za razvoj bolesti. Mogu se klasificirati kao okupacijski (silicij, organska otapala), infekcijski (bakterije, virusi) i neokupacijski/neinfekcijski (lijekovi, droge, pesticidi, silikoni, teški metali) (13).

Okupacijski čimbenici

Od okupacijskih čimbenika ući uzrok za razvoj SSc navodi se široki spektar tvari koje se koriste u kemijskoj i građevinskoj industriji, a kao najznačajniji predstavnik ove skupine navodi se silicij. Australska nacionalna studija koja je uključila više od 1500 SSc-bolesnika pokazala je kako je više od 30% SSc-bolesnika bilo izloženo inhalaciji silicijske prašine. Također, SSc-bolesnici izloženi siliciju imali su češće kontrakture zglobova, zahvaćanje srca, ATA I protutijela, viši modificirani Rodnan skin score (mRSS) i veću aktivnost bolesti (14).

Infekcijski čimbenici

Razne bakterijske i virusne infekcije mogu dovesti do prekida tolerancije limfocita T i B putem molekularne mimikrije te mogu istovremeno aktivirati urođeni imunosni odgovor putem aktivacije PAMP (engl. „pathogen-associated molecular patterns“) i PRR (engl. „pattern recognition receptors“) puta, dovodeći u konačnici do oštećenja stanica (10).

Od infekcijskih uzročnika najistraženija je uloga virusa - citomegalovirus (CMV), Ebstein-Barr virus (EBV), parvovirus B19, retrovirusi (15-17) u aktivaciji autoimunosnog odgovora, a od bakterija kao mogućih uzročnika povezanost je nađena s Helicobacter pylori (18).

Neinfekcijski/neokupacijski čimbenici

Među neokupacijskim uzročnicima u današnje vrijeme zanimljiva povezanost nađena je s uporabom silikonskih implantata. U posljednjih desetljeća više je prikaza slučaja i manjih kohortnih istraživanja koje povezuju silikonske implantate u dojkama sa RNA-pol3-pozitivitetom i razvojem SSc (19).

Od lijekova kao uzročnika, poznat je fibrotski učinak anti-tumurskog lijeka bleomicina. Promjene koje uključuju Raynaudov fenomen i fibrozu opisane su uz uporabu lijeka. Također je ustaljena uporaba bleomicina za razvoj sklerodermije u mišjim modelima (20). Ostali farmakološki agensi koji mogu uzrokovati razvoj SSc su paklitaksel, pentazocin, kokain, supresori apetita (dietilpropion hidroklorid, mazindol, amfetamin, deksamfetamin, fenmetrazin i metakvalon) i D -penicilamin (21).

Zloćudne bolesti

Povezanost između protutijela anti-RNA-pol3 s usporednom zloćudnom bolesti (koja se može dijagnosticirati i do 6 mjeseci prije i 12 mjeseci nakon pojave protutijela) potvrđena je European League Against Rheumatism (skr. EULAR) studijom koristeći se „European Scleroderma Trials and Research“ (EUSTAR) bazom podataka. Ovi rezultati doveli su do specifičnog probira za rak kod anti-RNA-pol3-pozitivnih bolesnika u razdoblju od 2 do 5 godina, koji uključuju mamografiju jednom godišnje, prostata specifični antigen (skr. PSA), testove stolice na okultno krvarenje i ginekološki pregled (22).

Spolni hormoni

Sistemska skleroza je bolest koja četiri puta češće pogađa žene od muškaraca (23), stoga se pretpostavlja kako spolni hormoni igraju ulogu u razvitku bolesti. Dosadašnja istraživanja ukazuju na fibrotsku, ali i vazodilatatornu ulogu estrogena. U jednom istraživanju koje je uključilo manji broj bolesnika sa SSc, nađena je niža razina androgena i neznačajno više razine estradiola u SSc bolesnica u odnosu na zdravu kontrolnu grupu, dok su bolesnici sa SSc imali povišenu razinu estradiola (24).

Mikrokimerizam

Pretpostavlja se kako među-posteljični prijelaz semi-alogenih fetalnih stanica majci i obratno, može aktivirati autoimunost tako što mikrokimerične stanice kronično stimuliraju upalne stanice zbog svoje MHC (engl. major histocompatibility complex) nepodudarnosti, a uz pojačanu aktivaciju aloreaktivnih, profibrotskih limfocita Th2 (engl. T-helper 2) (10, 25).

1.1.3. Izmijenjeni imunosni odgovor

Izmijenjeni imunosni odgovor u SSc je složen proces, koji uključuje kako urođenu tako i stečenu imunost.

Urođena imunost u SSc

Početak bolesti karakterizirana je perivaskularnom infiltracijom leukocita i to pretežno makrofaga i limfocita-T. Sam patogentski proces sličan je cijeljenju rane, ali bez njegove rezolucije te dovodi do kronične aktivacije imunosnih stanica (kao što su makrofazi) i stromalnih stanica, uzrokujući u konačnici fibrozu. Stoga se proces nastanka sistemske skleroze, osobito difuznog oblika bolesti, može smatrati sustavnim odgovorom pretjeranog popravka. Iako početni okidač koji pokreće i podržava nastanak bolesti je još nepoznat, dosadašnje spoznaje dovele su do nove hipoteze o ulozi sterilne upale u nerješavanju fibroze tkiva kod sklerodermije, koja naglašava ulogu DAMP/PRR neravnoteže. Prepoznavanje PAMP-ova ili endogenih DAMP-ova od strane urođenih imunosnih stanica putem TLR (engl. toll-like receptor) prvi je odgovor u sterilnoj upali (26, 27).

Važnu ulogu u patogenezi SSc imaju makrofazi i monociti kao dio urođene imunosti. Kod procesa cijeljenja prekursori, kao što su monociti iz koštane srži, odlaze na mjesto ozljede te zajedno s tkivnim makrofazima uzrokuju upalu i čiste celularne ostatke. Međutim, ukoliko se upala ne razriješi može doći do razvoja fibroze. U SSc infiltrirani monociti i makrofazi nađeni su između zadebljanih kolagenih vlakana i perivaskularno te izlučuju profibrotske citokine uzrokujući fibrozu *in situ*. Također, tkivni makrofazi stimulirani interleukinom 4 (IL-4) i IL-13 usvajaju tzv. M2 fenotip koji inače ima protuupalno djelovanje i sudjeluje u cijeljenju rane. M2 makrofazi mogu stvarati pretvorbeni čimbenik rasta beta (engl. transforming growth factor-beta – skr.TGF-β) te utjecati na sintezu kolagena i u konačnici vode fibrozi (28).

Neutrofili također imaju ulogu u razvoju bolesti. Formirajući NETozu engl. neutrophil extracellular traps, skr. NET) dovode do aktivacije fibroblasta i sinteze ekastracelularnog matriksa (ECM). Također, otpuštaju IL-4, IL-13 i IL-10 uzrokujući aktivaciju M2 fenotipa makrofaga (29).

Istraživanja govore i o ulozi mastocita u razvoju SSc. Povećan broj mastocita nađen je u koži SSc bolesnika te postoji opis da je kutana mastocitoza prethodila početku bolesti. Mastociti su također sposobni sintetizirati TGF-β te su nađeni smješteni oko fibroblasta u koži SSc-bolesnika. (30)

Dendritične stanice, koje su također dio urođenog imunosnog odgovora, smatraju se bitne u razvoju SSc. Plazmacitoidne dendritičke stanice (engl. plasmacytoid dendritic cells, skr. pDC) su glavni proizvođač interferona I (IFN I) te mogu izravno potaknuti fibrozu sintetizirajući profibrotske posrednike (31).

Stečena imunost u SSc

Limfociti T imaju ključnu ulogu u patogenezi SSc i infiltriraju zahvaćena tkiva čak prije nego što je zabilježena vaskulopatija i endotelno oštećenje (32). Serum i zahvaćena tkiva bolesnika s aktivnom bolesti pokazuju povećani broj CD4þ i CD8þ limfocita T koji sintetiziraju profibrotske citokine (IL-4, IL-13), ali i limfocita Th-17 obitelji te djeluju proupalno aktivirajući fibroblaste, endotel i epitelne stanice (33). T-limfociti u koži i perifernoj krvi SSc-bolesnika eksprimiraju oligoklonalni stanični receptor (engl. T cell receptor, skr. TCR) što govori u prilog proliferaciji i klonalnoj ekspanziji tih stanica kao odgovor na specifični antigen (34). Osobito je zanimljiva uloga regulatornih T-limfocita u patogenezi SSc. Nedavna istraživanja su pokazala da se Treg mogu u proupalnom okruženju, kao što je izloženost IL-6 i IL-1β, pretvoriti u patogen izvršne stanice. Također je utvrđeno kako u SSc postoji neravnoteža između kružećih Th17-limfocita i Treg, odnosno smanjena razina Treg je rezultat njihove konverzije u Th17 nakon izloženosti proupalnim citokinima (35). Opisano je da i pojedini limfociti Treg mogu proizvoditi proupalne citokine u određenim okolnostima. Produkcija IL-17 od strane CD4+CD25+FOXP3lowCD45RA−cirkulirajućih Treg- limfocita kojima nedostaje supresivna sposobnost opisana je u bolesnika sa SSc (36).

Limfociti B u SSc također imaju vrlo bitnu ulogu. U SSc ukupan broj B limfocita je uvećan, uz povećanje broja tzv. naivne populacije, dok je reduciran broj aktiviranih memorijskih B–limfocita te povećan broj proapoptotskih markera, kao što su molekule CD95, CD86 i HLA-DR. Također je smanjen broj regulatornih limfocita B uz deficitarnu produkciju IL-10 (37). Na B-limfocitima CD19 molekula je posebno prikazana, čime je smanjena aktivacijska granica B

limfocita i pojačan aktivacijski signal. Ekspresija CD19 je za oko 20% povećana u SSc-bolesnika u usporedbi sa zdravim kontrolama (38).

B-stanični aktivirajući faktor (BAFF) i APRIL put, koji su članovi TNF super-obitelji, imaju kritičnu ulogu u aktivaciji, preživljavanju i sazrijevanju limfocita B. U SSc-bolesnika razine BAFF i APRIL su više u odnosu na zdrave pojedince (oko 25-50% za BAFF), kao i razina jednog od njegovih specifičnih receptora (BAFFR) na površini limfocita B. Opisana je povezanost između serumske razine BAFF i APRIL i modificiranog Rodnan skin score-a (mRSS), rane dkSSc, intersticijske bolesti pluća (IBP), IL-6, serumske razine imunoglobulina G (IgG) i ATA I protutijela (37, 39).

Uloga B limfocita svakako je važna i zbog produkcije protutijela. Postojanje protutijela jedno je od obilježja SSc te su prisutna u više od 90% SSc bolesnika. Protutijela na DNA topoizomerazu I (ATA I), poznata i kao anti-Scl-70 protutijela, zatim anti-centromerna protutijela (ACA) i anti-RNA-polimeraza II (anti-RNA-pol3) protutijela bitna su za postavljanje dijagnoze, određivanja kliničkog subtipa bolesti i kao prediktor zahvaćanja različitih organa, međutim njihova uloga u patogenezi razvoja bolesti nije dokazana (39).

Ostala protutijela koja su ciljano usmjerena na površinske stanične receptore imaju izravan patogeni učinak te su nađena u fibrozi kože i pluća, zahvaćenim crijevima i vaskularnom remodeliranju. Glavne ciljne mete protutijelima su tri vrste stanica: endotelna stanica, fibroblast i vaskularna glatka mišićna stanica (engl. vascular smooth muscle cell, skr. VSMC). Ova protutijela potiču aktivaciju i proupalni fenotip svojih ciljanih stanica, vodeći prema fibrotskoj i vaskularnoj ozljedi (39, 40, 41).

1.2. Patofiziologija bolesti

Najprihvaćenija hipoteza u patogenezi SSc je da kombinacija genetske predispozicije i vanjskog okidača može dovesti do prekida samotolerancije prema vlastitim antigenima uz trajnu aktivaciju imunosnog sustava. Prvo mjesto trajne imunosno-posredovane upale je najvjerojatnije stijenka mikrovaskularizacije koja dovodi do promjena endotela, ali i drugih slojeva stijenke, uz posljedičnu aktivaciju miofibroblasta, pojačano odlaganje ECM i nesuspregnutu fibrozu tkiva (42).

1.2.1. Vaskularna ozljeda

Izmijenjeni imunosni odgovor, uz pojavu protutijela usmjerenih protiv endotelnih stanica i γδT-stanica dovode do početne vaskularne ozljede (43). Ozlijeđene krvne žile ne dosežu normalan opravak zbog poremećene neovaskularizacije i vaskularnog remodeliranja. Neovaskularizacija i vaskularno remodeliranje sastoje se od dva odvojena procesa - angiogeneze (novo stvaranje krvnih žila posredovano proliferacijom i migracijom postojećih endotelnih stanica) i vaskulogeneze (de novo sinteza krvnih žila putem inkorporiranja, diferencijacije, migracije i/ili proliferacije progenitornih stanica porijekla iz koštane srži). U SSc izmijenjena su oba procesa vodeći do vaskularnih strukturnih promjena, kao što su dilatacija, krvarenje i gubitak kapilara te stenoza arteriola (44).

Gubitak mikrocirkulacije vodi ka najranijem znaku SSc - Raynaudovom fenomenu (RyF) koji je opisan u više od 90% bolesnika sa SSc (45).

Inicijalni mehanizam koji dovodi do razvoja RyF moguće uključuje selektivno pojačanu ekspresiju alfa 2 adrenergičkih receptora na vaskularnim glatkim mišićnim stanicama s pojačanim odgovorom na kateholamine (46).

Istraživanja potvrđuju da su u SSc endotelne stanice disfunkcionalne zbog direktne imunosno- posredovane ozljede koja vodi od endotelne k mezenhimalnoj tranziciji i fibrozi intime zahvaćenih krvnih žila. Gubitak endotela uzrokuje abnormalnu funkciju vaskulature zbog smanjene produkcije dušičnog monoksida (NO) i prostaglandina, koji djeluju kao vazodilatatori, dok istovremeno postoji pojačano otpuštanje endotelina-1, koji je snažni vazokonstriktor. Raynaudov fenomen u SSc je povezan s ponavljajućim ishemija-reperfuzija događajima, pojačanim oksidativnim stresom i dubokom ozljedom tkiva (47, 48).

Patogeneza SSc uključuje nekoliko složenih mehanizama povezanih s mikrovaskularnom fibroproliferativnom lezijom, izmijenjenim urođenim i stečenim imunosnim odgovorom i nekontroliranim nakupljanjem kolagena i ostalih sastavnica ECM koje sintetiziraju fibroblasti i aktivirani miofibroblasti u koži i zahvaćenim organima. Aktivacija miofibroblasta dokazana je u pericitima i glatkim mišićnim stanicama krvnih žila, fibroblastima koji se nalaze u zahvaćenim organima i fibroblastima porijeklom iz koštane srži. Endotel u mezenhimalnu tranziciju (EMT) bitno je zbivanje koje posreduje vaskularnoj ozljedi u SSc, a sam EMT potencijalni je izvor aktiviranih fibroblasta kojim se epitelne stanice transformiraju u fibroblaste (49).

1.2.2. Fibroza

Fibroza u SSc sliči procesu cijeljenja rana u kojemu je rezolucijska faza ili neučinkovita ili se uopće ne događa. Proces fibroze sastoji se od pretjeranog odlaganja sastavnica ekstracelularnog matriksa, uz nedovoljnu reapsorpciju (10).

Upalni profibrotski citokini i faktori rasta vode prema aktivaciji fibroblasta. Aktivirani fibroblasti imaju karakteristiku miofibroblasta, koji su incijalno opisani u cijeljenju rane. Miofibroblasti su stanice s plasticitetom, koje imaju alfa glatki mišićni aktin (engl alpha-smooth muscle actin, SKR. α-SMA), pozitivna stresna vlakna i kontraktilne sposobnosti koji pomažu u zbrinjavanju i zatvaranju rane. Oni luče profibrotske medijatore, kao što je TGF-β te ECM sastavnice, kao što je kolagen, elastin, glikoproteine (npr. fibronektin, laminin i tenascin) i proteoglikane. Miofibroblasti u SSc nalaze se u aktiviranom stanju, uzrokujući nekontroliranu sintezu, odlaganje i remodeliranje ECM proteina što dovodi do poremećenog ECM odlaganja, stvaranja fibroze i u konačnici zatajenja zahvaćenog organa (50).

Samo porijeklo aktiviranih miofibroblasta odgovornih za fibrozu su najvećim dijelom lokalni fibroblasti koji se u proupalnom i fibrotskom miljeu pretvaraju u miofibroblaste. Međutim, bitnu ulogu imaju mezenhimalne progenitorne stanice porijekla iz koštane srži, kao što su fibrociti i monociti koji putuju u ozlijeđeno tkivo i doživljavaju *in situ* diferencijaciju u aktivirane fibroblaste i miofibroblaste. Ne-fibrotske loze stanica, kao što su epitelne, endotelne stanice i adipociti se također mogu diferencirati u miofibroblaste pod utjecajem hipoksije i TGF-β (51).

U fibrotskom tkivu, normalna arthitektura zamjenjena je velikim, acelularnim, čvrstim vezivnim tkivom, bogatim kolagenom koji je izgubio svoju funkcionalnost. U koži, dermis koji se širi zamjenjuje potkožno masno tkivo.

U koži SSc-bolesnika postoje pretjerani depoziti fibrilarnih kolagena (tip I i tip III), tip V i tip VII kolagena i vlakana elastina te povišene razine enzima koji kataliziraju post-translacijske promjene kolagena, kao što su lizil-hidroksilaza i lizil-okisdaza. Također, zahvaćena koža pokazuje svojstva kolagena koja su karakterističnija za hrskavicu i kost. Alpha-glatki mišićni aktin- (engl. α-smooth muscle aktin, skr. α-SMA) pozitivni miofibroblasti nakupljaju se i šire, a suprotno se događa limfnim i krvnim žilama, koje doživljavaju tzv. kapilarno povlačenje. Smanjena opskrba krvlju vodi progresivnoj tkivnoj hipoksiji koja rezultira pojačanim stvaranjem vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (engl. vascular endothelial growth factor,

skr. VEGF) i ostalih angiogenih faktora. Time dodatno hipoksija i direktno i indirektno, dovodi do sinteze kolagena i epitelno-mezenhimalnoj tranziciji te pospješuje fibrozu (52).

1.2.3. Citokinski odgovor u sistemskoj sklerozi

Razvoju početnog proupalnog stanja, a u daljnjem tijeku razvoju vaskulopatije i fibroze ključnu ulogu imaju citokini tvoreći proupalno i fibrotsko okruženje potrebno za razvoj bolesti.

Abnormalne razine citokina kao što je TGF-β, IL-6, IL-10, IL-17, IL-4 i IL-13 nađene su u serumu i zahvaćenim organima SSc-bolesnika. (53) Monociti i makrofazi uglavnom stvaraju TGFβ, IFN-α, IL-13, TNFα i IL-1 te također PDGF, koji su također važni u razvoju fibroze (54). Imunopatološki odgovor u SSc je dominantno vođen tipom 2 citokina, kao što u IL-4 i IL-13, koji su bitni regulatori ECM remodelinga (55). Bitnu ulogu u patogenezi bolesti ima interferon tip I, uz prepoznatljivi tzv. „interferonski potpis“ u ranoj fazi bolesti (56).

Interferon tip I

Interferoni su citokini koji se uglavnom sintetiziraju kao odgovor na virusne i mikrobne infekcije te je njihova najvažnija karakteristika nespecifično inhibiranje rasta virusa inducirajući tzv „antiviralno stanje“ u stanicama. Dijele se na 3 tipa: tip I koji uključuje IFNα i IFNβ, tip II koji uključuje IFNγ i tip III koji uključuje IFNλ (57).

Interferon tip I (T1IFN) vrlo je teško izmjeriti koristeći se tradicionalnim metodama kao što je ELISA, zbog vrlo male količine koja se nalazi u cirkulaciji, stoga se ranije u istraživanjima mjerila razina ekspresije interferonom stimuliranih gena (ISG) što se zajednički nazivao tzv. „interferonski potpis“ (58). Ovaj pristup koristio u istraživanju T1IFN u sistemskom eritemskom lupusu (SLE) i u SSc. (59).

Više studija potvrdilo je u pojačanu ekspresiju tip I interferonom-induciranih gena u cirkulirajućim krvnim stanicama i u zahvaćenom plućnom tkivu SSc bolesnika. Zanimljivo, bolesnici s pozitivnim anti-SSB protutijelima imaju više razine T1IFN u odnosu na bolesnike s negativnim protutijelima. Ostala protutijela vezana uz interferonski potpis su anti-U1-RNP i ATA (60). Interferonski potpis nađen je u najranijoj fazi SSc, prije razvoja fibroze, sugerirajući da je upravo to najraniji događaj u SSc patogenezi (61). T1IFN je također uključen u proces vaskularnog remodeliranja u SSc pridonoseći krvožilnoj propusnosti putem suprimiranja Fli 1

(engl. friend leukemia integration 1 transcription factor) i vaskularnog endotelnog kaderina u endotelnim stanicama i fibroblastima, što je također značajka rane faze bolesti (62).

Interleukin 6

IL-6 ima bitnu dvojnu ulogu u imunopatogenezi SSc, u vaskularnom oštećenju i u fibrozi. U ranoj fazi bolesti IL-6 sudjeluje u vaskularnoj endotelnoj aktivaciji i u apoptozi, vodeći k otpuštanju DAMP-ova (engl. damage-associated molecular patterns) koji održavaju upalu i autoimunost. Također utječe na diferencijaciju miofibroblasta, inhibira lučenje metaloproteinaze matriksa i aktivira fibroblaste (63).

U *in vitro* istraživanju kultivirani su fibroblasti SSc-bolesnika s i bez IL-6 antitijela. Koncentracija prokolagena tip I bila je niža u onih s IL-6 antitijelima, što ukazuje da produkcija ECM je ovisila o IL-6 inhibiciji (64).

Dosadašnja istraživanja ukazuju na povezanost IL-6 i rane faze bolesti te u bolesnika s plućnim promjenama vezanim uz SSc (65).

Interleukini 4 i 13

Th-2 citokini, IL-4 i IL-13, imaju bitnu ulogu u fibrotskom procesu u SSc. Povišene razine IL-4 i IL-13 nađene su u serumu SSc-bolesnika, a kemokin CXCL4 koji promovira njihovu sintezu značajno je povišen u SSc-bolesnika te je nađena povezanost s većim stupnjem fibroze pluća i brže progresije fibroze kože (66). IL-4 i IL-13 su dokazani profibrotski citokini u mnogim *in vivo* i *in vitro* istraživanjima, stimulirajući proliferaciju fibroblasta, diferencijaciju u miofibroblaste i produkciju kolagena tip I te uzrokujući diferencijaciju makrofaga prema M2 profibrotskom tipu (67).

Pretvorbeni čimbenik rasta beta (TGF-β)

Pretvorbeni čimbenik rasta beta (TGF-β) primjer je multifunkcionalnog citokina i ključni regulator remodeliranja i sinteze ECM. Osobito TGF-β izoforme imaju sposobnost induciranja i ekspresije ECM proteina u mezenhimalnim stanicama i stimuliraju produkciju proteaznih inhibitora koji sprječavaju razgradnju ECM proteina (68).

U SSc ekspresija tipa I i tipa II TGF-β receptora na fibroblastima je povećana, sugerirajući kako je latentna TGF-β aktivacija u SSc rezultat autokrine TGF-β aktivacije u senzitiziranoj stanici (53). TGF-β signalizacija regulira ekspresiju gena uglavnom kroz aktivaciju Smad transkripcijskih faktora, premda nekaskadni oblik aktivacije također postoji (tzv. ne-Smad put).

U SSc prisutna je aktivacija i deregulacija oba puta, vodeći ka pojačanoj regulaciji i sintezi tip I kolagena u fibroblastima (69). TGF-β1, TGF-βR1 i TGF-βR2 razine ekspresije su povišene u bioptatu kože SSc bolesnika u odnosu na zdrave kontrole (70).

Osim u fibrozi, TGF-β ima bitnu ulogu i u vaskulopatiji kao inicijalnom događaju u SSc. TGF-β je potentni inhibitor proliferacije i diferencijacije endotelnih stanica te sudjeluje u indukciji diferencijacije pericita, produkciji bazalne membrane i aktivaciji VEGF putem inhibiranja Ang1 ekspresije u pericitima i fibroblastima, uzrokujuću vaskularno curenje i početnu edematoznu fazu u SSc (71).

Interleukin 17

Interleukin 17 je obitelj citokina koji se sastoje od 6 strukturno povezanih citokina (IL-17A do IL-17F). IL-17A ključni je citokin u obrani domaćina od mukozalnih infekcija. Njegov glavni učinak u nehematopoetskim stanicama je induciranje akutnog odgovora sličnog urođenoj imunosnoj obrani. Temeljna funkcija IL-17 je indukcija kemokina (CXCL1, CXCL2 i CXCL8) koji privlače mijeloidne stanice poput neutrofila na mjesto infekcije ili ozljede. IL-17 također inducira IL-6 i čimbenika stimuliranja kolonija makrofaga (engl. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, skr. GM-CSF), citokina koji promoviraju mijeloid-vođenu urođenu imunost (72). Međutim, u slučaju kronične aktivnosti IL-17A pokazao se i kao proupalni citokin u mnogim autoimunosnim i upalnim bolestima (psorijaza, seronegativni spondiloartritis, multipla skleroza itd.), uz naglasak na tzv. IL-23/17 spregu kao glavni pokretač razvoja patološke upale (73,74).

Uloga IL-17 u SSc nije još uvijek u potpunosti razjašnjena. Povišene razine mRNA IL-17A ekspresije i Th17-limfocita nađeni su perifernim limfocitima i zahvaćenoj koži SSc-bolesnika (75).

U animalnim istraživanjima potvrđen je profibrotski učinak IL-17A. Koristeći se bleomicin-mišjim modelima (skr. BLM) sklerodermije pokazana je znatno viša razina cirkulirajućih Th17-limfocita u koži i plućima, kao i više serumske razine IL-17A, TGF-β1 i

IL-6. Također, IL-17A znatno je ubrzavao proliferaciju plućnih fibroblasta i ekspresiju kolagena tip I (76).

U istraživanju u kojemu je skupina autora koristila dva različita tipa mišjih modela (BLM i „chronic graft-versus-host disease“ (cGVHD)-miševi), nađena je povišena aktivnost IL-1 i IL-17 koja je korelirala s IL-6 i TNF-α aktivnosti, ali ne i TGF-β, a *in vitro* ispitivanje pokazalo je sinergističko djelovanje IL-1 i IL-17 u produkciji mišjih i ljudskih fibroblasta kože (77).

Kod *in vitro* istraživanja koristeći se ljudskim fibroblastima učinak IL-17 nije u potpunosti jasan.

Brembilla i sur u svom istraživanju pokazali su da Th-17 limfociti pojačavaju u *in vitro* fibroblastima proupalni odgovor istodobno inhibirajući produkciju kolagena, uz zaključak da je IL-17 u SSc povišen kao rezultat učinka autoimunosti, a ne kao rezultat fibroze (78).

Yang i skupina koautora pokazali su da u koži bolesnika s ranom SSc postoji pojačana infiltracija proupalnih stanica, uključujući IL-17+ i Foxp3+ limfocita. U serumu nađene su povišene razine Th17-limfocita kao i IL-17 koje su korelirale sa aktivnošću bolesti. U *in vitro* istraživanju IL-17 porijekla iz SSc-bolesnika poticao je rast fibroblasta i produkciju kolagena, a IL-17 neutralizirajuća protutijela učinkovito su blokirala produkciju kolagena (79).

Nakashima i sur su u svom radu prikazali povišene razine IL-17 u zahvaćenoj koži i serumu, a ekspresija IL-17R tip A u SSc-fibroblastima značajno je snižena u odnosu na fibroblaste zdravih kontrola posljedično intrizičnoj TGF-β1 aktivaciji u tim stanicama. IL-17A je reducirao ekspresiju proteina α1(I) kolagena i čimbenika rasta vezivnog tkiva što upućuje na to da IL-17A signalizacija ima antifibrotski efekt (80).

Vettori i sur pokazali su u svom *in vitro* istraživanju pojačanu produkciju IL-17A kada su limfociti-T i autologni fibroblasti iz kože SSc-bolesnika kokultivirani te opisali da IL-17A ima ulogu inhibicije profibrotskih gena uz izraženi proapoptotski učinak u kokultiviranim autolognim fibroblastima kože (81).

Dufour i sur pokazali su na modelu koristeći se keratinocit-fibroblast inerakcijom, da je IL-17A potentni antifibrotski faktor koji djeluje suprotno od TGF-β i smanjuje odlaganje ECM, ali promovira proupalni odgovor (82).

Povećana ekspresija IL-17 mRNK nađena je u nestimuliranim limfocitima periferne krvi i limfocitima iz zahvaćane kože i pluća SSc-bolesnika što je osobito povezano sa ranim stadijem bolesti (83).

Interleukin 22

Interleukin 22 (IL-22) pripada obitelji IL-10 citokina, a njegovo djelovanje prisutno je u raznim tkivima, kao što su crijeva, pluća, jetra, bubrezi, koža, gušterača i sinovija. Za razliku od drugih citokina, koji pretežno imaju učinak na hematopoetske stanice, njegov glavni učinak je na nehematopoetske epitelne i stromalne stanice gdje promovira proliferaciju i regeneraciju tkiva (84). Signalizacija IL-22 esencijalna je u popravku kože kao medijatora između imunosnih stanica i fibroblasta, inducirajući signalizaciju u fibroblastima koji reguliraju ECM produkciju i diferencijaciju miofibroblasta (85).

Povećana transkripcija IL-22 nađena je u koži SSc-bolesnika i u limfocitima koji infiltriraju zahvaćenu kožu (86).

IL-22-producirajući T-limfociti nađeni su povišeni u SSc- bolesnika, najizražajnije kod bolesnika sa zahvaćanjem pluća u sklopu bolesti (87).

IL-22 omogućuje u SSc- fibroblastima odgovor na TNF i ima značajnu ulogu u keratinocit-fibroblast interakciji koja pridonosi proupalnom odgovoru i aktivira fibrozu kože (88).

1.3. Klinička slika sistemske skleroze

Sistemska skleroza je prototip višesustavne fibrotske bolesti s važnim komplikacijama koji su također posljedica vaskulopatije i upale (89).

1.3.1. Vaskularne manifestacije bolesti

Jedno od osnovnih obilježja SSc te najčešće prvi simptom koji može čak i desetljećima prethoditi punoj kliničkoj slici bolesti je Raynaudov fenomen (90).

Raynudov fenomen

Raynaudov fenomen (RyF) (Slika 1.) je simetrični tranzitorni vaskularni događaj u kojemu prsti mijenjaju boju (bljedilo, cijanoza i hiperemija ponovnog punjenja krvnih žila) kao posljedica izlaganja hladnoći ili emocionalnom stresu. Dijeli se na primarni RyF (nastao kao poremećaj termoregulacije posljedično pretjeranom normalnom odgovoru na temperaturu) i sekundarni RyF (uz pridruženu bolest koja utječe na vaskularnu reaktivnost) (47).

Slika 1. Primarni Raynaudov fenomen
(izvor: Zavod za reumatologiju, kl. imunologiju i alergologiju, KBC Osijek)

Sekundarni Raynaudov fenomen najčešći je simptom SSc. Podatci iz EUSTAR baze pokazali su da je u prosjeku vrijeme između početka RyF i prvog ne-RyF simptoma ili znaka SSc u lkSSc oko 4,8 godina, a u dkSSc oko 1,9 godina. Svim bolesnicima (lkSSc i dkSSc) prosjek godina kada je započeo RyF bio je približno 42,9 godina. Svega 4% bolesnika uključenih u bazu (148 bolesnika/3346 bolesnika) nije imao RyF premda je ispunjavao ACR kriterije za dijagnozu SSc (91).

Digitalne ulceracije i ožiljkaste promjene vršaka prstiju

Digitalne ulceracije (DU) i ožiljkaste promjene vršaka prstiju (Slika 2.) mogu nastati kao posljedica mehaničkog (npr. kao posljedica kalcinoze) ili ishemijskog fenomena (npr. kao posljedica RyF). Pojavnost im je oko u 32-58% SSc bolesnika te su češće u bolesnika s dkSSc (9). Oko 73% SSc bolesnika će unutar pet godina od prve pojave simptoma koji nije RyF razviti prvi DU, a 43% bolesnika će razviti unutar prve godine od pojave ne-RyF simptoma (92).

Digitalne ulceracije vrlo teško cijele, uz procjenu da je u prosjeku „čistim“, ishemijskim DU (bez kalcinoze) potrebno oko 76,2 dana, a kalcinozom uzrokovanih DU oko 93,6 dana. Karakteristike DU vezane uz odgođeno cijeljenje su prisutnost fibrina, suha ili mokra nekroza, eshar, gangrena i ogoljenje kosti ili tetive te infekcija i osteomijelitis u području DU (93). Uzrok su smanjene kvalitete života bolesnika, povećavaju učestalost hospitalizacija, kardiovaskularno pogoršanje i smanjuju preživljenje (94).

Slikovne metode koje se koriste za procjenu vaskularne strukture i funkcije u bolesnika s postojećom SSc ili sumnjom na bolest su videokapilaroskopija, kao glavna metoda za

procjenu mikrožilja, potom laser doppler slikovne metode, infracrvena termografija, ultrazvučni doppler, digitalna suptrakcijska angiografija (DSA), MR/CT angiografija za procjenu makrožilja (93).

Slika 2. Raynaudov fenomen i DU u SSc
(izvor: Zavod za reumatologiju, kl. imunologiju i alergologiju KBC Osijek)

U SSc bolesnika periferna vaskulopatija može napredovati u kritičnu ishemiju i gangrenu. Koristeći se EUSTAR bazom podataka, uočeno je da oko 8,9% uključenih bolesnika ima anamnezu digitalne gangrene, a 42,7% ima pozitivnu anamnezu za DU, uz zaključak da je rizik za razvoj gangrene kod bolesnika sa DU dkSSc tip bolesti i duže trajanje bolesti (95).

1.3.2. Zahvaćanje kože u sistemskoj sklerozi

Zadebljanje kože specifičan je simptom SSc. S obzirom na proširenost dijeli se na 2 velika subtipa - limitirani oblik (zadebljanje kože distalno od koljena i laktova) te difuzni oblik (zadebljanje može zahvatiti sve dijelove kože). Poseban entitet je SSc bez zahvaćanja kože, tzv. SSc sine scleroderma, s mogućim zahvaćanjem unutarnjih organa uz pozitivitet za protutijela karakteristična za SSc (1,96).

Zahvaćanje kože ima 3 faze: edematozna, indurativna i atrofična. Nakon inicijalne faze koja može različito dugo trajati i karakterizirana je tjestastim edemom, dolazi do zadebljanja kože, koja kao posljedica ponavljanih ishemičnih kriza u konačnici vodi atrofiji (97).

U dkSSc Raynaudov fenomen pojavljuje se često, gotovo istodobno, sa zadebljanjem kože.

Dermalna induracija često je povezana s hipo i hiperpigmentacijskim promjenama (tip „sol-papar“) (Slika 3.) te teleangiektazijama koje su najčešće prisutne na licu i trupu. Zadebljanje kože lica dovodi do izgleda tzv. „lica poput maske“, uz ušiljeni izgled nosa te prisutnu mikrostomiju (Slika 4.). U ranom stadiju dkSSc prsti su vretenasto otečeni, edematozni, a kako bolest napreduje koža postaje indurirana i tanka, uz pojavu DU te postepeno razvoj kontrakture prstiju – sklerodaktiliju (Slika 5.).

Kako atrofija napreduje može se razviti destrukcija kosti i skraćenje distalnih falangi (akroosteoliza) (98).

Slika 3. Sjajna, zategnuta koža, hipo i hiperpigmentacijske promjene
(izvor: Zavod za reumatologiju, kl. imunologiju i alergologiju KBC Osijek

Slika 4. Mikrostomija, ušiljeni izgled lica

Slika 5. Sklerodaktilija

Slika 6. Kalcinoza u području pazuha

(izvor: Zavod za reumatologiju, kl. imunologiju i alergologiju KBC Osijek)

Za procjenu zadebljanja kože te praćenja progresije zadebljanja najčešće se upotrebljava modificirani Rodnanov kožni test (engl. modified Rodnan skin score, skr. mRSS). Palpacijom se određuje zadebljanje kože na 17 različitih mjesta na tijelu pomoću skale od 0 do 3 (0-nema zadebljanja; 3-vrlo zadebljana koža). mRSS dobar je pokazatelj progresije SSc, a prikladan je za kliničku praksu i ispitivanja.

Postoje brojna objektivna i subjektivna ograničenja ispravne procjene mRSS (npr. atrofija kože u kasnom stadiju, edematozna faza – obje se ocjenjuju sa 0) te je korelacija mRSS sa organskom zahvaćenosti bolja u ranom stadiju bolesti budući da se vremenom gubi klasična slika otvrdnuća kože (101,102).

1.3.3. Zahvaćanje mišićno-koštanog sustava u sistemskoj sklerozi

Mišićno-koštano zahvaćanje vrlo je česta manifestacija SSc. Najčešći simptomi postojeće miopatije je bolnost mišića i mišićna slabost koja se najčešće manifestira slabošću proksimalne skupine mišića, međutim moguće je zahvaćanje i distalnih mišića. Mišićna slabost prijavljena je od strane ordinirajućih liječnika u 18,9% bolesnika s lkSS te 33,5% bolesnika s dkSSc koji su ispunjavali ACR kriterije za dijagnozu SSc. U SSc karakteristično nema zahvaćanja respiratornih mišića (ukoliko su isti zahvaćeni, najvjerojatnije je prisutno preklapanje SSc i

polimiozitisa/dermatomiozitisa). Koristeći se EUSTAR bazom podataka nađena je povezanost između pojave krepitacija pri motilitetu zahvaćanih tetitva (engl. tendon friction rub) i pojave miopatije. Također je nađena povezanost između miopatije i pojavnosti miokarditisa i disfunkcije lijeve klijetke srca u SSc-bolesnika (103,104).

Zahvaćanje zglobova najčešća je mišićno-koštana manifestacija bolesti. Može se prezentirati tendinopatijom, kontrakturom zgloba, artralgijama, neerozivnim artritisom malih zglobova šaka, ručnih zglobova, koljena i gležnja, međutim opisani su i slučajevi erozivnog artritisa u SSc (98).

Koristeći se EUSTAR bazom podataka uočeno je kako bolesnici sa sinovitisom i ranom bolesti (trajanje ne-RyF simptoma <3 godine) imaju veću mogućnost opsežnijeg zahvaćanja kože. Također bolesnici sa sinovitisom neovisno o duljini trajanja bolesti imaju veću mogućnost razvoja PaH i miozitisa. Tendinopatija je češća u dkSSc te je povezana uz teške vaskularne, mišićne i bubrežne manifestacije bolesti kao i niži stupanj preživljenja (105).

1.3.4. Zahvaćanje pluća u sistemskoj sklerozi

Plućna hipertenzija (PH) i intersticijska bolest pluća (IBP) su najčešće plućne manifestacije SSc. Trenutno IBP je vodeći uzrok smrti u SSc bolesnika (10-godišnja smrtnost do 40%). Oko dvije trećine SSc-bolesnika razviju IBP, dok je PH prisutna u oko 20% SSc bolesnika koja je najčešće pridružena teškoj plućnoj bolesti, međutim može biti izolirana manifestacija bolesti (107).

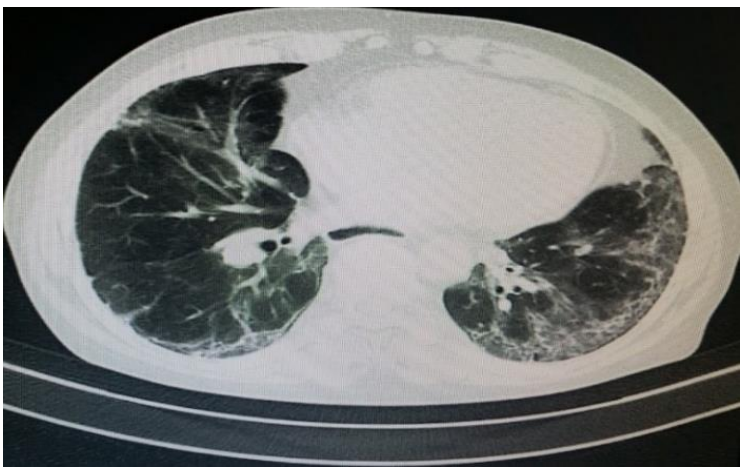
Intersticijska bolest pluća

Intersticijska bolest pluća može biti radiolološki i/ili histopatološki klasificirana kao nespecifična intersticijska pneumonija (NSIP), koja je ujedno i najčešći oblik SSc-IBP, potom uobičajena intersicijska pneumonija (UIP), difuzno alveolarno oštećenje, organizirajuća pneumonija i limfocitna intersticijska pneumonija (108).

Dijagnoza se postavlja na temelju nalaza kompjuterske tomografije visoke rezolucije (engl. high resolution computed tomography, skr. HRCT) (Slika 7.), a može biti praćen normalnim ili patološkim nalazom testova plućne funkcije (forsirani vitalni kapacitet, skr. FVC i difuzijski kapacitet za ugljični monoksid, skr. D_LCO) koji mogu pokazivati znakove restrikcije (109).

Rizični čimbenici za razvoj SSc-IBP su pozitivna ATA protutijela, potom difuzni tip bolesti (dkSSc), afričko-američko porijeklo, viši mRSS, povišen kreatinin i kreatin-kinaza (CK), hipotiroidizam i znakovi zahvaćanja srca. Rizični čimbenici za progresiju bolesti su difuzna bolest u odnosu na limitiranu, trajanje bolesti dulje od 5 godina, zahvaćanje plućnog parenhima > 20% na HRCT, FVC<70% i ATA pozitivitet (110).

Klinička slika može varirati od asimptomatske, osobito u početku bolesti, do simptomatske, uz simptome kao što su dispneja (prvobitno u naporu, a kasnije i u mirovanju), neproduktivni kašalj i umor. Fizikalni pregled može pokazati auskultacijom pluća inspiratorne krepitacije, tzv. velcro krepitacije.



Slika 7. NSIP uzorak u SSc na HRCT-u pluća
(izvor: Zavod za reumatologiju, kl. imunologiju i alergologiju KBC Osijek)

Plućna hipertenzija

Plućna hipertenzija opisuje heterogenu skupinu bolesti karakteriziranu povećanim srednjim plućnim arterijskim tlakom.

Pet podskupina je opisano: 1. plućna arterijska hipertenzija (PaH), 2. PH uslijed bolesti lijeve strane srca, 3. PH uslijed bolesti pluća i/ili hipoksije, 4. PH zbog opstrukcije plućne arterije. 5. PH s nejasnim ili višečimbeničnim mehanizmima (112).

Plućna arterijska hipertenzija je karakterizirana progresivnom vaskulopatijom plućne arterije koja povećava plućni vaskularni otpor i plućni arterijski tlak, vodeći k pojačanom

opterećenju desne strane srca uz disfunkciju desne klijetke te u konačnici srčanom popuštanju (113).

S obzirom na lošu prognozu bolesti (3.-godišnje preživljenje u bolesnika sa SSc-PaH je svega 52%) rana dijagnoza je ključna za liječenje i sprječavanje progresije bolesti.

U tu svrhu smišljen je tzv. „DETECT algoritam“ kao dokazani multimodalni pristup za detekciju bolesnika sa ranim stadijem PaH.

Prvi korak je procjena rizičnog bolesnika na temelju vrijednosti FVC, D_LCO, vrijednosti serumske razine urične kiseline i N terminal inaktivnog pro-B tip natrijuretskog peptida (nt-pro-BNP), prisutnost teleangiektazija i ACA pozitivitet te desna električna os na elektrokardiogramu (EKG). Drugi korak je ultrazvuk srca, a treći korak je desnostrana kateterizacija srca, kao zlatni standard u konačnoj dijagnozi PaH (114,115).

1.3.5. Zahvaćanje bubrega u sistemskoj sklerozi

Skleroderma renalna kriza (SRK) definirana je razvojem mikroangiopatije uz ubrzani razvoj hipertenzije i progresivne akutne bubrežne ozljede. Neki oblici SRK su normotenzivni s izrazito lošim ishodom bolesti (116).

Skleroderma renalna kriza rijetka je manifestacija bolesti, zahvaća od 5 do 15% SSc-bolesnika, u zadnjih godina incidencija SRK smanjila se za 2,4. Prediktivni čimbenici za razvoj SRK su anti-RNApoli3 pozitivitet, dkSSc, tendinopatija, artitis i liječenje glukokortikoidima. Liječenjem SRK inducirane hipertenzije inhibitorima angiotenzin-konvertaze (ACEI) poboljšani su ishodi liječenja, međutim ACEI ne sprječavaju razvoj SRK te moguće čak povećavaju mortalitet uzrokovan SRK (117).

1.3.6. Zahvaćanje srca u sistemskoj sklerozi

Zahvaćanje srca u SSc relativno je česta manifestacija bolesti, češće je asiptomatska, dok klinički evidentna bolest ima loš ishod i uzrok je smrti u oko 30% SSc-bolesnika.

Patološke promjene u SSc mogu zahvatiti sve strukture srca pa su na autopsijama SSc-bolesnika nađene promjene u obliku fibroze srca, uključujući fibrozu provodnog sustava,

upalne promjene miokarda, patologija zalistaka, promjene na perikardu i perikardijalni izljevi. Mikrovaskularne promjene najvjerojatnije su posljedica vaskulopatije mikrožilja koja se opisuje kao srčani Raynaudov fenomen. Fibroza srca u SSc je prisutna u obje klijetke i neovisna je o zahvaćanju koronarnih arterija (102,118).

Koristeći se EUSTAR bazom podataka uočeno je da je 26% uzroka smrti posljedica zahvaćanja srca, dok su aritmije, koje su ujedno opisane kao i najčešća srčana manifestacija bolesti, bile uzrokom smrti u 6% SSc bolesnika (109).

1.3.7. Zahvaćanje probavnog sustava u sistemskoj sklerozi

Probavni sustav je drugi po učestalosti zahvaćeni organski sustav u SSc bolesnika. Može biti zahvaćeni bilo koji dio probavnog sustava, od usne šupljine do anorektuma.

Najveća je incidencija u osoba između 44 i 55 godine te je 5 puta češća u žena u odnosu na muške bolesnike. Zahvaćanje jednjaka prisutno je u oko 90% SSc bolesnika (u obliku refluksnog ezofagitisa, ezofagealnih striktura, Barettovog jednjaka) uz simptome poput žgaravice, podrigivanja, osjećaja punoće, otežanog gutanja. SSc bolesnici također pate od hipomotiliteta tankog crijeva, potom bakterijskog prerastanja tankog crijeva (engl. small intestinal bacterial overgrowth, skr. SIBO) koje može voditi k malapsorpciji i malnutriciji, uzrokujući stopu smrtnosti oko 50%. Učestale su i fekalne inkontinencije (120,121)

Promjene koje nastaju najčešće su posljedica fibroze, upale i mišićne disfunkcije te neurogenog oštećenja, međutim postoje i vaskularne manifestacije zahvaćanja probavnog sustava kao što su gastrična antralna vaskularna ektazija (GAVE) i telengiektazija probavnog sustava, nastale kao posljedica difuzne vaskulopatije koja zahvaća i probavni sustav (122).

1.3.8. SICCA sindrom u sistemskoj sklerozi

Suhoća sluznica, osobito kserostomija, jedno je od simptoma koji prate SSc. Procjenjuje se da oko 40% bolesnika boluje od kserostomije koja može nastati kao posljedica fibroze žlijezda slinovnica (u 58% slučajeva) ili pridruženog Sjögrenova sindroma (skr. SS; u oko 23% bolesnika u bioptatu žlijezde slinovnice imalo je i prisutan limfocitni sijaladenitis). Reducirana produkcija sline češća je uz pojavu pozitivnih anti-SS protutijela te je povezanost nađena s aktivnosti i težini bolesti u dkSSc (123).

1.4. Dijagnoza sistemske skleroze

Dijagnozu SSc je lako postaviti u uznapredovaloj bolesti, kada je prisutno tipično zadebljanje kože, specifična protutijela te znakovi zahvaćanja unutarnjih organa, međutim rana dijagnoza i dalje ostaje izazov, kada su tipični znakovi i simptomi bolesti odsutni. Najraniji znakovi bolesti su Raynaudov fenomen i vretenasto otečene ruke. Podatci iz kanadske baze podataka pokazali su da je dijagnoza SSc odgođena za 6,1 godina od početka RyF, a 2,7 godina od pojave ne-RyF simptoma (124).

Dijagnoza sistemske skleroze postavlja se na temelju važećih ACR (American college of rheumatology)/EULAR (European league against rheumatism) klasifikacijskih kriterija, uz osjetljivost 0,91 i specifičnosti 0,92. Zadebljanje kože prstiju obiju šaka proksimalno od metakarpofalangealnih zglobova (9 bodova), vretenasto otečeni prsti (2 boda), sklerodaktilija (4 boda), teleangiektazije (2 boda), digitalne ulceracije (2 boda), ožiljkaste promjene vršaka prstiju (3 boda), zahvaćanje pluća - IBP ili PAH (2 boda), abnormalan kapilaroskopski nalaz (2 boda), RyF (3 boda) te SSc-specifična protutijela (3 boda) ulaze u klasifikacijske kriterije, a zbroj od 9 ili više upućuje da bi bolest trebala biti klasificirana kao SSc (125).

1.4.1. Protutijela specifična za sistemsku sklerozu

Anti-topoizomeraza protutijela (ATA), anticentromerna protutijela (ACA) i anti-RNA polimeraza III protutijela (anti-RNA-pol3) su klasična protutijela karakteristična za SSc te su stoga uvrštena u ACR/EULAR klasifikacijske kriterije iz 2013. godine za dijagnozu SSc (125).

Prevalencija ACA u SSc bolesnika je od 20-57,8% (osjetljivost 33%, specifičnost 93%) te su češća u lkSSc, sa vodećim simptomima vaskulopatije i povezuju se uz bolju prognozu bolesti. Prevalencija ATA u SSc bolesnika je između 14-71% (osjetljivost 24%, specifičnost 99,6%) te su češća u dkSSc uz izraženiju fibrozu kože i teže zahvaćanje organa (osobito pluća-IBP) te je povezana s nižom stopom preživljenja i lošijim ishodima bolesti. Anti-RNA-pol3 protutijela imaju prevalenciju u 4-20% SSc bolesnika (osjetljivost 16%, specifičnost 95,5%), a njihova pojavnost povezana je sa zahvaćanjem mišićno-koštanog sustava, GAVE, IBP, PAH i SRK te pratećim malignim bolestima (126).

Među ostalim protutijelima koje se mogu naći u SSc su protutijela na ribonuklearne proteine (anti-U3-RNP/anti-fibrilarin, anti-U1-RNP, anti-U11/U12-RNP), protutijela na nukleolarne

antigene (anti-Th/To, anti-NOR 90, anti-Ku, antiRuvBL1/2 i anti-PM/Scl), međutim manje su osjetljivosti i specifičnosti te stoga nisu uvršteni u klasifikacijske kriterije (127).

Pozitivna antinuklerna protutijela (ANA) prisutna su u više od 90% bolesnika te premda nisu uvrštena u klasifikacijske kriterije imaju veliku dijagnostičku važnost za dijagnozu vrlo rane SSc. Istraživanje je pokazalo da kod bolesnika koji imaju isključivo RyF kao simptom, prisutnost ANA i SSc-specifičnih protutijela su najjači nezavisni prediktor definitivnog razvoja SSc te su također biomarker razvoja teškog mikrovaskularnog oštećenja zabilježenog na kapilaroskopiji. Negativna ANA ne isključuje dijagnozu SSc; opisana je u oko 5-7% bolesnika, najčešće muškaraca, uz zahvaćanje donjeg probavnog sustava i teži tijek bolesti (128).

1.4.2. Kapilaroskopija

Strukturne mikrovaskularne pormjene jedno su od glavnih obilježja SSc i mogu biti prikazane neinvazivnom metodom kapilaroskopije ležišta nokta (engl. nailfold videocapillaroscopy, skr. NVC). Uređaj koji je zlatni standard za prikazivanje promjena je digitalni kapilaroskop koji kombinira mikroskop s digitalnom videokamerom. Slike se mogu opisivati kvalitativno (prepoznavanje uzorka koji se klasificira kao sklerodermijski) i kvantitativno (kapilare se procjenjuju po količini, odnosno po 1 mm) (129).

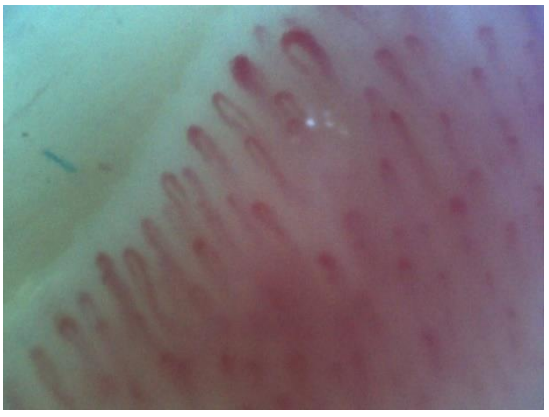
Cutolo i sur predložili su podjelu sklerodermijskog uzorka na 3 stadija:

1. rani (po koja dilatirana kapilara, jedna megakapilara i moguće tek nekoliko hemoragija) (Slika 8.),

2. aktivni (brojne megakapilare, uz reduciranu gustoću za 20-30% i blaža dezorganizacije vaskularne arhitekture) (Slika 9.) i

3. kasni (znatna redukcija u broju, uz avaskularna područja, pojedinačne megakapilare i krvarenje, grmolike kapilare kao znak neovaskularizacije) (Slika 10.) (130).

Kapilaroskopske promjene u SSc mogu se uočiti vrlo rano u bolesti, stoga su uvrštene u klasifikacijske kriterije za dijagnozu SSc. Pokazano je da čak 32% rizična ispitanika s prisutnim kapilaroskopskim promjenama u razdoblju od 31 mjeseca progrediraju u SSc (124).



Slika 8. Rani sklerodermijski uzorak

Slika 9. Aktivni sklerodermijski uzorak

Slika 10. Kasni sklerodermijski uzorak

(Izvor: Zavod za reumatologiju, kl. imunologiju i alergologiju KBC Osijek)

1.5. Liječenje sistemske skleroze

Prije uvođenja terapije ključno je učiniti procjenu aktivnosti bolesti te ustanoviti koji su organi aktivno zahvaćeni bolešću, potom procijeniti rizike i sigurnosni profil planirane terapije. Liječenje bi trebalo imati za cilj liječenje aktivnih organ-specifičnih komplikacija kojih je najčešće više (131).

1.5.1. Imunosupresijski lijekovi

Posljednjih godina sve se više različite imunosupresivne terapije primjenjuje u liječenju različitih manifestacija SSc. Tako, na primjer, ciklofosfamid (CIK), mikofenolat-mofetil (MMF) i azatioprin (AZA) koriste se za liječenje zahvaćenih pluća (IBP) i kože, a metotreksat (MTX) kod zahvaćanja kože (98). Također je sve raširenija uporaba biološke terapije. Tocilizumab (IL-6 inhibitor) pokazao se učinkovitim u sprječavanju progresije fibroze kože, sprječavanju pogoršanja FVC u bolesnika sa IBP, te kod artitisa i miozitisa vezanog uz SSc. Abatacept (CTLA-4 inhibitor) se pokazao uspješnim u smanjenju mRSS kod kožnih

manifestacija, anifrolumab (T1IFN-inhibitor) je u bioptiranoj SSc koži smanjio razinu transkripcije fibrotskih gena. Rituksimab (B-stanični CD20 inhibitor) već je u širokoj uporabi u SSc te je pri uporabi dokazano smanjenje mRSS kod fibroze kože, zaustavljanje progresije IBP, koristi se u SSc-miozitisa i artitisa, te za rezoluciju kalcinoza. Dovršena je faza I koja ispituje učinkovitost IL-17A inhibitora (brodalumaba) u terapiji SSc, potom inhibitora IL-4/13 te drugih blokatora, poput inhibitora kostimulacije B-limfocita (132,133).

Od ostalih lijekova, JAK2 (Janus-kinaza 2) inhibitori u početnim ispitivanjima pokazali su učinkovitost u smanjenju fibroze kože te zaustavljanju progresije fibroze pluća (134).

1.5.2. Vazoaktivni lijekovi

Blokatori kalcijskih kanala su lijekovi koji su najčešće u uporabi za liječenje DU. Fosfodiesteraza-5 (PDE-5) inhibitor, bosentan, je odobreni anatgonist endotelnih receptora (ERA) za liječenje DU. Analog prostaciklina (iloprost) koristi se za teški oblik RyF i ishemijske ulkuse u SSc. Za liječenje RyF u uporabi je fluoksetin, a statini su se također pokazali korisni u cijeljenju DU. Za liječenje PaH u uporabi su lijekovi koji djeluju na prostaciklinski put (epoprostenol, treprostinil, iloprost beraprost, seleksipag), lijekovi koji djelujuju na endotelni put (ERA: bosentan, macitentan i ambrisentan) i lijekovi koji djeluju na put dušičnog monoksida (sildenafil i tadalafil). Riciguat, uz svoja antifibrotska svojstva, ima također vazoaktivna svojstva (135).

1.5.3. Antifibrotski lijekovi

Odobreni antifibrotik za liječenje SSc je nintedanib, inhibitor tirozin kinaze (TK), koji se u pokazao učinkovit u poboljšanju FVC u bolesnika sa IBP. Ostali antifibrotici, čija se učinkovitost još uvijek istražuje u SSc, su riociguat, pirfenidon, agonisti kanabinoidnih receptora (lenabasum), potom TK inhibitori te taksinski i trombinski inibitori (136, 137).

1.5.4. Ostali lijekovi koji se primjenjuju u SSc

ACE inhibitori i dalje ostaju zlatni standard kod liječenja SRK (138). Kod zahvaćanja probavnog sustava, u slučaju SIBO upotrebljavaju se antibiotici u kombinaciji sa probioticima, a osobito koristan pokazao se Saccharomyces boulardii. Kod gatroezofagealne refluksne bolesti u uporabi su inhibitori protonske pumpe (IPP), a kod rezistentnih na IPP vonoprazan je pokazao efikasnost (5). Intravenska primjena imunoglobulina (IVIG) pokazala se korisna u pridruženom

artritisu i miozitisu, poboljšanju kožnih simptoma, u rezoluciji kalcinoze te simptoma zahvaćanja probavnog sustava (139).

1.5.5. Autologna transplantacija koštane srži

Autologna transplantacija koštane srži je terapijska opcija za liječenje teškog oblika SSc s visokim rizikom organskog popuštanja. Pokazala se korisnom u poboljšanju fibroze kože i u stabiliziranju ili poboljšanju plućne funkcije, osobito u bolesnika s trajanjem bolesti manje od 5 godina (140).

2. HIPOTEZA

Razina IL-17 i IL-22 viša je u bolesnika s dužim trajanjem bolesti, kod većeg stupnja proširenosti bolesti, kod izražajnije fibroze kože te kod fibrotskih promjena na unutarnjim organima, kao i kod bolesnika s izraženijom vaskulopatijom.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Primarni cilj je:

Izmjeriti serumske razine interleukina 17 i 22 u bolesnika sa sistemskom sklerozom te ispitati povezanost između izmjerene razine serumske koncentracije citokina s različitim tipovima i različitim stupnjem proširenosti bolesti te stupnjem vaskulopatije.

Sekundarni ciljevi su:

1. istražiti povezanost izmjerene razine serumske koncentracije ciljnih citokina s različitim kapilaroskopskim stadijima u bolesnika sa sistemskom sklerozom

2. istražiti povezanost izmjerenih citokina i autoprotutijela prisutnih u bolesnika

3. izmjeriti razinu serumske koncentracije TGF-β te ispitati postoji li povezanost između razine serumskih koncentracija TGF-β te IL-17 i IL-22

4. ISPITANICI I METODE

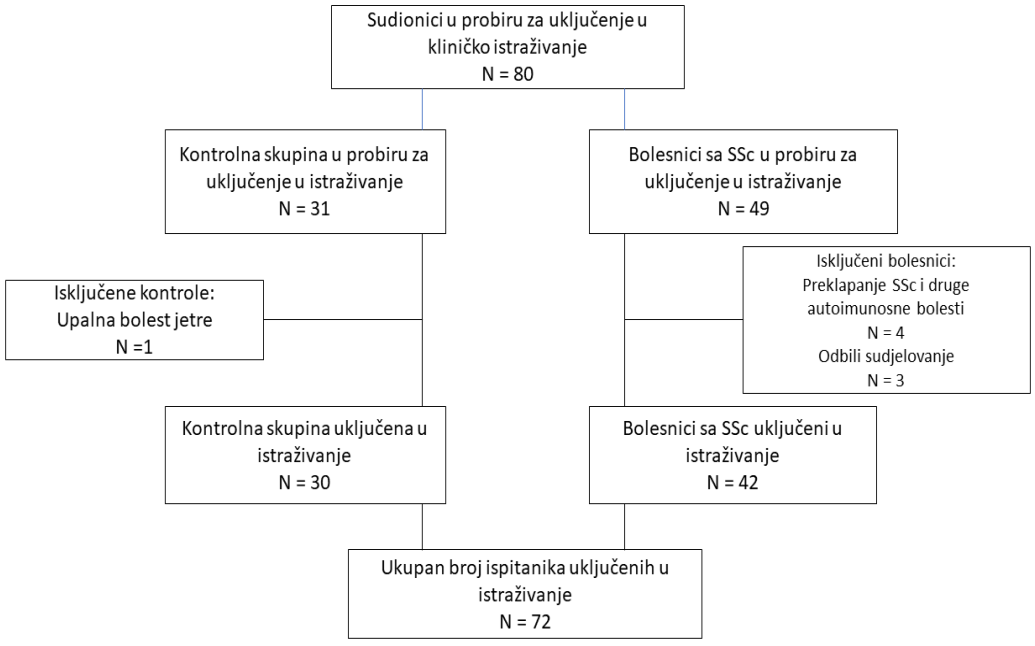
4.1. Ustroj studije

Provedeno istraživanje je kohortno presječno istraživanje te je u cijelosti provedeno u Kliničkom bolničkom centru Osijek (141).

Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Osijek (UR broj: R2-16 905/2018) i Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Osijek (Klasa: 602-04/22-08/02; UR broj: 2158-61-46-22-42)

Svi ispitanici potpisali su suglasnost za sudjelovanje u istraživanju nakon što su usmenim i pismenim putem bili upoznati sa svim postupcima tijekom istraživanja.

4.2. Ispitanici



Slika 11. Hodogram ustroja kliničkog istraživanja

U istraživanje je uključeno 72 ispitanika, od kojih su 42 bili bolesnici s dijagnozom sistemske skleroze, a 30 ispitanika bili su zdrava kontrolna skupina podudarna po spolu prvoj

skupini, bez poznate anamneze sustavne autoimunosne i upalne bolesti. Svi uključeni ispitanici bili su stariji od 18 godina.

U skupinu ispitanika sa dijagnozom sistemske skleroze uključeni su bolesnici koji su se liječili u Zavodu za reumatologiju, kliničku imunologiju i alergologiju Klinike za unutarnje bolesti, Kliničkog bolničkog centra Osijek s dijagnozom sistemske skleroze prema ACR/EULAR klasifikacijskim kriterijima iz 2013. godine.

Isključni kriteriji u istraživanju bili su: druga sustavna autoimunosna i/ili upalna bolesti (npr. reumatoidni artritis, sistemski eritemski lupus, dermatomiozitis/polimiozitis, seronegativni spondiloartritis, psorijaza, upalna bolest crijeva itd.), aktivna zloćudna bolest, trudnoća, prisutnost transplantiranog organa, veći stupanj opeklina na koži, primjena biološke terapije (interleukin 17 inhibitora, rituksimaba, IL-6 inhibitora), primjena antifibrotske terapije.

4.3. Metode

4.3.1. Anamneza i podatci iz medicinske dokumentacije

Anamnestički te iz medicinske dokumentacije uzeti su osnovni podatci o ispitanicima o dobi, spolu, tjelesnoj masi, tjelesnoj visini, indeksu tjelesne mase (kg/m^2), navikama (pušenje), podatci o vrsti i dozi lijekova koje bolesnik prima (glukokortikoidi, imunosupresivi) te o komorbiditetima.

Također su iz medicinske dokumentacije (povijesti bolesti) uzeti podatci o duljini trajanja bolesti, tip bolesti (limitirani ili difuzni) po predloženoj klasifikaciji *LeRoya i sur* (142), prisutnost SICCA sindroma (navođenje suhoće sluznica dulje od 3 mjeseca trajanja) te zahvaćanja različitih organa i sustava: prisutnost miozitisa definiranog kao simetrična slabost proksimalnih ekstremiteta uz povišenje serumske razine CK, artritisa definiranog kao prisutnog sinovitisa perifernih zglobova vidljivog tijekom pregleda, anemije definirane kao snižene razine serumskog hemoglobina ili broja eritrocita u perifernoj krvi, zahvaćanja jednjaka definiranog kao dismotilitet i dilatacija distalne dvije trećine jednjaka prikazano na RTG pasaži jednjaka barijevom kašom, intersticijska bolest pluća definirana kao bibazilarna fibroza pluća prikazana na high resolution computed tomography (HRCT), plućna arterijska hipertenzija definirana kao izmjereni srednji plućni arterijski tlak, engl. mean pulmonary artery pressure (mPAP) ≥25 mmHg utvrđenog desnostranom kateterizacijom srca, bubrežna kriza definirana kao maligna hipertenzija i brzopogresivno zatajenje bubrega potvrđeno biopsijom bubrega, kondukcijske smetnje provođenja identificirane na 12-kanalnom EKG-u kod zahvaćanja srca, osteoporoza

određena definicijom Svjetske zdravstvene organizacije kao T-score −2.5 standardne devijacije ili manje za područje lumbalne kralježnice (L1 – L4 kralježaka) i proksimalni dio bedrene kosti (vrat bedrene kosti, trohanter, zbirni rezultat za proksimalni dio bedrene kosti, Wardov trokut) izmjerenog denzitometrijom dvoenergetskim rendgenskim zrakama (DXA, engl. dual-energy X-ray absorptiometry) (143), koja je obavljena na uređaju GE Lunar Prodigy Primo.

4.3.2. Klinički pregled i dijagnostičke pretrage

Svakom bolesniku učinjen je tijekom posjete detaljan klinički pregled koji je uključivao procjenu zahvaćanja kože na temelju modificiranog Rodnan skin scora (mRSS), prisutnost tendinopatije palpacijom palmarne strane zahvaćane tetive uz aktivno bolesnikovo pomicanje zgloba ispod ispitivane tetive (engl.„tendon friction rub“), prisutnost vretenasto otečenih ruku (engl. puffy fingers) te prisutnost sklerodaktilije i digitalnih ulceracija (broj DU).

Svi bolesnici učinili su 6.-minutni test hoda (engl. 6-minute walk test, skr. 6MWT) u skladu s preporukama Europskog respiratornog društva (144).

Također, svakom bolesniku je učinjena videokapilaroskopija, pretraga je izvedena na Zavodu za reumatologiju, kliničku imunologiju i alergologiju Klinike za unutarnje bolesti KBCO na Optilia videokapilaroskopu koristeći se povećanjem 200x te su promjene na kapilarama klasificirane kao rani, aktivni ili kasni uzorak (130).

Za procjenu plućnog statusa bolesnika učinjeni su funkcijski plućni testovi (spirometrija i difuzijski kapacitet pluća za ugljikov monoksid-DLCo) na Zavodu za pulmologiju Klinike za unutarnje bolesti KBC-a Osijek na spirometru proizvođača Viasys Healthcare (pokriva zahtjeve ISO9001 i ISO13485) u skladu s preporukama Europskog respiratornog društva (145).

4.3.3. Laboratorijske pretrage

Uzorci krvi za laboratorijska mjerenja su uzeti natašte ujutro. Pri uzimanju uzoraka krvi korišteni su jednokratni vakuum sistemi (BD Vacutainer, Becton, Dickinson and Company, Francklin Lakes, New Jersey, SAD). Nakon uzimanja uzorka krvi, epruvete su centrifugirane 10 minuta na 3500 okretaja u minuti, a dobiveni serum alikvotiran je u plastične epruvete i pohranjen do analize na -70˚C.

Od hematoloških pretraga analizirane su vrijednosti sljedećih parametara obilježja: leukociti, eritrociti, MCV, MCH, MCHC, trombociti i sedimentacija eritrocita.

Od biokemijskih pretraga iz seruma su analizirane vrijednosti sljedećih parametara obilježja: urična mokraćna kiselina, N-terminalni propeptid moždanog natriuretskog peptida (NTproBNP), kalcij, fosfor, CK, LDH , 25(OH)D3 vitamin, željezo, nezasićeni kapacitet vezanja željeza (UIBC), ukupni kapacitet vezanja željeza (TIBC), saturacija transferina i feritin.

Hematološke pretrage učinjene su na hematološkom brojaču Sysmex XN-2000 (Sysmex Corporation, Kobe, Japan).

NT-proBNP je analiziran na imunokemijskom analizatoru Cobas e411 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Njemačka).

25(OH)D3 vitamin analiziran je metodom tekućinske kromatografije spregnute s tandem masenom spektrometrijom (LC-MS/MS 8050, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan).

Ostali biokemijski parametri određeni su na biokemijskom analizatoru Olympus AU680 (Beckman Coulter, Brea, California, SAD).

Anticentromerna protutijela, protutijela na antitopoizomerazu I (ATA I ili anti-Scl70), anti-U1-RNP protutijela (U1-RNP) i anti-Pm/Scl protutijela (Pm-Scl) su analizirana na koristeći se Luminex 200 analizatorum (Luminex Corporation, Austin, Texas, SAD) uz uporabu Fidis Connective Profile profil-testa (Theradiag, Beaubourg, France).

Globalni test antinuklearnih protutijela (ANA) određen je koristeći se indirektnom imunofluorescentnom tehnologijom (IIFT) na fluorescentnom mikroskopu Olympus Bx41TF (Olympus Corporation, Tokio, Japan) pomoću IIFT Mosaic Hep-2/Liver reagensa je upotrebljen (Euroimmun, Lubeck, Germany). Testni kit Reagens je dizajniran da detektira ljudska protutijela klase IgG protiv stanične jezgre i ostalih staničnih elemenata na dva biočipa po polju na koja su fiksirane stanice HeLa stanične linije humanog karcinoma dušnika (Hep-2) koristeći se Hep-2 stanicama i tkivo jetre. Rezultati su prikazani kao titar protutiijela s fluorescentnim uzorkom.

Za određivanje IL-17, IL-22 i TGF-β svakom ispitaniku uzorkovano je 3 mL periferne venske krvi u epruvetu bez antikoagulansa (BD Vacutainer, Becton, Dickinson and Company, Francklin Lakes, New Jersey, SAD). Uzorci su centrifugirani 10 min na 3500 okr/min.

Interleukin 17

Koncentracija IL-17 određena je „sendvič“ ELISA metodom pomoću reagensa Human IL-17 High Sensitivity ELISA kit proizvođača Invitrogen, Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, SAD). Postupak izvedbe analize proveden je prema uputama proizvođača.

Uzorci seruma ispitanika razrijeđeni su u omjeru 1:2 s puferom za razrjeđenje uzoraka. Na reakcijsku ploču koja na dnu ima vezano specifično antitijelo koje prepoznaje IL-17, pipetirano je 100 uL standarda i pripremljeni razrjeđenja uzoraka ispitanika. Odmah potom dodano je 50 uL biotin-konjugata nastao imunokompleks primarnog antitijela, IL-17 iz uzorka ispitanika i biotin-konjugata. Pločica je inkubirana preko noći u mraku na sobnoj temperaturi. Slijedeći dan pločica je isprana puferom za ispiranje 6 puta i dodano je 100 uL streptavidin-HRP reagensa. Reakcijska pločica inkubirana je 1h na Thermoshake miješalici (C.Gerhardt Analytical Systems, Königswinter, Njemačka). Specifično prepoznavanje i vezanje biotina i streptavidina omogućuje formiranje imunokompleksa čiju prisutnost je moguće dokazati kemijskom reakcijom. Nakon inkubacije pločica je isprana 6 puta puferom za ispiranje i dodano je 100 uL amplifikacijske otopine 1. Reakcijska smjesa u pločici inkubirana je 15 min u mraku na Thermoshake mješalici. Po isteku 15 min pločica je isprana 6 puta puferom za ispiranje kako bi se uklonio višak amplifikacijskog reagensa 1 i dodano je 100 uL amplifikacijskog reagensa 2. Reakcijska pločica inkubirana je 30 min u mraku na sobnoj temperaturi na Thermoshake miješalici. Nakon 30 min pločica je ponovno 6 puta isprana i dodan je supstrata 3,3´,5,5´-tetrametilbenzidin (TMB). Reakcijska pločica inkubirana je pokrivena bez pristupa svijetlosti kroz 20 minuta na miješalici . Enzim peroksidaza vezan u imunokompleksu oksidira TMB u radikal-kation koji reakcijsku smjesu boji plavo. Nakon 30 min dodano je 100 uL 1M fosforne kiseline kako bi se zaustavila enzimska reakcija. Dodatkom kiseline TMB radikal-kation oksidira u diimin koji boji reakcijsku smjesu žuto. Apsorbancija nastalog obojenja mjerena je na 450 nm na ELISA procesoru EtiMax 3000 (DiaSorin, Saluggia, Italija) i kreirana je standardna krivulja ovisnosti apsorbancije i koncentracije IL-17 u uzorku ispitanika. Pošto su uzorci seruma ispitanika razrijeđeni tijekom analize 1:2, konačni rezultat pomnožen je s razrjeđenjem.

Prema uputi proizvođača, raspon testa je 0,23-15 pg/mL, sa analitičkom osjetljivosti od 0,01 pg/mL.

Interleukin 22

Koncentracija IL-22 određena je „sendvič“ ELISA metodom pomoću reagensa Human IL-22 ELISA kit proizvođača Invitrogen, Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, SAD). Postupak izvedbe analize proveden je prema uputama proizvođača. Uzorci seruma ispitanika razrijeđeni su u omjeru 1:2 s puferom za razrjeđenje uzorka. Na reakcijsku ploču koja na dnu ima vezano specifično antitijelo koje prepoznaje IL-22, pipetirano je 100 uL standarda i pripremljeni razrjeđenja uzoraka ispitanika. Reakcijska ploča inkubirana je preko noći u

mraku na sobnoj temperaturi. Slijedeći dan pločica je oprana 3 puta s puferom za ispiranje i dodano je 100 uL biotin-konjugata. Pločica je inkubirana 1h na sobnoj temperaturi na Thermoshake mješalici kako bi nastao imunokompleks primarnog antitijela, Il-22 iz uzorka ispitanika i biotin-konjugata. Po isteku vremena inkubacije pločica je isprana 3 puta s puferom za ispiranje kako bi se uklonio višak biotin-konjugata i dodano je 100 uL reagensa koji sadrži streptavidin vezan s enzimom peroksidazom. Reakcijska pločica inkubirana je 1h na sobnoj temperaturi na Thermoshake mješalici. Nakon inkubacije pločica je isprana 3 puta puferom za ispiranje i dodano je 100 uL TMB supstrata. Reakcijska pločica inkubirana je pokrivena bez pristupa svijetlosti kroz 10 minuta na mješalici. Enzim peroksidaza vezan u imunokompleksu oksidira TMB u radikal-kation koji reakcijsku smjesu boji plavo. Nakon 10 min dodano je 100 uL 1M fosforne kiseline kako bi se zaustavila enzimska reakcija. Dodatkom kiseline TMB radikal-kation oksidira u diimin koji boji reakcijsku smjesu žuto. Apsorbancija nastalog obojenja mjerena je na 450 nm na ELISA procesoru EtiMax 3000 i kreirana je standardna krivulja ovisnosti apsorbancije i koncentracije IL-22 u uzorku ispitanika. Pošto su uzorci seruma ispitanika razrijeđeni tijekom analize 1:2, konačni rezultat pomnožen je s razrjeđenjem.

Prema uputi prizvođača, raspon testa je 31,3-2.000 pg/mL, sa analitičkom osjetljivosti od 5,0 pg/mL.

TGF-β

Koncentracija TGF-β određena je „sendvič“ ELISA metodom pomoću reagensa Human TGF beta1 ELISA kit proizvođača Invitrogen, Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, SAD). Postupak izvedbe analize proveden je prema uputama proizvođača. Uzorci seruma ispitanika razrijeđeni su u omjeru 1:10 s Assay puferom (fosfatni pufer pH 7,5 s 10% goveđeg albumina i 1% Tween 20 detergenta). U razrijeđeni uzorak dodano je 20 uL 1N klorovodične kiseline kako bi se oslobodio TGF-β vezan na proteine seruma. Uzorci su promiješani i inkubirani 1h na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije razrijeđeni uzorak neutraliziran je dodatkom 20 uL 1N natrijeve lužine. Prije dodatka razrijeđenih uzoraka na reakcijsku ploču koja sadrži primarno antitijelo specifično za TGF-β, uzorci su prema uputi proizvođača dodatno diluirani 1:20 sa Assay pufer otopinom. Na reakcijsku ploču pipetirano je 100 uL standarda i pripremljeni razrjeđenja uzoraka ispitanika i inkubirano 2h na sobnoj temperaturi na Thermoshake mješalici. Nakon inkubacije pločica je oprana 5 puta s puferom za ispiranje i dodano je 100 uL biotin-konjugata. Pločica je ponovno inkubirana 1h na sobnoj temperaturi na Thermoshake mješalici kako bi nastao imunokompleks primarnog antitijela, TGF-β iz uzorka ispitanika i biotin-konjugata. Po isteku vremena inkubacije pločica je isprana

5 puta s puferom za ispiranje kako bi se uklonio višak biotin-konjugata i dodano je 100 uL reagensa koji sadrži streptavidin vezan s enzimom peroksidazom. Reakcijska pločica inkubirana je 1h na sobnoj temperaturi na Thermoshake mješalici. Nakon inkubacije pločica je isprana 5 puta puferom za ispiranje i dodano je 100 uL TMB supstrata. Reakcijska pločica inkubirana je pokrivena bez pristupa svijetlosti kroz 30 minuta na miješalici. Enzim peroksidaza vezan u imunokompleksu oksidira TMB u radikal-kation koji reakcijsku smjesu boji plavo. Nakon 30 min dodano je 100 uL 1M fosforne kiseline kako bi se zaustavila enzimska reakcija. Dodatkom kiseline TMB radikal-kation oksidira u diimin koji boji reakcijsku smjesu žuto. Apsorbancija nastalog obojenja mjerena je na 450 nm na ELISA procesoru EtiMax 3000 i kreirana je standardna krivulja ovisnosti apsorbancije i koncentracije TGF- β u uzorku ispitanika. Pošto su uzorci seruma ispitanika razrijeđeni tijekom analize 1:30, konačni rezultat pomnožen je s razrjeđenjem.

Prema uputi proizvođača, raspon testa je 31-2.000 pg/mL , sa analitičkom osjetljivosti od 8,6 pg/mL.

Sve laboratorijske pretrage učinjene su na Zavodu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Osijek.

4.3.4. Statističke metode

Kategorijski podatci predstavljeni su apsolutnim i relativnim frekvencijama. Razlike kategorijskih varijabli testirane su Fisherovim egzaktnim testom. Normalnost raspodjele kontinuiranih varijabli testirana je Shapiro – Wilkovim testom. Kontinuirane varijable opisane su medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Razlike kontinuiranih varijabli između dvije nezavisne skupine testirane su Mann Whitney U testom (uz Hodges – Lehmannovu razliku i pripadni 95% raspon pouzdanosti), a u više nezavisnih skupina Kruskal Wallisovim testom (Post hoc Conover).

Zbog odstupanja od normalna raspodjele povezanost kontinuiranih varijabli ocijenjena je Spearmanovim koeficijentom korelacije ρ (rho). Utjecaj više čimbenika na vjerojatnost postojanja sistemske skleroze ocijenjen je logističkom regresijom (korekcija za dob). Sve su P vrijednosti dvostrane. Razina je značajnosti postavljena na Alpha = 0,05.

Za statističku analizu korišten je statistički program MedCalc® Statistical Software version 20.215 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; https://www.medcalc.org; 2023) i IBM SPSS Statistics 23 (IBM Corp. Released 2015. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0. Armonk, NY: IBM Corp.).

5. REZULTATI

5.1. Obilježja bolesnika sa sistemskom sklerozom i kontrolne skupine

Istraživanje je provedeno na 72 ispitanika, od kojih su 42 (58 %) bolesnika sa sistemskom sklerozom (SSc), a 30 (42 %) ispitanika su zdrava kontrolna skupina. Nema značajnih razlika u raspodjeli ispitanika s obzirom na spol i skupine (Tablica 1).

Tablica 5.1. Raspodjela ispitanika prema spolu i skupinama

	Broj (%) ispitanika			P*
	Kontrolna skupina	Bolesnici sa SSc	Ukupno	
Muškarci	5 (17)	6 (14)	11 (15)	0,78
Žene	25 (83)	36 (86)	61 (85)	
Ukupno	30 (100)	42 (100)	72 (100)	

*Fisherov egzaktni test

Postojala je statistički značajna razlika (Mann Whitney U test, P = 0,001) u dobi između skupine bolesnika sa sistemskom sklerozom (medijan dobi 52; IQR 44 – 57) i kontrolne skupine (medijan dobi 61; IQR 51 – 67); (razlika 9,5; 95% raspon pouzdanosti: 4-14).

Od ukupnog broja bolesnika sa sistemskom sklerozom 37 bolesnika imao je limitirani (lkSSC) a 4 difuzni oblik bolesti (dkSSc).

Najčešća klinička obilježja bolesnika sa sistemskom sklerozom su sklerodaktilija u 50% bolesnika, vretenasto otečene ruke te intersticijska bolest pluća koja su pronađena u 48% slučajeva. Prisutna klinička obilježja su prikazana u Tablici 5.2.

Tablica 5.2. Klinička obilježja bolesnika sa sistemskom sklerozom

Kliničko obilježje	Broj (%)
Anemija	4 (10)
Miozitis	0
Renalna kriza	0
PaH*	4 (10)
Osteoporoza	9 (21)
Artritis	8 (19)
Zahvaćenost jednjaka	15 (21)
Vretenasto otečene ruke	20 (48)
Sklerodaktilija	21 (50)
Intersticijska bolest pluća	20 (48)
SICCA sindrom	8 (19)
Tendinopatija	11 (27)
Smetnje provođenja na EKG†	18 (43)

*plućna arterijska hipertenzija; †elektrokardiogram

5.2. Vrijednosti IL-17, IL-22 i TGFβ u bolesnika sa sistemskom sklerozom i kontrolnoj skupini

Ispitivanjem razina IL-17, IL-22 i TGFβ između bolesnika sa sistemskom sklerozom i kontrolne skupine nađena je značajna razlika u vrijednostima samo u slučaju IL – 22 između kontrolne skupine i skupine bolesnika sa sistemskom sklerozom (Mann Whitney U test, P = 0,02) (Tablica 5.3.)

Kako za analizirane IL-17, IL-22 i TGF ne postoji trenutni znanstveni konsenzus oko toga što su povišene vrijednosti, učinjena je analiza podataka te su povišene vrijednosti u svrhu ovog istraživanja definirane za IL-17 i IL-22 kao vrijednosti koje su više od 2 standardne devijacije aritmetičke sredine svih mjerenja kontrolne skupine. Za TGF ß granična vrijednost (60,3) je aritmetička sredina kontrole (bez stand. devijacije), s obzirom da je vrijednost 2 SD veća od vrijednosti aritmetičke sredine.

Tablica 5.3. Razlike u vrijednostima IL-17, IL-22 i TGF između bolesnika sa sistemskom sklerozom i kontrolne skupine

	Medijan (interkvartilni raspon)		Razlika† (95% raspon pouzdanosti)	*P**
	Kontrolna skupina	Bolesnici sa SSc		
IL – 17	0,123 (0,019 – 0,503)	0,288 (0,014 – 0,904)	0,017 (-0,012 do 0,31)	0,71
IL - 22	98,01 (75,72 – 132,04)	117,8 (91,72 – 179,27)	23,8 (2,02 do 46,4)	**0,02**
TGF ß	27 (8,75 – 137,75)	71 (15,75 – 139,75)	8 (-7 do 35)	0,28

*Mann Whitney U test; †Hodges – Lehmannova razlika medijana

Nisu nađene razlike u udjelu povišenih vrijednosti IL-17, IL-22 i TGF između skupine bolesnika sa sistemskom sklerozom i kontrolne skupine (Tablica 5.4.)

Tablica 5.4. Razlike u raspodjeli ispitanika prema vrijednostima IL-17, IL-22 i TGFβ

	Broj (%) ispitanika			*P**
	Kontrolna skupina	Bolesnici sa SSc	Ukupno	
IL - 17				
Normalne vrijednosti	29 (97)	35 (83)	64 (89)	0,13
Povišene razine	1 (3)	7 (17)	8 (11)	
IL - 22				
Normalne vrijednosti	29 (97)	37 (88)	66 (92)	0,39
Povišene razine	1 (3)	5 (12)	6 (8)	
TGF ß				
Normalne vrijednosti	20 (67)	19 (45)	39 (54)	0,07
Povišene razine	10 (33)	23 (55)	33 (46)	

*Fisherov egzaktni test

Da bi se procijenila vrijednost IL-17, IL-22 i TGFβ u predviđanju negativnog ishoda korištena je metoda izračuna ROC krivulje (jednostavan način procjene razlike pojedinog pokazatelja između skupina ispitanika), a određuje se temeljem specifičnosti i senzitivnosti kojom se stupnjevito mijenjaju vrijednosti koje razlučuju ispitanike kontrolne skupine od skupine sa SSc. Mijenjana je točka razlučivanja za pojedinu skupinu ispitanika (engl. *cut-off point*), kako bi se stvaranjem ROC-krivulje moglo objektivno utvrditi koja vrijednost najbolje razlučuje uspoređene skupine.

U našim podacima, jedino vrijednost IL-22 možemo prikazati kao značajan dijagnostički pokazatelj sistemske skleroze (senzitivnost = 64,3, specifičnost = 63,3, P = 0,02) (Tablica 5.5. i Slika 5.1).

Tablica 5.5. Parametri ROC krivulje IL-17, IL-22 i TGFβ s obzirom na postojanje sistemske skleroze

	AUC*	95% CI†	senzitivnost	specifičnost	cut off	Youden index	*P*
IL-17	0,520	0,398 – 0,640	71,4	3,4	> 0,01	0,251	0,77
IL- 22	0,657	0,536 – 0,765	64,3	63,3	> 104,4	0,276	**0,02**
TGF ß	0,575	0,452 – 0,690	54,8	66,7	>46	0,214	0,28

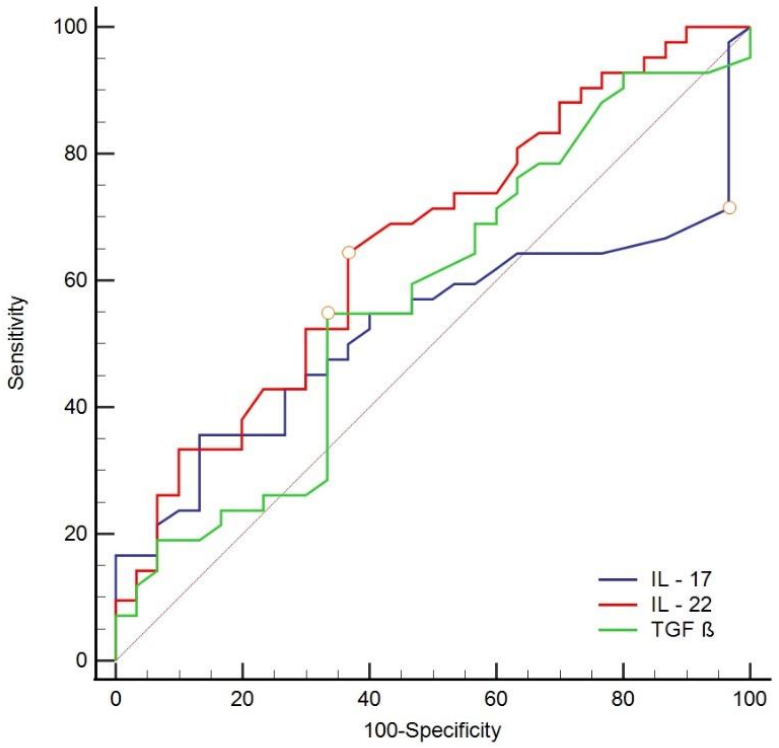
AUC* – površina ispod krivulje; 95% CI† – 95% interval pouzdanosti

Analiza je pokazala da ne postoje značajne razlike između vrijednosti AUC između IL-17, IL-22 i TGFβ (Tablica 5. 6.)

Tablica 5.6. Razlike u AUC između IL-17, IL-22 i TGFβ1

	AUC*	Razlika IL-17 i IL-22 (95% CI) †	Razlika IL-17 i TGF ß (95% CI)	Razlika IL-22 i TGFß (95% CI)
IL-17	0,520	0,131 (-0,017 do 0,279) P = 0,08	0,049 (-0,140 do 0,237) P = 0,61	0,083 (-0,098 do 0,263) P = 0,37
IL- 22	0,645			
TGF ß	0,575			

*AUC – površina ispod krivulje; † 95% CI – 95% interval pouzdanosti



Slika 5.1. ROC krivulja za vrijednosti IL-17, IL-22 i TGFβ s obzirom na postojanje sistemske skleroze

Iako je ROC analiza pokazala da bi IL – 22 bio značajan pokazatelj sistemske skleroze (Tablica 5.5.) logističkom regresijom (korekcija za dob) niti jedan od promatranih parametara (IL-17, IL-22 i TGFβ) nije značajan prediktor sistemske skleroze (Tablica 5.7.)

Tablica 5.7. Utjecaj IL-17, IL-22 i TGFβ kao prediktora sistemske skleroze (logistička regresija)

	ß*	Wald	*P*	OR†	95% CI‡
IL-17	0,496	2,09	0,15	1,64	0,84 do 3,22
IL- 22	0,007	2,47	0,12	1,01	0,99 do 1,016
TGF ß	0,004	1,45	0,23	1,00	0,99 do 1,01

ß* – koeficijent regresije; OR†– omjer izgleda; 95% CI‡ – 95% interval pouzdanosti

5.3. Vrijednosti IL-17, IL-22 i TGFβ u odnosu na klinička obilježja i zahvaćenost organa

Analizirane su vrijednosti IL-17, IL-22 i TGFβ u odnosu na klinička obilježja i zahvaćenost organa.

IL - 17 je značajnije povišen kod prisustva anemije (Mann Whitney U test, P = 0,02) i plućne arterijske hipertenzije (Mann Whitney U test, P = 0,01) (Tablica 5.8), a IL – 22 u bolesnika sa intersticijskom plućnom bolesti (Mann Whitney U test, P = 0,007) (Tablica 5.9). TGFβ nije značajno povišen niti u jednom promatranom kliničkom obilježju (Tablica 5.10.)

Tablica 5.8. Vrijednosti IL-17 u odnosu na klinička obilježja i zahvaćenost organa

	Medijan (interkvartilni raspon)		Razlika† (95% raspon pouzdanosti)	*P**
	Ne	Da		
IL - 17				
Anemija	0,230 (0,014 – 0,786)	2,409 (0,887 – 9,562)	1,04	**0,02**
PaH‡	0,230 (0,014 – 0,722)	1,786 (0,978– 15,201)	1,04	**0,01**
Osteoporoza	0,274 (0,014 – 1,053)	0,302 (-0,45 – 0,296)	0,004 (-0,46 – 0,30)	0,79
Artritis	0,288 (0,014 – 0,790)	0,220 (0,014 – 7,123)	0,006 (-0,03 do 5,41)	0,67
Zahvaćenost jednjaka	0,328 (0,014 - 1,018)	0,200 (0,015 – 0,773)	-0,004 (-0,41-0,19)	0,72
VO ruke§	0,267 (0,018 – 1,05)	0,315 (0,014 – 0,586)	-0,04 (-0,632– 0,196)	0,45
Sklerodaktilija	0,328 (0,014 – 0,773)	0,260 (0,017 – 0,941)	0,002 (-0,29 do 0,37)	0,79
IBP‖	0,203 (0,014 – 0,786)	0,301 (0,016 – 2,409)	0,052 (-0,09 do 0,66)	0,42
SICCA sy	0,230 (0,014 – 0,722)	0,847 (0,206 – 4,596)	0,502 (-0,02 do 3,75)	0,09
Tendinopatija	0,302 (0,014 – 1,018)	0,260 (0,015 – 0,789)	0,002 (-0,34 do 0,42)	0,85
Smetnje provođenja na EKG¶	0,264 (0,014 – 0,845)	0,288 (0,018 – 1,05)	0,01 (-0,19 do 0,38)	0,49

*Mann Whitney U test; †Hodges – Lehmannova razlika medijana; ‡plućna arterijska hipertenzija; §vretenasto otečene ruke;‖intersticijska bolest pluća; ¶elektrokardiogram

Tablica 5.9. Vrijednosti IL-22 u odnosu na klinička obilježja i zahvaćenost organa

	Medijan (interkvartilni raspon)		Razlika† (95% raspon pouzdanosti)	*P**
	Ne	Da		
IL - 22				
Anemija	114,45 (91,7 – 167,2)	230,6 (140,8 – 448,6)	87,9	0,09
PaH‡	114,5 (91,7 – 172,5)	390,2 (128,1–1095,6)	110,2	0,15
Osteoporoza	128,3 (91,7 – 192,4)	108,2 (94,9 – 121,4)	-25,8 (-77,7 do 10,6)	0,19
Artritis	114,5 (91,7 – 177,2)	138,2 (99,5 – 195,1)	12,1 (-36,6 do 71,3)	0,55
Zahvaćenost jednjaka	128,3 (91,7 – 182,3)	109,1 (100,7 – 165,9)	-7,7 (-147,8 do 25,8)	0,75
VO ruke§	123,1 (106,3 – 196,6)	105,3 (87,5 – 156,8)	-26,1 (-69,4 do 3,8)	0,08
Sklerodaktilija	108,2 (89,2 – 168,5)	117,8 (105,8 – 188,3)	20,2 (-11,5 do 56,08)	0,18
IBP‖	103,4 (88,9 – 133,9)	145,3 (108,7 – 250,8)	43,5 (11,6 – 99,8)	**0,007**
SICCA sy	117,8 (99,5 – 172,5)	11,5 (85,06 – 197,4)	-10,5 (-52,7 do 59,4)	0,67
Tendon friction rub	117,8 (91,7 – 171,2)	128,3 (104,8 – 318,2)	16,7 (-22,3 do 94,1)	0,39
Smetnje provođenja na EKG¶	110,1 (91,7 – 133,01)	156,75 (99,5–284,02)	38,5 (-4,86 do 93,8)	0,09

*Mann Whitney U test; †Hodges – Lehmannova razlika medijana; ‡plućna arterijska hipertenzija; §vretenasto otečene ruke; ‖intersticijska bolest pluća; ¶elektrokardiogram

Tablica 5.10. Vrijednosti TGFβ u odnosu na klinička obilježja i zahvaćenost organa

	Medijan (interkvartilni raspon)		Razlika† (95% raspon pouzdanosti)	*P**
	Ne	Da		
TGFβ				
Anemija	73,5 (19 – 142)	35,5 (8,5 – 85)	-20	0,26
PaH‡	66,5 (17 – 139)	80,5 (42 – 113,5)	-1	0,97
Osteoporoza	76 (19,8 – 139,8)	36 (1,75 – 131,3)	-15 (-76 do 25)	0,29
Artritis	66,5 (9 – 127)	106,5 (25,5 – 157)	20 (-14 do 125)	0,16
Zahvaćenost jednjaka	85 (21 – 132,3)	30 (9 – 151,5)	-9 (-67 do 25)	0,50
VO ruke§	78 (24 – 142)	31,5 (9 – 136,5)	-11 (-58 do 17)	0,36
Sklerodaktilija	36 (9 – 135,3)	71 (23 – 145)	- (-22 do 52)	0,44
IBP‖	31,5 (12 – 105)	110 (22 – 154,5)	30,5 (-4 do 86)	0,09
SICCA sy	71 (20 – 139)	47 (5,5 – 131,5)	-12 (-69 do 43)	0,40
Tendinopatija	36 (13,3 - 118)	127 (33,5 – 157,8)	32 (-11 do 88)	0,19
Smetnje provođenja na EKG¶	71 (19,5 – 136,5)	69 (9 – 142)	-3,5 (-35 do 38)	0,78

*Mann Whitney U test; †Hodges – Lehmannova razlika medijana; ‡plućna arterijska hipertenzija; §vretenasto otečene ruke; ‖intersticijska bolest pluća; ¶elektrokardiogram

5.4. Vrijednosti IL-17, IL-22 i TGFβ u odnosu na laboratorijske, funkcijske i kliničke pretrage

IL – 17 značajno pozitivno korelira sa vrijednostima NTproBNP-a a negativno sa indeksom tjelesne mase (ITM) i 6 minutnim testom hoda. IL – 22 pozitivno korelira sa vrijednostima CRP-a i brzinom sedimentacije eritrocita, a negativno sa forsiranim ekspiratornim volumenom u prvoj sekundi (FeV1). TGFβ pozitivno korelira sa vrijednostima fosfora (P) u krvi. Ostali analizirani podaci se nalaze u Tablici 5.11.

Tablica 5.11. Povezanosti vrijednosti IL-17, IL-22 i TGFβ s laboratorijskim, dijagnostičkim i kliničkim pretragama te trajanjem bolesti

	Spearmanov koeficijent korelacije Rho (P vrijednost)		
	IL - 17	IL - 22	TGF ß
Trajanje bolesti	0,194 (0,22)	0,258 (0,10)	-0,241 (0,12)
ITM (kg/m^2)*	**-0,334 (0,03)**	-0,214 (0,17)	0,088 (0,58)
IgG†	0,141 (0,37)	0,023 (0,89)	0,161 (0,31)
CRP‡	0,300 (0,05)	**0,415 (0,006)**	0,078 (0,62)
Leukociti	0,072 (0,65)	0,244 (0,12)	0,011 (0,94)
SE§	0,269 (0,09)	**0,478 (0,001)**	-0,089 (0,57)
Urati	-0,03 (0,85)	0,096 (0,54)	-0,030 (0,85)
NTproBNP‖	**0,532 (<0,001)**	0,168 (0,29)	0,028 (0,86)
Kalcij	-0,190 (0,23)	-0,050 (0,75)	-0,167 (0,29)
P¶	0,056 (0,73)	0,099 (0,53)	**0,359 (0,02)**
LDH**	0,162 (0,30)	0,068 (0,67)	0,174 (0,27)
25(OH)D_3 vitamin	-0,050 (0,75)	0,016 (0,92)	-0,029 (0,85)
FVC††	-0,050 (0,75)	-0,176 (0,27)	-0,115 (0,47)
FeV1‡‡	-0,217 (0,17)	**-0,336 (0,03)**	-0,069 (0,66)
D_LCO§§	-0,242 (0,12)	-0,232 (0,14)	-0,100 (0,53)
spO_2‖‖	-0,250 (0,11)	-0,173 (0,27)	-0,013 (0,93)
6MWT¶¶	**-0,442 (0,003)**	-0,197 (0,21)	0,086 (0,59)
mRSS***	0,031 (0,84)	0,191 (0,23)	0,014 (0,93)
Broj DU†††	0,142 (0,37)	0,115 (0,47)	-0,058 (0,71)

*indeks tjelesne mase; †imunoglobulin G; ‡C-reaktivni protein; §sedimentacija eritrocita; ‖ N-terminalni propeptid moždanog natriuretskog peptida; ¶fosfor; **laktat-dehidrogenaza; ††forsirani vitalni kapacitet; ‡‡ forsirani ekspiratorni volumen u 1. sekundi; §§ difuzijski kapacitet za ugljični monoksid; ‖‖ periferna kapilarna zasićenost kisikom; ¶¶6.minutni test hoda; ***modificirani Rodnan kožni test; ††† digitalne ulceracije

Povišene vrijednosti IL – 17 su povezane sa povišenim vrijednostima NTproBNp-a (Mann Whitney U test, P = 0,006) (Tablica 5.12.)

Tablica 5.12. IL-17 u odnosu na biokemijske pokazatelje

	n	Medijan (interkvartilni raspon) IL – 17	Razlika	95% raspon pouzdanosti	*P**
CRP‡					
Referentne	27	0,104 (0,014 – 0,762)	0,246	-0,006 do 0,774	0,13
> 5	15	0,494 (0,079 – 4,333)			
Leukociti					
do 3,4	1	0,790 (n = 1)			
referentna (3,4-9,7)	32	0,288 (0,013 – 0,754)	-	-	0,40†
> 9,7	8	0,656 (0,028 – 3,276)			
SE§					
referentna (2 - 13)	20	0,041 (0,014 – 0,640)	0,251	-0,006 do 0,708	0,12
> 13	22	0,400 (0,038 – 1,126)			
NTproBNP‖					
referentna (< 125)	17	0,016 (0,008 – 0,379)	0,392	0,028 do 0,888	**0,006**
≥ 125	24	0,700 (0,152 – 1,788)			
Ca¶					
< 2,154	1	1,052 (n = 1)			
referentna (2,154 – 2,53)	36	0,351 (0,014 – 0,980)			0,13†
> 2,53	5	0,016 (0,013 – 0,039)			
P**					
referentna (0,79-1,42)	41	0,302 (0,014 – 0,978)	-	-	-
> 1,42	1	0,006 (n = 1)			
LDH††					
< 130	1	0,016 (0,016 – 0,016)			
referentna (130 – 241)	32	0,237 (0,014 – 0,700)	-	-	0,11
> 241	9	0,904 (0,221 – 10,46)			
25(OH)D_3‡‡					
< 20	19	0,302 (0,015 – 0,789)	0,002	-0,288 do 0,376	0,83
referentna (20 – 100)	23	0,200 (0,014 – 1,09)			
IgG§§					
do 7	1	0,494 (n = 1)			
referentna (7 – 16)	36	0,267 (0,014 – 0,845)	-	-	0,81
> 16	5	0,790 (0,012 – 4,629)			
D_LCO‖‖					
70 % i više	15	0,104 (0,015 – 0,419)	0,118	-0,05 do 0,704	0,26
manje od 70 %	27	0,374 (0,014 – 1,055)			

*Mann Whitney U test; †Hodges – Lehmannova razlika medijana; ‡C-reaktivni protein; §sedimentacija eritrocita; ‖N-terminalni propeptid moždanog natriuretskog peptida; ¶kalcij; **fosfor;††laktat-dehidrogenaza,‡‡vitamin D3; §§ immunoglobulin G; ‖‖ difuzijski kapacitet za ugljični monoksid

Povišene vrijednosti IL – 22 su povezane sa povišenim vrijednostima CRP-a (Mann Whitney U test, P = 0,003), ubrzanom sedimentacijom (Mann Whitney U test, P = 0,002) i povišenim vrijednostima LDH (Mann Whitney U test, P = 0,02) (Tablica 5.11.).

Tablica 5.11. IL-22 u odnosu na biokemijske pokazatelje

	n	Medijan (interkvartilni raspon) IL - 22	Razlika†	95% raspon pouzdanosti	*P**
CRP‖					
Referentne	27	107,3 (85,3 – 133,5)	57,2	18,2 do 115,2	**0,003**
> 5	15	185,5 (109,6 – 267,4)			
Leukociti					
do 3,4	1	81,2 (n = 1)			
referentna (3,4-9,7)	32	114,5 (93,7 – 169,9)	-	-	0,12 ‡
> 9,7	8	177,6 (108,6 – 288,19)			
SE¶					
referentna (2 - 13)	20	99,1 (80,7 – 130,2)	49,1	17,3 do 94,04	**0,002**
> 13	22	152,4 (109,1 – 217,6)			
NTproBNP**					
referentna (< 125)	17	117,8 (94,7 – 175,8)	8,6	-25,9 do 49,4	0,75
≥ 125	24	120,6 (95,6 – 197,4)			
Ca††					
< 2,154	1	613,2 (n = 1)			
referentna (2,154 – 2,53)	36	117,8 (97,6 – 174,9)	-	-	0,19 ‡
> 2,53	5	91,7 (70,4 – 149,6)			
P ‡‡					
referentna (0,79-1,42)	41	117,8 (91,7 – 181,4)	-	-	-
> 1,42	1	95,7			
LDH§§					
< 130	1	205,76			
referentna (130 – 241)	32	108,66 (92,3 – 139,2)	-	-	**0,02**‡§
> 241	9	185,5 (127,1 – 422,4)			
25(OH)D_3‖‖					
< 20	19	117,8 (93,07 – 183,45)	-7,8	-50,4 do 24,1	0,40
referentna (20 – 100)	23	117,8 (92,7 – 165,03)			
IgG¶¶					
do 7	1	191,06 (n = 1)			
referentna (7 – 16)	36	110,1 (91,7 – 169,9)	-	-	0,33 ‡
> 16	5	132,1 (116,5 – 366,3)			
D_LCO***					
70 % i više	15	117,8 (92,7 – 143,2)	10,7	-22,3 do 54,7	0,60
manje od 70 %	27	128,3 (93,7 – 183,5)			

*Mann Whitney U test; †Hodges – Lehmannova razlika medijana; ‡Kruskal Wallis test (Post hoc Conover); §na razini P<0,05 značajna je razlika referentna vs.više vrijednosti; ‖C-reaktivni protein; ¶sedimentacija eritrocita; **N-terminalni propeptid moždanog natriuretskog peptide; ††kalcij; ‡‡fosfor; §§laktat-dehidrogenaza; ‖‖D3 vitamin; ¶¶imunoglobulin G; ***difuzijski kapacitet za ugljični monoksid

Nema značajnih razlika u vrijednostima TGFβ s obzirom na biokemijske pokazatelje (Tablica 5.12.).

Tablica 5.12. TGF ß u odnosu na biokemijske pokazatelje

	n	Medijan (interkvartilni raspon) TGF ß	Razlika†	95% raspon pouzdanosti	*P**
CRP‖					
Referentne	27	76 (14 – 142,8)	-7	-59 do 21	0,49
> 5	15	62 (17,8 – 122,3)			
Leukociti					
do 3,4	1	159			
referentna (3,4-9,7)	32	73,5 (18 – 130,5)			0,19‡
> 9,7	8	22 (10 – 90,5)			
SE¶					
referentna (2 - 13)	20	66 (9 – 156,5)	-5	-58 do 27	0,74
> 13	22	71 (24 – 112)			
NTproBNP**					
referentna (< 125)	17	27 (11,3 – 112,3)	12	-14 do 69	0,36
≥ 125	24	80,5 (19,5 – 140,5)			
Ca††					
< 2,154	1	8			
referentna (2,154 – 2,53)	36	80,5 (18 – 143)			0,20 ‡
> 2,53	5	27 (18,3 – 53,8)			
P‡‡					
referentna (0,79-1,42)	41	71 (15,8 – 139,8)	-	-	--
> 1,42	1	105			
LDH§§					
< 130	1	154			
referentna (130 – 241)	32	49 (10,5 – 136,5)	-	-	0,44‡§
> 241	9	95 (25,3 – 130,8)			
25(OH)D_3‖‖					
< 20	19	62 (9 – 123,3)	10	-20 do 59	0,44
referentna (20 – 100)	23	76 (19,3 – 141,3)			
IgG¶¶					
do 7	1	17			
referentna (7 – 16)	36	71 (19,5 – 136,5)			0,67 ‡
> 16	5	108 (6,5 – 161)			
D_LCO***					
70 % i više	15	105 (24,8 – 132,3)	-8	-58 do 27	0,53
manje od 70 %	27	62 (11 – 143,5)			

*Mann Whitney U test; †Hodges – Lehmannova razlika medijana; ‡Kruskal Wallis test (Post hoc Conover); §na razini P<0,05 značajna je razlika referentna vs. više vrijednosti; ; ‖C-reaktivni protein; ¶sedimentacija eritrocita; **N-terminalni propeptid moždanog natriuretskog peptide; ††kalcij; ‡‡fosfor; §§laktat-dehidrogenaza; ‖‖D3 vitamin; ¶¶imunoglobulin G; ***difuzijski kapacitet za ugljični monoksid

5.5. Vrijednosti IL-17, IL-22 i TGFβ u odnosu na tip bolesti, tip protutijela, ANA i kapilaroskopski nalaz

Nije nađena povezanost vrijednosti TGFβ, IL-17, IL-22 i s tipom bolesti, protutijela, ANA niti s kapilaroskopskim uzorkom. (Tablica 5.13., Tablica 5.14. i Tablica 5.15.)

Tablica 5.13. Vrijednosti TGFß u odnosu na tip bolesti, tip protutijela, ANA i nalaz kapilaroskopije

	n	Medijan (interkvartilni raspon)	Razlika† (95% CI)	P*
TGFß				
Tip bolesti				
Limitirani	38	53,5 (12,0 – 134,0)	53	0,16
Difuzni	4	134,5 (94,5 – 148)		
ANA§ omjer				
1 : 100	1	154 (154 – 154)		
1 : 360	33	71 (15 – 130,75)	-	0,46‡
1 : 1000	6	49 (20 – 134)		
ANA§				
homogena	14	130,5 (20 – 154)		
aticentromerna	12	27 (9 – 78)	-	0,14‡
citoplazmatska	2	89 (24 – 154)		
točkasta	12	73,5 (16,5 – 126)		
Tip protutijela				
ATA‖	18	95,5 (20 – 154)		
Anti-U1-RNP	2	76,5 (9 – 144)	-	0,48‡
ACA¶	17	27,0 (15 – 90)		
Pm/Scl	1	154 (154 – 154)		
Tip protutijela				
ATA‖	18	95,5 (20 – 154)	-22,5 (-91 do 14)	0,25
ACA¶	17	27,0 (15,0 – 90)		
Kapilaroskopija (stadij)				
rani	7	24 (11,5 – 116,25)		
aktivni	12	27 (9 – 121)	-	0,31‡
kasni	23	85 (25,5 – 143,5)		

*Mann Whitney U test; †Hodges – Lehmannova razlika medijana; ‡Kruskal Wallis test (Post hoc Conover); CI – interval pouzdanosti; §antinuklearna antitijela; ‖antitopoizomeraza I protutijela; ¶anticentromerna protutijela

Tablica 5.14. Vrijednosti IL-17 u odnosu na tip bolesti, tip protutijela, ANA i nalaz kapilaroskopije

	n	Medijan (interkvartilni raspon)	Razlika† (95% CI)	P*
IL - 17				
Tip bolesti				
Limitirani	38	0,237 (0,014 – 0,904)	0,52	0,13
Difuzni	4	0,754 (0,491 – 14,3)		
ANA§ omjer				
1 : 100	1	0,016	-	0,53‡
1 : 360	33	0,260 (0,014 – 0,819)		
1 : 1000	6	0,574 (0,302 – 1,05)		
ANA§				
homogena	14	0,606 (0,014 – 1,056)	-	0,69‡
atientromerna	12	0,189 (0,013 – 0,411)		
citoplazmatska	2	0,195 (0,016 – 0,374)		
točkasta	12	0,298 (0,015 – 1,621)		
Tip protutijela				
ATA I‖	18	0,133 (0,014 – 0,786)	-	Anti-U1-RNP
Anti-U1-RNP	2	0,537 (0,396 – 0,678)		
ACA¶	17	0,302 (0,014 – 0,942)		
Pm/Scl	1	0,016		
Tip protutijela				
ATA I‖	18	0,133 (0,014 – 0,786)	0,01 (-0,19 do 0,32)	0,60
ACA¶	17	0,302 (0,014 – 0,942)		
Kapilaroskopija				
rani	7	0,016 (0,015 – 0,886)	-	0,61‡
aktivni	12	0,203 (0,013 – 0,445)		
kasni	23	0,426 (0,023 – 1,02)		

*Mann Whitney U test; †Hodges – Lehmannova razlika medijana; ‡Kruskal Wallis test (Post hoc Conover); CI – interval pouzdanosti; ; §antinuklearna antitijela; ‖antitopoizomeraza I protutijela; ¶anticentromerna protutijela

Tablica 5.15. Vrijednosti IL-22 u odnosu na tip bolesti, tip protutijela, ANA i nalaz kapilaroskopije

	n	Medijan (interkvartilni raspon)	Razlika† (95% CI)	P*
IL - 22				
Tip bolesti				
Limitirani	38	117,8 (91,7 – 172,5)	48,3	0,27
Difuzni	4	232,5 (105,3 – 968,3)		
ANA§ omjer				
1 : 100	1	205,8		
1 : 360	33	117,8 (94,7 – 179,3)	-	0,50‡
1 : 1000	6	125,3 (91,7 – 158,5)		
ANA§				
homogena	14	109,2 (91,7 – 177,2)		
atientromerna	12	117,8 (93,7 – 140,1)	-	0,58‡
citoplazmatska	2	189,1 (172,5 – 205,8)		
točkasta	12	120,6 (97,7 – 191,1)		
Tip protutijela				
ATA I‖	18	108,2 (81,2 – 158,5)		
Anti-U1-RNP	2	99,6 (90,9 – 108,2)	-	0,44‡
ACA¶	17	117,8 (94,7 – 168,5)		
Pm/Scl	1	205,8		
Tip protutijela				
ATA I‖	18	108,2 (81,2 – 158,5)	10,6 (-22,3 do 41,9)	0,53
ACA¶	17	117,8 (94,7 – 168,5)		
Kapilaroskopija				
Rani	7	102,4 (72,3 – 158,8)		
aktivni	12	132,1 (87,5 – 168,7)	-	0,47‡
Kasni	23	117,8 (104,8 – 183,5)		

*Mann Whitney U test; †Hodges – Lehmannova razlika medijana; ‡Kruskal Wallis test (Post hoc Conover); CI – interval pouzdanosti; §antinuklearna antitijela; ‖antitopoizomeraza I protutijela; ¶anticentromerna protutijela

5.6. Vrijednosti IL-17, IL-22 i TGFβ u odnosu na terapiju

U analizi odnosa vrijednosti IL-17, IL-22 i TGFβ, povišene vrijednosti TGFβ su nađene u bolesnika sa sistemskom sklerozom (Tablica 15.8) koji ne primaju imunosupresivnu terapiju (Mann Whitney U test, P = 0.03), a za IL-17, IL-22 nema značajnih razlika kod niti jedne ispitivane terapije (Tablica 15.6 i Tablica 15.7).

Tablica 15.6. Vrijednosti IL-17 u odnosu na terapiju

Terapija	n	Medijan (interkvartilni raspon)	Razlika† (95% CI)	P*
IL – 17				
Glukokortikoidi				
Ne	23	0,104 (0,013 – 0,64)	0,35 (-0,002 do 1,11)	0,07
Da	19	0,494 (0,02 – 3,45)		
Doza glukokortikoida				
Mala doza	17	0,426 (0,014 – 1,47)	-	-
Srednja doza	2	10,39 (-)		
Imunosupresivi				
Ne	17	0,374 (0,01 – 1,05)	-0,006 (-0,42 – 0,11)	0,54
Da	25	0,260 (0,014 – 0,787)		
Koji imunosupresivi				
MMF§	2	0,013 (0,008 – 0,018)		0,36‡
MTX‖	8	0,608 (0,04 – 0,96)		
azatriopin	4	0,414 (0,02- 2,28)		
ciklofosfamid	8	0,17 (0,01 – 0,33)		
klorokin	2	0,18 (0,02 – 0,35)		
kolhicin	1	8,82 (0,82 – 0,82)		

*Mann Whitney U test; †Hodges – Lehmannova razlika medijana; ‡Kruskal Wallis test (Post hoc Conover); CI – interval pouzdanosti; §mikofenolat-mofetil; ‖metotreksat

Tablica 15.7. Vrijednosti IL-22 u odnosu na terapiju

Terapija	n	Medijan (interkvartilni raspon)	Razlika† (95% CI)	P*
IL – 22				
Glukokortikoidi				
Ne	23	109,1 (92,1 – 133,5)	24,2 (-15,5 do 69,6)	0,27
Da	19	158,5 (93,7 – 189,7)		
Doza glukokortikoida				
Mala doza	17	117,8 (91,7 – 179,3)	-	-
Srednja doza	2	250,8 (-)		
Imunosupresivi				
Ne	17	109,1 (87,7 – 234,2)	-5,3 (-73,7 do 26,1)	0,78
Da	25	117,8 (98,5 – 160,7)		
Imunosupresivi				
MMF§	2	191,1 (185,5 – 196,6)		0,34‡
MTX‖	8	112,5 (105,3 – 142,5)		
azatriopin	4	105,3 (90,3 – 144,1)		
ciklofosfamid	8	132,1 (132,1 – 132,1)		
klorokin	2	106,7 (91,3 – 140,1)		
kolhicin	1	158,5 (158,5 – 158,5)		

*Mann Whitney U test; †Hodges – Lehmannova razlika medijana; ‡Kruskal Wallis test (Post hoc Conover); CI – interval pouzdanosti; §mikofenolat-mofetil; ‖metotreksat

Tablica 15.8. Vrijednosti TGFβ u odnosu na terapiju

TGFß				
Glukokortikoidi				
Ne	23	62 (9 – 118)	17 (-10 do 71)	0,19
Da	19	95 (21 – 151,5)		
Doza glukokortikoida				
Mala doza	17	76 (19,3 – 146,5)	-	-
Srednja doza	2	131,5		
Imunosupresivi				
Ne	17	120 (59,3 – 146,5)	-59 (-103 do -7)	**0,03**
Da	25	27 (9 – 98)		
Koji imunosupresivi				
MMF§	2	59,5 (24 – 95)		0,25‡
MTX‖	8	73,5 (39,5 – 143)		
azatriopin	4	19,5 (5 – 94,5)		
ciklofosfamid	8	4,5 (2 – 7)		
klorokin	2	27 (9 – 70,5)		
kolhicin	1	20		

*Mann Whitney U test; †Hodges – Lehmannova razlika medijana; ‡Kruskal Wallis test (Post hoc Conover); CI – interval pouzdanosti; §mikofenolat-mofetil; ‖metotreksat

6. RASPRAVA

Unatoč brojnim istraživanjima koji se provode posljednjih godina vezanih uz imunopatologiju sistemske skleroze, postoje još brojne nejasnoće.

Uloga Th-17 citokina, poput IL-17 i IL-22, također nije razjašnjena, osobito zbog istraživanja koji upućuju na njihov dualni učinak - profibrotski i antifibrotski.

U ovom istraživanju nastojali smo utvrditi povezanost serumskih razina IL-17, IL-22 i TGF-β s različitim kliničkim manifestacijama sistemske skleroze te uočiti postoji li prevaga serumske razine pojedinog citokina ovisno o pretežno fibrotskim manifestacijama bolesti ili manifestacijama dominirajuće vaskulopatije. Također smo istraživali postoji li razlika u razini ispitivanih citokina s različitim kapilaroskopskim stadijima što je ujedno i po našim saznanjima prvo provedeno istraživanje koje je ispitivalo tu vrstu povezanosti.

6.1. Interleukin 17

Uloga IL-17A poznata je i dobro istražena u drugim sustavnim upalnim bolestima, poput seronegativnog spondiloartritisa te osobito u psorijazi, u čijem se liječenju potvrdila učinkovitost primjene IL-17 inhibitora (sekukinumab, iksekizumab, brodalumab) u razdoblju dužem od 5 godina (146).

Ta saznanja dovele su do shvaćanja psorijaze kao „ IL-17- vođene bolesti“ , stavljajući upravo IL-17A u glavni fokus imunopatogeneze bolesti, pridonoseći boljem razumijevanju njegove proupalne uloge.

U psorijazi, kroničnoj, autoimunosnoj upalnoj bolesti kože, IL-17A vodi proliferaciju i diferencijaciju keratinocita te doprinosi prekidanju kožne barijere, sudjeluje u stvaranju i umnažanju proupalne mreže potičući oslobađanje antimikrobnih peptida i proupalnih citokina i kemokina te uzrokuje proupalnu aktivaciju uz predominantno neutrofilni/Th17 odgovor (147).

Nadalje, u psorijatičnim lezijama kože nađena je značajno povišena razina IL-17A, međutim za serumsku razinu postoje istraživanja kod kojih je razina IL-17 bila značajno povišena u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu, ali i sličnih vrijednosti kao u zdravih kontrola (148, 149, 150).

Sistemska skleroza je bolest u kojoj zahvaćanje kože jedna od glavnih obilježja bolesti. Za razliku od psorijaze gdje dominiraju upalne promjene kože, kod sistemske skleroze proupalni stanični potpis prisutan je samo u vrlo ranim kožnim promjenama, dok napredovanjem bolesti prevagu čini Th2 odgovor uz posljedično fibrotske promjene (151, 152).

Nadalje, proupalna uloga limfocita Th-17 i IL-17 jasno je dokazana u psorijazi, dok u sistemskoj sklerozi njihova uloga u razvoju i progresiji bolesti ostaje nerazjašnjena, s obzirom na istraživanja koja ukazuju u jednakoj mjeri i na proupalni te na fibrotski, ali i antifibrotski učinak, što vjerojatno ovisi o stadiju bolesti te upalnom miljeu koji je prisutan (153).

Dosadašnja istraživanja u SSc pokazala su da je u bolesti prisutna neravnoteža između regulatornih i Th-17- limfocita uz prevagu Th-17 limfocita (154) , čineći IL-17, a posljedično tome i njegovu inhibiciju, zanimljivim patogenetskim čimbenikom za daljnja klinička ispitivanja.

Upravo je dovršeno kliničko ispitivanje faze I u kojem je ispitivan učinak inhibitora IL-17 (brodalumaba) u bolesnika sa sistemskom sklerozom. Ispitivanje je pokazalo smanjenje mRSS i debljine kože kod osam bolesnika s vrlo ranim difuznim oblikom SSc liječenih IL-17A inhibitorom (155).

S obzirom na vrlo mali uzorak u provedenom istraživanju, potrebna su dodatna istraživanja kako bi se potvrdila učinkovitost primjene IL-17 inhibitora u u bolesnika sa SSc, kao što je dokazano u bolesnika s psorijazom.

U bolesnika sa sistemskom sklerozom podatci o serumskoj razini IL-17A, slično kao i kod bolesnika sa psorijazom, ostaju oprečni, stoga smo u našem istraživanju usporedili serumsku razinu IL-17A kod bolesnika sa sistemskom sklerozom i zdravim kontrolama te nastojali utvrditi razlikuje li se razina IL-17 kod različitih fenotipova bolesti, kliničkih obilježja u SSc bolesnika, duljini trajanja bolesti i uporabi imunosupresivne terapije.

U ovom istraživanju nije nađena statistički bitna razlika između serumske razine IL-17A u SSc bolesnika i zdravih ispitanika.

Slične rezultate opisali su *Radstake i sur,* koji također nisu našli razliku u serumskoj razini IL-17 između SSc bolesnika i zdrave kontrolne skupine, međutim u svom istraživanju našli su u SSc bolesnika povišenu razinu Th-17- limfocita i citokina koji potiču Th-17 odgovor (IL-1a, IL-23 and IL-6). Također limfociti T koji su kultivirani iz SSc bolesnika pokazivali su pojačanu spontanu produkciju IL-17. Koekspresijom IFN-γ i TGF-β zajedno sa IL-17 najviše

razine bile su prisutne u lkSSc. S obzirom da nije bilo razlike u serumskoj razine IL-17 između grupa, pretpostavili su da IL-17 vjerojatno ima važnu lokalnu ulogu u SSc (156).

Robak i sur u svom istraživanju uključili su 45 bolesnika s dijagnozom sistemske skleroze (33 bolesnika sa limitiranim oblikom i 12 bolesnika sa difuznim oblikom bolesti) i 21 zdravog pojedinca kao kontrolnu skupinu, a svrha istraživanja bila je utvrditi serumsku koncentraciju IL-17A, IL-17B, IL-17E i IL-17F u SSc bolesnika te procijeniti postoji li povezanost serumske razine s proširenosti skleroze kože, tipom bolesti i zahvaćanjem unutarnjih organa.

Oni također nisu našli razliku u serumskoj koncentraciji IL-17A između SSc bolesnika i zdravih ispitanika, međutim pronašli su da su serumske koncentracije IL-17B, IL-17E i IL-17F bile povišene u SSc bolesnika u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu. Promatrajući klinička obilježja i zahvaćanje unutarnjih organa, razina IL-17A bila je jednaka u SSc bolesnika neovisno jesu li imali zahvaćanje probavnog sustava, srca, plućnu fibrozu, bubrežne abnormalnosti, hematološke manifestacije ili artralgije. Razina IL-17B bila je statistički značajno povišena u bolesnika sa zahvaćanjem bubrega (157).

U našem istraživanju povišena razina IL-17A nađena je u bolesnika s dijagnozom plućne arterijske hipertenzije, međutim u istraživanju koje su proveli *Robak i sur* povezanost sa SSc-PaH nije ispitivana (157).

Bălănescu i sur u svom radu istraživali su serumske razine IL-6, IFN-γ i IL-17 te su pronašli da su samo razine IFN-γ bile povišene u SSc bolesnika, dok je razina IL-17 i IL-6 bila jednaka u SSc skupini i zdravoj kontrolnoj skupini. Međutim, u istraživanju pronašli su neovisnu statistički značajnu povezanost između razine IL-17 i pojave teleangiektazija i visoke aktivnosti bolesti (EUSTAR score ≥3) (158).

Aktivnost bolesti definirali su koristeći se EUSTAR score-om za aktivnost bolesti. To je bodovni indeks aktivnosti bolesti u kojeg su uključeni: 1. bolesnikova procjena pogoršanja zadebljanja kože u odnosu na prethodni mjesec (Δ-koža = 1,5 bod); 2. vrijednost mRSS (mRSS>18 = 1,5 bod); 3. digitalne ulceracije (DU = 1,5 bod), 4. tendinopatija („tendon friction rub“ = 2,25) ; 5. vrijednost C-reaktivnog proteina (CRP>1 mg/dL = 2,25) i 6. difuzijski kapacitet za ugljični monoksid (DLCO % procijenjen <70% = 1 bod), a ukupna maksimalna vrijednost bodovnika je 10 (159).

Premda u našem radu nismo računali vrijednost EUSTAR score-a za aktivnost bolesti, promatrajući pojedinačne sastavnice koje su uključene, možemo zaključiti da u naših bolesnika vrijednost IL-17A nije bila povezana sa većom aktivnosti bolesti.

Za razliku od naših rezultata, *Kurasawa* zajedno sa skupinom autora prikazali su povišene serumske razine IL-17 u bolesnika sa SSc u odnosu na bolesnike sa SLE i zdravu kontrolnu skupinu. Također, povišena ekspresija IL-17 mRNA nađena je u nestimuliranim limfocitima periferne krvi u bolesnika sa SSc, za razliku od skupine SLE bolesnika i zdravih ispitanika. Povišene razine IL-17 nađene su osobito u ranom stadiju SSc, za razliku od našeg istraživanja gdje nismo pronašli povezanost između trajanja bolesti i serumske koncentracije IL-17. *Kurasawa i sur* nisu našli povezanost između razine IL-17 i drugih kliničkih obilježja SSc poput tipa bolesti (lkSSc i dkSSc), fibroze pluća, vrsti protutijela i uporabi glukokortikoida (83), što je odgovara i našim rezultatima.

Murata i sur u svom istraživanju prikazali su povišenu razinu serumskog IL-17 u odnosu na zdrave ispitanike (4,96 pg/ml vs. 1,15 pg/ml; $p < 0,0001$). Kada su kao povišene razine uzete vrijednosti koncentracija srednje vrijednosti + 2 S.D., IL-17 je bio povišen u 85% bolesnika. Među SSc bolesnicima, povišene razine IL-17 našli su u bolesnika sa manjim mRSS. Nisu našli povezanost između serumske koncentracije i drugih obilježja bolesti, kao što su zahvaćanje pluća, srca, artritis, zahvaćanje jednjaka, mišića i plućne hipertenzije (160).

Za razliku od tih rezultata, u našem istraživanju nismo pronašli povezanost između razine IL-17 i mRSS, međutim pronašli smo povezanost između razina IL-17 i PAH.

Yang i sur pronašli su povišenu razinu IL-17 u serumu SSc bolesnika u usporedbi sa zdravom kontrolnom skupinom te je statistički značajna povezanost nađena između razine IL-17 i aktivnosti bolesti (bolesnici sa EUSTAR score aktivnosti bolesti ≥3 bili su klasificirani kao aktivna SSc-grupa). Također su opisali da je broj Th17-limfocita bio usko povezan sa aktivnosti bolesti te da je IL-17 porijekla iz SSc bolesnika promovirao produkciju kolagena u fibroblastima (79).

Olewicz-Gawlik i sur u svoje istraživanje uključili su 38 bolesnika s dijagnozom sistemske skleroze i 39 zdravih pojedinaca kao kontrolnu skupinu te su koristeći se ELISA testom određivali serumsku razinu IL-17, IL-21 i IL-23.

Našli su da je serumska razina IL-17 i 23 bila značajno snižena, dok je razina IL-21 bila povišena u SSc-bolesnika u usporedbi sa zdravom kontrolnom skupinom. Razina IL-17 bila je niža u bolesnika s dužim trajanjem bolesti, a više razine nađene su u SSc bolesnika kod kojih su bile prisutne opsežnije parenhimske promjene i lezije na plućima opisane na HRCT-u procijenjene Warickovim score-om (161).

U našem istraživanju nismo našli statistički značajnu povezanost između razine IL-17 i dijagnoze intersticijske bolesti pluća, koja je u našem istraživanju definirana kao bibazilarna

fibroza pluća prikazana na HRCT-u, međutim nismo promatrali niti računali opsežnost promjena na HRCT-u, kao što su u navedenom radu učinili.

U našem istraživanju u skupini SSc bolesnika statistički značajna povezanost nađena je između serumske razine IL-17A i dijagnoze plućne arterijske hipertenzije, ukazujući na moguću ulogu IL-17A u razvoju vaskulopatije.

Batah i sur su u svom eksperimentalnom radu na životinjama opisali učinak povišene razine IL-6 i IL-17A na vaskularno remodeliranje u PAH kroz *in situ* dokaz aktivacije kolagena (kol) V (fibrilarni kolagen koji je dio ECM).

U skupini štakora kod kojih je inducirana PAH pronađen je povišeni sistolički tlak u desnoj klijetki, povećana debljina medije malih plućnih arterija, ekspanzija ECM u mediji i periadventicijskim slojevima plućnog krvožilnog zida, povećani kolagen I i V, povećana TGF-β ekspresija i povišena razinu IL-6 i IL-17 u mediji i adventiciji malih plućnih arterija te u svom radu sugeriraju da je sinteza kolagena V ključna za razvoj PAH (162).

Mikroangiopatija je jedna od najranijih kliničkih manifestacija SSc, koja je ujedno prisutna kroz cijeli tijek trajanja bolesti. Klinički znaci mikroangiopatije uključuju Raynaudov fenomen, digitalne ulceracije, plućnu arterijsku hipertenziju i bubrežnu krizu, a histopatološke promjene koje su prisutne pokazuju fibrozu stijenke krvne žile koja se javlja nakon početne upalne ozljede, manifestirajući se kao proliferativne vaskularne endotelne i glatke mišićne stanice koje uzrokuju zadebljanje stijenke krvne žile (163).

Xing i sur su opisali da IL-17A porijekla iz SSc bolesnika posreduje u vaskularnoj upali potičući ekspresiju adhezijskih molekula i kemokina na endotelnim stanicama te promoviraju ozljedu endotelnih stanica koji je ujedno i inicijalni događaj u SSc vaskulopatiji.

Također su pronašli povišenu razinu serumskog IL-17A u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu te značajno povišenu transkripciju mRNA za IL-17A u mononuklearnim stanicama periferne krvi (164).

Liu i sur u svom istraživanju pokazali su bitnu ulogu IL-7A u procesu mikroangiopatije, pokazujući da IL-17A u SSc bolesnika može promovirati proliferaciju, sintezu kolagena, sekreciju i migraciju dermalnih vaskularnih mišićnih stanica, koji su bitni za razvoj vaskulopatije vezane uz SSc (165).

Fukayama i sur u svom istraživanju su mjerili serumsku koncentraciju Il-17F i IL-17E u bolesnika sa SSc te uspoređivali sa zdravom kontrolnom skupinom. Našli su da su serumske razine IL-17F bile značajno povišene u bolesnika s difuznim oblikom bolesti i u bolesnika sa

intersticijskom bolesti pluća u odnosu na kontrolnu skupinu. Također, našli su da razine IL-17F koreliraju sa mRSS, vrijednostima DLCO i FVC te pojavom digitalnih ulceracija, uz zaključak da je moguće da IL-17F ima ulogu u fibrotskim i mikraoangioapatskim procesima u SSc (166).

Premda u našem radu nismo mjerili razinu IL-17A, dosadašnje spoznaje govore u prilog tome da IL-17A i IL-17F imaju zajedničku funkciju s obzirom na sličnost njihove strukture te se stoga uloga IL-17A u autoimunosnim bolestima može izjednačiti sa ulogom IL-17A (167).

U našim rezultatima povišene razine IL-17A nisu bile povezane sa višim stupnjem fibroze kože mjerenim mRSS, niti s IBP, pojavom tendinopatije i sklerodaktilije, što su sve pokazatelji prisutnih fibrotskih promjena u SSc. Međutim, statistička značajna povezanost nađena je s razinom IL-17A i dijagnozom PAH, što bi moglo upućivati da IL-17A ima značajniju ulogu u razvoju vaskulopatije, premda nismo pronašli povezanost između razine IL-17A i broja digitalnih ulceracija u SSc bolesnika.

Statistički značajna povezanost također je nađena između povišene serumske razine IL-17A i povišene razine NT-proBNP, a više razine IL-17A bile su povezane s lošijim rezultatom 6.-minutnog testa hoda, što su indirektni pokazatelji desnostranog zahvaćanja srca kao posljedica prisutne PAH.

U našem istraživanju veća razina izmjerenog IL-17A nađena je u SSc bolesnika s nižim indeksom tjelesne mase (ITM).

Za razliku od naših rezultata, *Iannone i sur* našli su da su pretili SSc bolesnici (ITM ≥ 30) imali najviše serumske razine IL-17A. Podudarno našim rezultatima, nisu pronašli statistički značajnu razliku serumske koncentracije IL-17A u skupini SSc bolesnika i zdrave kontrolne skupine (168).

Pretilost, definirana indeksom tjelesne mase (ITM) ≥ 30 kg/m2, povezana je sa stanjem kronične upale niskog stupnja. Masno tkivo u pretilih osoba mjesto su infiltracije proupalnih stanica. Th-17 stanice koje produciraju IL-17 dio su proupalnih stanica koje infiltriraju masno tkivo te je njihova aktivnost i diferencijacija potaknuta od strane samih mezenhimalnih stanica koje se nalaze u masnom tkivu (169), stoga su naši rezultati da su statistički značaje razine IL-17A nađena u bolesnika s nižim ITM iznenađujući.

Jedno od mogućih objašnjenja je da u SSc bolesnika gubitak na tjelesnoj težini i nizak ITM, kao i dijagnoza PAH, jedan su od loših prognostičkih faktora za bolest (170, 171).

U našem istraživanju kod nižeg ITM i prisutne dijagnoze PAH te povišenih razina NT-pro-BNP-a nađene su povišene razine IL-17A.

Zanimljivo je istraživanje provedeno od strane *Lee i sur*, koji su našli da je nizak ITM bio povezan s višim vrijednostima NT-pro-BNP te je ITM utjecao na vrijednosti NT-pro-BNP u SSc bolesnika s plućnom arterijskom hipertenzijom (172), stoga je moguće da su u našem istraživanju povišene razine IL-17A kod bolesnika sa nižim ITM posljedica povišenih razina NT-pro BNP, koji imaju također statistički značajnu povezanost sa IL-17A.

6.2. Interleukin 22

IL-22 je citokin čija je regulatorna i zaštitna uloga sve više prepoznata u različitom spektru bolesti, poput bubrežnih bolesti, kardiovaskularnim bolestima, tumorima i infektivnim bolestima.

Njegova uloga u autoimunosnim bolestima osobito je zanimljiva zbog mogućeg dualnog proupalnog i protuupalnog učinka, pa je tako u reumatoidnom artritisu povišena razina u serumu, u subhondralnoj kosti i sinoviji nađena u bolesnika s većom aktivnosti bolesti. Slično tome, u psorijazi povišena razina Th-22 - limfocita i IL-22 nađena je u bolesnika s većom aktivnosti bolesti. Kod bolesnika sa SLE rezultati su kontradiktorni te postoje radovi koji povezuju povišeni IL-22 uz veću aktivnost bolesti te ubrzanu sedimentaciju eritrocita, dok su druga istraživanja pokazala snižene serumske razine u bolesnika sa SLE, kao i snižene razine mRNA IL-22 u proliferativnom oblikom lupus nefritisa (173).

Kod istraživanja vezanih uz sistemsku sklerozu također su rezultati protivni, čineći ulogu IL-22 u imunopatologiji bolesti nerazjašnjenom.

U našem istraživanju serumska razina IL-22 je statistički značajno povišena u SSc bolesnika u odnosu na kontrolnu skupinu.

Koristeći se ROC krivuljom našli smo da bi IL-22 mogao biti prediktor sistemske skleroze (osjetljivost 64.3 %, specifičnost 63.3%).

Slično našim rezultatima, *Mathian i sur* pronašli su povišenu serumsku razinu IL-22 u 12 od 29 bolesnika sa SSc, u usporedbi 2 od 15 ispitanika u kontrolnoj skupini (p=0,08). Većina bolesnika su bili u kasnoj SSc grupi (9/13 bolesnika u usporedni sa ranom pojavom bolesti 3/16, p=0,005). Također, razina prepisivanja IL-22 bila je značajno viša u koži SSc bolesnika u usporedbi sa zdravim uzorcima kože (p=0,005) (86).

Ovi rezultati upućuju na moguću patogenetsku ulogu IL-22 u kasnijem tijeku bolesti, kada je očekivana manja prisutnost proupalnih procesa, a izraženije prevladavanje fibroze,

međutim u našem istraživanju nismo našli značajnije razlike u serumskoj razini kod bolesnika sa dužim trajanjem bolesti.

Rolla i skupina autora pronašli su da su Th-17 vezani citokini, IL-17, IL-21, IL-22, IL-23 i TGF-β povišeni u serumu bolesnika u odnosu na zdrave kontrole. Također su ove citokine našli povišene u kondenzatu izdahnutog zraka SSc bolesnika, osobito kod bolesnika s dkSSc i fibrozom pluća, sugerirajući o patološkoj ulozi Th-17 - citokina u fibrozi pluća (174).

Za razliku od naših rezultata, *Sawamura i sur* nisu pronašli razliku u izmjerenoj serumskoj razini IL-22 između SSc bolesnika i zdravih ispitanika.

U svom istraživanju uključili su 36 bolesnika s dijagnozom SSc (13 sa dkSSc i 23 sa lkSSc), 10 bolesnika sa dijagnozom SLE, 12 bolesnika s dijagnozom dermatomiozitisa, 9 bolesnika s dijagnozom bolesti iz sklerodermijskog spektra te 10 zdravih pojedinaca koji su sačinjavali kontrolnu skupinu, a biopsija kože učinjena je bolesnicima s dijagnozom difuznog oblika bolesti. Kao i u SSc skupini, u skupini bolesnika s drugim ispitivanim autoimunosnim bolestima, serumska razina IL-22 nije se razlikovala od zdrave kontrolne skupine.

Istraživanjem su pokazali da IL-22 stimulira post-transkripcijsku ekspresija kolagena tipa I, koja se razlikuje od TGF-β/Smad-posredovane tip I kolagen pretjerane ekspresije. Također su pokazali da IL-22 inducira tip I kolagen proteinsku ekspresiju kroz smanjenje učinka let-7a (mikroRNA koja svojom aktivnošću smanjuje tip I kolagen ekspresiju). Ujedno su opisali da je ekspresija IL-22 detektirana u limfocitima koji su infiltrirali SSc kožu, ali ne i u zdravih ispitanika, uz zaključak da pošto je limfocitna infiltracija kože obilježje ranijeg tijeka bolesti, IL-22 blokada bi vjerojatno mogla imati terapeutski učinak u ranoj bolesti (175).

U našem istraživanju statistički značajna povezanost nađena je između serumske koncentracije IL-22 i pojave intersticijske bolesti pluća u SSc bolesnika.

Premda prijašnja provedena ispitivanja potvrđuju povezanost Th-17- citokina i IL-22 među njima u promoviranju fibroze pluća (174), patofiziološka uloga IL-22 u procesu fibroze nije jasna.

Pojedina istraživanja provedena u animalnim modelima i *in vitro* u idiopatskoj plućnoj fibrozi (IPF) upućuju na protektivnu ulogu IL-22 u fibrozi pluća inhibirajući TGF-β1 signalizaciju, sugerirajući da liječenje IL-22 bi mogla biti novo imunoterapijsko sredstvo u liječenju fibroze pluća (176, 177). Međutim, za razliku od našeg istraživanja, *Liang i sur* u kliničkom dijelu ispitivanja koji je uključivao serum bolesnika sa IPF opisuju značajno snižene razine IL-22 u serumu bolesnika u usporedbi s kontrolnom zdravom skupinom (176).

Povezanost između IL-22 i intersticijske bolesti pluća u SSc opisana od strane *Truchetet i sur* koji su pronašli da SSc bolesnici s IBP imaju povećani broj stanica koji produciraju IL-22. Također su pronašli povišene razine limfocita Th22 i Th17 u perifernoj krvi bolesnika sa SSc u usporedbi sa zdravim kontrolama (87).

Premda je uloga IL-22 u fibrozi pluća još uvijek nejasna, bilo da je riječ o profibrotskom učinku ili su nađene povišene razine samo pokušaj organizma u reparaciji organa, naše ispitivanje pokazalo je da je IL-22 mogući biomarker u SSc- intersticijskoj bolesti pluća.

U našem istraživanju razina IL-22 nije bila povezana s iznosom modificiranog Rodnan skin score-a (mRSS).

Različito našim rezultatima, *Zhou* i grupa autora su opisali pozitivnu statističku povezanost između razine mRNA za IL-22 i IL-22 receptor (IL-22/IL-22R1) i mRSS.

Također, u svom radu opisali su negativnu korelaciju između razine mRNA IL-22 i razine mRNA TGF-β, uz zaključak da bi IL-22/IL-22R1 mogao imati protektivan učinak u SSc putem inaktivacije TGF-β. Zanimljivo je također što su pokazali da je ekspresija za receptore IL-17 (IL-17RA) i IL-22 (IL-22R1) pretežno prisutna u epidermisu u SSc, dok su patološke promjene u SSc inače najviše vidljive u dermisu, uz objašnjenje kako je moguće da keratinocitima posredovani medijatori mogu proći kroz epidermo-dermalnu membranu i aktivirati stanice, uključujući fibroblaste, endotelne stanice i cirkulirajuće leukocite (178).

Učinak IL-22 u SSc koži opisali su *Brembila i sur,* koji su našli da IL-22 u SSc koži pojačava odgovor na TNF i potiče proupalni fenotip fibroblasta te djeluje u prilog TNF-inducirane aktivacije keratinocita.

IL-22 djelujući sam izravno nije imao mogućnost učinka na dermalne fibroblaste, proupalne citokine i ECM-regulatorne enzime. S obzirom da razina IL-22+ stanica, premda nađene povišene u epidermisu SSc kože, nije korelirala sa podtipom bolesti, trajanjem bolesti i zahvaćanjem organa, moguće je da IL-22+ stanice samo prate, a ne uzrokuju fibrotske promjene. Također, opisali su da je TGF-β reducirao ekspresiju IL-22RA, ali nije imao veliki utjecaj na odgovor fibroblasta na sinergističko djelovanje TNF-α i IL-22 (88).

Statistički značajnu povezanost našli smo između vrijednosti sedimentacije eritrocita, CRP-a i IL-22.

Povezanost između serumske razine IL-22 i povišenih vrijednosti CRP-a nije do sada opisana u SSc bolesnika, međutim opisana je u drugim upalnim bolestima, kao što je SLE, reumatoidni artritis (RA) i ulcerozni kolitis (179, 180, 181, 182).

U jednoj studiji koja je uključivala SLE bolesnike opisane su niže plazmatske razine IL-22 kod bolesnika s novonastalom i relapsirajućom bolesti u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu te su niže koncentracije nađene u bolesnika s ubrzanom SE. U SLE skupini pratio se porast razine IL-22 nakon liječenja prednizonom i hidroksiklorokinom, uz implikaciju da bio IL-22 mogao biti biomarker oporavka u SLE (179).

Druga studija koja je uključivala SLE bolesnike pokazala je kako je serumska razina IL-22 bila značajno povišena u SLE bolesnika u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu te da je povišena razina pozitivno korelirala sa većom aktivnosti bolesti, ubrzanom SE i povišenim C-reaktivnim proteinom te prisutnim kožnim promjenama (180).

U studiji koja je uključivala bolesnike s reumatoidnim artritisom, povišena razina IL-22 nađena je u skupini RA bolesnika u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu te su statistički značajnije razine nađene kod bolesnika s visokom aktivnosti bolesti, ubrzanom SE, pozitivnim reumatoidnim faktorom te prisutnim erozivnim promjenama na zglobovima (181).

U studiji koja je uključivala bolesnike s ulceroznim kolitisom, nađene su povišene vrijednosti Th22-limfocita i IL-22 u serumu u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu. Serumska razina IL-22 bila je viša u bolesnika s aktivnom bolesti, kod bolesnika s ubrzanom sedimentacijom eritrocita i povišenim CRP-om, međutim sama uloga IL-22 u ulceroznom kolitisu nije jasna te je moguće da on ima protektivnu, reparacijsku ulogu kod prisutne ozljede tkiva (182).

Suprotno tome, *Liang i sur* u svom radu opisali su izravni lokalni proupalni učinak IL-22 koji može potaknuti sustavni akutni odgovor, inducirajući biomehaničke promjene u jetri uključujući indukciju fibrinogena i serumskog amiloida A. U svom radu opisali su modulacijski učinak IL-22 na čimbenike koji su sastavnica koagulacijskog kaskadnog sustava, uključujući razinu fibrinogena i broj trombocita te sastavnica krvi, kao što su broj neutrofila i eritrocita. Također su opisali da IL-22 inducira atrofiju timusa, potiče gubitak tjelesne težine i metaboličku aktivnost proksimalnih tubula, a upravo svi ovi čimbenici su neizravni pokazatelji sustavnog upalnog stanja (183).

U SSc statistički značajna povišena razina CRP-a nađena je u bolesnika s višim mRSS, dijagnozom IBP i difuznim oblikom bolesti neovisno o trajanju bolesti, dok je ubrzana SE nađena u bolesnika s općenito težim oblikom bolesti (184, 185, 186).

Moguće je da su u našem istraživanju povišene razine IL-22 u bolesnika s višim razinama SE i CRP-a upravo posljedica prisutnosti dijagnoze IBP i težeg oblika bolesti,

međutim ovi rezultati mogu govoriti i u prilog same proupalne uloge IL-22 u SSc neovisno o trajanju bolesti.

6.3. Pretvorbeni čimbenik rasta beta (TGF-β)

TGF-β se duže vrijeme smatra ključnim profibrotskim citokinom u SSc. Njegovi najbitniji učinci su stimulacija sinteze različitih kolagena i proteina koju su sastavni dio ekstracelularnog matriksa. Mala količina TGF-β moguće senzitizira fibroblaste i održava ih u trajno aktiviranom stanju koji uključuje autokrini signalizacijski mehanizam, uzrokujući daljnju produkciju TGF-β. Fibroblasti u SSc predočuju povećane razine TGF-I receptora na svojoj površini, što je također razlog pojačane signalizacije te konačno i produkcije kolagena, ali TGF također smanjuje produkciju metaloproteinaze koja uzrokuje razgradnju kolagena i potiče sintezu inhibitora proteaze, poput tkivnog čimbenika metaloproteinaze-1, koja sprječava razgradnju ECM (187).

Sve navedeno upućivalo je kako je TGF-β zanimljiva potencijalna meta u liječenju SSc.

Metelimumab (CAT-192) je rekombinantno humano protutijelo koje neutralizira TGF-β1. U fazi I/II multicentričnog, randomiziranog, placebom kontroliranog ispitivanja u bolesnika sa ranom dkSSC pokazao se neučinkovit u smanjenju mRSS. Zabilježeno je značajno više smrtnih slučajeva u bolesnika koji su primali lijek, osobito u višoj dozi, premda ni jedna nije bila dokazano povezana s primjenom lijeka, a također je bilo i više ozbiljnih nuspojava u liječenoj skupini (188).

Neuspjeh studije, koji je potom doveo do prekida daljnjeg istraživanja, pokazao je da uloga TGF-β u sistemskoj sklerozi puno složenija od prvobitne pretpostavke.

Novost u pokušaju liječenja je AVID200 fuzijski protein, koji je visoko selektivan za TGF-β1 i TGF-β3 (na TGF-β2 ima limitirani učinak, a upravo ova izoforma uključena je u fiziološku hematopoezu i funkciju miokarda) te se u fazi I pokazao kao siguran i dobro podnošljiv lijek (189).

Iako se radi o citokinu s dokazanim profibrotskim učinkom, istraživanja pokazuju suprotne rezultate vezane uz njegovu serumsku razinu, čak i u slučaju difuznog oblika bolesti uz prisutne

fibrotske manifestacije bolesti, što je moguće jedan od razloga zašto TGF-β inhibitor nije pokazao značajnije poboljšanje u redukciji fibroze.

U našem istraživanju nije pronađena statistički značajna razlika razine TGF-β u skupini bolesnika sa SSc i zdravoj kontrolnoj skupini.

Slično našim rezultatima, *Dziadzio i sur* nisu također pronašli razliku u serumskoj razini u te dvije skupine, međutim opisali su da je u skupini SSc-bolesnika razina TGF-β1 bila snižena u dkSSc, osobito kod bolesnika s većim stupnjem fibroze kože. Kao objašnjenje autori su naveli kako je moguće da je povećani broj mjesta vezanja za TGF-β receptore mogao uzrokovati smanjenu razinu aktivnog oblika TGF-β u SSc (190).

Scala i suradnici također nisu našli povišene razine TGF-β u serumu niti u supernatantu iz mononuklearnih stanica periferne krvi SSc bolesnika, uz napomenu da je mjerena ukupna razina TGF-β1, a samo mala razina TGF-β1 je u aktivnom obliku. Stoga bi upravo ta razlika između omjera aktivnog spram latentnog oblika mogla imati ulogu u patogenezi fibrotskih promjena u SSc. Izmjereni TGF-β1 u serumu nije se mijenjao ovisno o duljini trajanja bolesti, vrsti pozitivnih specifičnih protutijela (ACA i ATA), zahvaćanju pluća (plućnoj fibrozi ili PH), zahvaćanju bubrega ili zglobova (191).

Higley i sur nastojali su utvrditi prisutnost TGF-β1 i upalnih biljega stanice (HLA-DR i čimbenik XIIIa) i usporediti ih s prisutnosti prokolagena tip I u klinički zahvaćenoj koži i nezahvaćenoj koži te su našli kako su bolesnici s aktivnim difuznim oblikom SSc imali minimalno bojenje za TGF-β1, ali značajno bojanje za prokolagen tip I u zahvaćenoj koži, dok su u nezahvaćenoj koži našli umjerenu ekstracelularniu i intraepidermalnu imunoreaktivnost za TGF-β1. Kod bolesnika s limitiranim oblikom (lkSSC) pronađena je povišena imunoreaktivnosti za TGF-β1 i prokolagen tip I u zahvaćenoj i nezahvaćenoj koži, uz zaključak da vjerojatno TGF-β1 ima značajniju, proupalnu aktivnost u ranom tijeku bolesti, koja opada s napredovanjem bolesti.

Dodatno su istraživali razinu TGF-β1 u plazmi bolesnika s dkSSc, lkSSc, morfeom i Raynaudovim sindromom. U bolesnika s lkSSC i dkSSC razina TGF-β1 se nije razlikovala od kontrolne skupine, dok su kod bolesnika s morfeom (cirkumskriptnom sklerodermijom) nađene povišene razine TGF-β1. Kod bolesnika s Raynaudovim sindromom razina TGF-β1 bila je nešto viša, ali bez statističkog značaja u usporedbi sa kontrolnom skupinom (192).

Majewski i sur u svoje su istraživanje uključili 30 bolesnika sa SSc i 19 zdravih pojedinaca kao kontrolnu skupinu. Nisu našli značajnije razlike u koncentraciji TGF-β između te dvije skupine. Također nisu pronašli povezanost između serumske razine i stupnja plućne i

kožne fibroze, uz zaključak da sistemska skleroza nije bolest koju prati karakteristično povećanje serumske razine TGF-β te stoga nije ni vjerojatno da on ima ključnu ulogu u razvoju i tijeku bolesti, niti se može smatrati prognostičkim čimbenikom (193).

U našem istraživanju također nismo dokazali povezanost između tipa bolesti, kao ni većeg stupnja mRSS kao pokazatelja zadebljanja kože.

Za razliku od naših rezultata, *Dantas* i koautori opisali su značajno povišene serumske razine TGF-β1 u SSc-bolesnika u odnosu na zdrave ispitanike (90,38 (55,84–157,1): 27,56 (15,63–51,16) pg./Ml; $p < 0,0001$). U skupini SSc-bolesnika više razine TGF-β1 nađene su u bolesnika sa plućnom fibrozom, prisutnim digitalnim ulceracijama i pozitivnim ATA protutijelima (194).

Snowden i sur su u svom radu opisali povišene plazmatske razine TGF-β1 u 6 od 39 SSc bolesnika (srednja vrijednost 1550 pg/ml, raspon 610-2800 pg/ml), ali isti nije detektiran u ispitanicima sa primarnim Raynaudovim sindromom ni u zdravoj kontrolnoj skupini (195).

U našem istraživanju nismo pronašli povezanost između razine TGF-β1 i kliničkih manifestacija bolesti, niti različitih vrsta protutijela specifičnih za bolest.

Lomelí-Nieto i sur opisali su sniženu razinu TGF-β u SSc bolesnika u odnosu na kontrolnu skupinu. TGF-β1 bio je niži u starijih bolesnika i u bolesnika sa pozitivnim ACA protutijelima, a povišene razine nađene su u bolesnika s višim razinama CRP-a. Povišena razina TGF-β2 izoforme nađena je u bolesnika sa višim razinama trombocita i CRP-a. U uzorcima kože razina ekspresije TGF-β1, TGF-βR1 i TGF-βR2 bila je viša u bolesnika sa SSc u odnosu na zdravu kontrolnu skupnu (70).

Statistički značajne povišene razine TGF-β u skupini SSc bolesnika pronašli smo kod bolesnika koji su liječeni imunosupresivnom terapijom.

Imunosupresivna terapija ima ključnu ulogu u liječenju SSc s obzirom na njezin protuupalni učinak, ali i ulogu u sprječavanju napredovanja fibroze pa čak i regresivni učinak fibrotskih promjena u SSc.

Dobar primjer za to je povoljan klinički učinak ciklofosfamida. U studiji pod nazivom „Scleroderma lung study“ bolesnicima liječenim ciklofosfamidom dokazana je redukcija fibrotskih promjena na plućima i koži. Moguće objašnjenje je citotoksični učinak ciklofosfamida na limfocite T i B, uz smanjenje transkripcije proupalnih gena, a potom i smanjenje sinteze TGF-β (196).

Denton i sur proučavajući učinak inhibicije IL-6 primjenom tocilizumaba u bolesnika sa aktivnim SSc uočili su ispitujući uzorke kože da su bolesnici liječeni tocilizumabom imali u odnosu na bolesnike liječene placebom znatnu normalizaciju funkcije i reverzni učinak ekspresije dominantno TGF-β-gena u fibroblastima (197).

Naše istraživanje pokazalo je da imunosupresivna terapija utječe na smanjenje razine serumske koncetracije TGF-β u SSc te je moguće da je to uzrok njezinog antifibrotskog djelovanja.

Za razliku od naših rezultata, *Dantas i sur* nisu pronašli razlike u koncentraciji TGF-β u odnosu na liječenje imunosupresivnom terapijom (194).

Wakhlu i sur u svom radu opisali su povišene razine IL-17A i TGF-β1 u SSc-bolesnika u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu. Značajno povišene razine oba citokina bile su prisutne u bolesnika s dijagnozom IBP, u bolesnika s difuznim oblikom bolesti, bolesnika s pozitivnim ATA protutijelima te u bolesnika s višim mRSS, odnosno kod bolesnika sa prevladavajuće fibrotskim fenotipom bolesti (198), što u našem istraživanju za TGF-β i IL-17A nije bio slučaj

Povišene serumske razine TGF-β, kao i IL-17A i IL-22 u SSc-bolesnika u odnosu na zdrave ispitanike opisali su *Rolla i sur*, a u našem istraživanju jedino IL-22 bio je statistički značajno povišen kod SSc-bolesnika u odnosu na zdrave pojedince (174).

Ovo istraživanje je pokazalo da je IL-22 potencijalni biomarker za intersticijsku bolest pluća u sistemskoj sklerozi.

6.4. Ograničenja ispitivanja

Postoji nekoliko ograničenja našeg ispitivanja. Relativno mali broj bolesnika sa sistemskom sklerozom je uključen u ispitivanje, osobito bolesnika s difuznim oblikom bolesti.

Premda smo u ispitivanju pokazali da je IL-22 viši u SSc- bolesnika u odnosu na zdrave ispitanike, koristeći se vrijednostima srednje vrijednosti + 2 standarne devijacije za definiranje povišenih vrijednosti, nismo našli razlike između grupa, što može ukazivati da vršne vrijednosti na ovaj način nisu dobro utvrđene. Za TGF-β, s obzirom da je vrijednost 2 standardne devijacije bila viša nego sama srednja vrijednost, za utvrđivanje povišenih vrijednosti koristili smo samo aritmetičku sredinu, međutim također nije bilo razlike među grupama.

Premda je statistički značajna povezanost nađena između više razine IL-22 i dijagnoze IBP, uloga samog IL-22 je i dalje nejasna.

Buduća istraživanja koja bi uključivala primjenu rekombinantnog IL-22 u SSc-animalnim modelima, slično istraživanjima provedenim u idiopatskoj plućnoj fibrozi (158, 159) bi mogla jasnije razjasniti ulogu IL-22 u SSc- povezanoj fibrozi.

7. Zaključak

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti slijedeći zaključci:

- Serumska razina IL-22 bila je povišena u skupini bolesnika sa sistemskom sklerozom u odnosu na zdrave ispitanike te je koristeći se ROC krivuljom utvrđeno da bi IL-22 mogao biti prediktor sistemske skleroze (osjetljivost 64,3 %, specifičnost 63,3%).
- Serumska razina IL-17A bila je jednaka u skupini bolesnika sa sistemskom sklerozom i u kontrolnoj skupini.
- U skupini bolesnika sa sistemskom sklerozom više razine IL-22 nađene su kod bolesnika s intersticijskom bolesti pluća te se IL-22 pokazao kao potencijalni biomarker u SSc-IBP.
- IL-22 u skupini SSc-bolesnika bio je povišen kod bolesnika s ubrzanom sedimentacijom eritrocita i povišenim CRP-om što može ukazivati na proupalnu aktivnost.
- IL-17A u SSc-bolesnika bio je povišen kod prisutne dijagnoze plućne arterijske hipertenzije što može upućivati na njegovu ulogu u vaskulopatiji bolesti.
- Izmjerena serumska razina TGF-β1 bila je jednaka u skupini SSc-bolesnika i u zdravih ispitanika te povišene razine nisu nađene niti u jednoj manifestaciji bolesti.
- Nije nađena statistički značajna razlika u koncentraciji IL-17A, IL-22 i TGF-β1 u odnosu na različite kapilaroskopske stadije niti je nađena njihova povezanost uz ispitivana SSc-specifična protutijela.

8. Sažetak

Cilj istraživanja: Sistemska skleroza (SSc) je kronična autoimunosna bolest karakterizirana upalom, vaskulopatijom i fibrozom kože i unutarnjih organa. O imunopatologiji bolesti unatoč brojnim istraživanjima i dalje postoje brojne nejasnoće. Citokini imaju značajnu ulogu u procesu vaskulopatije i fibroze. U ovom presječnom kohortnom istraživanju cilj nam je bio utvrditi serumsku razinu citokina IL-17A, IL-22 i TGF-β1 u bolesnika sa sistemskom sklerozom te utvrditi njihovu povezanost u odnosu na klinička obilježja bolesti.

Ispitanici i metode: U istraživanje je uključeno 42 bolesnika sa sistemskom sklerozom i 30 zdravih pojedinaca koji su činili kontrolnu skupinu. Svim ispitanicima koristeći se ELISA metodom izmjerena je koncentracija serumskih razina IL-17, IL-22 i TGF-β. Skupini bolesnika sa SSc uzeti su podatci iz anamneze i medicinske dokumentacije bolesti, učinjena je opsežna laboratorijska analiza krvi, uključujući i SSc-specifična protutijela te detaljni klinički pregled koji je uključivao modificirani Rodnan skin score (mRSS) za procjenu fibroze kože. Svakom bolesniku učinjena je procjena plućnog statusa na temelju plućnih funkcijskih testova i 6.-minutnog testa hoda te kapilaroskopija za procjenu vaskulopatije. Dobiveni podatci su analizirani i uspoređeni među skupinama.

Rezultati: Serumska razina IL-22 bila je statistički značajno povišena u SSc-bolesnika u odnosu na zdrave ispitanike (p =0,02). Koristeći se ROC krivuljom utvrđeno je da bi IL-22 mogao biti prediktor sistemske skleroze (osjetljivost 64,3 %, specifičnost 63,3%). Značajna povezanost nađena je između serumske razine IL-22 i intersticijske bolesti pluća (p=0,007) u SSc-bolesnika. Nije bilo razlike u serumskoj razini TGF-β i IL-17A između SSc-bolesnika i zdrave kontrolne skupine. Analizirajući skupinu SSc- bolesnika povišene razine IL-17A nađene su kod prisutne plućne arterijske hipertenzije, a povišene razine TGF-β kod bolesnika koji nisu liječeni imunosupresivnom terapijom.

Zaključak: Učinjenim istraživanjem nije jasno utvrđena povezanost između razine izmjerenih IL-17A i TGF-β i fibrotskih obilježja bolesti. Razina IL-22 bila je povišena kod SSc-intersticijske bolesti pluća koja je fibrotska manifestacija bolesti, međutim povezanost nije nađena između ostalih obilježja koji govore u prilog uznapredovale fibroze.

Ovi rezultati upućuju na moguće korištenja IL-22 kao biomarkera za dijagnozu intersticijske bolesti pluća u sistemskoj sklerozi.

Ključne riječi: fibroza**,** IL-17, IL-22, intersticijska bolest pluća, sistemska skleroza, TGF-β, vaskulopatija

9. Summary

Title: Cytokine response in patients with systemic sclerosis

Objectives: Systemic sclerosis (SSc) is a chronic, autoimmune disease characterized by inflammation, vasculopathy, and fibrosis of the skin and internal organs. Immunological response in SSc is still poorly understood. Cytokines play a significant role in this process leading to vasculopathy and fibrosis. In this cross-sectional study, we aimed to investigate serum levels of IL-17, IL-22, and TGF-β and to determine their correlation to the clinical features of the disease.

Subjects and methods: 42 SSc patients and 30 healthy individuals were included in the research. In all participants, serum levels of IL-17A, IL-22, and TGF-β were examined using the ELISA method. From SSc patients' medical history, data were collected regarding the duration of the disease, type of disease (limited or diffuse), treatment, and organ involvement. For SSc patients, extensive laboratory workup, including SSc-specific autoantibodies, detailed examination, which included modified Rodnan skin score for the assessment of skin fibrosis, pulmonary function tests, 6-minute walk test, and capillaroscopy was performed. The results were analyzed and compared between the groups.

Results: Serum levels of IL-22 were significantly higher in SSc patients compared to healthy individuals (p=0.02). When using the ROC curve, we found IL-22 to be a good predictor of the disease (sensitivity 64.3%, specificity 63.3%). A positive correlation was found between IL-22 sera levels and interstitial lung disease (p=0.007) in SSc patients. Sera IL–17A and TGF-β1 levels did not differ between the groups. In SSc patients, a positive correlation was found between IL-17A levels and pulmonary artery hypertension. TGF-β was found to be elevated in SSc patients who did not receive immunosuppressive therapy.

Conclusion: In our research, no certain association between serum levels of IL-17A, TGF-β, and fibrotic clinical features was established. IL-22 levels were significantly higher in interstitial lung disease, representing only one fibrotic feature of the disease.

These results suggest IL-22 as a potential biomarker in SSc-related interstitial lung disease.

Keywords: fibrosis, IL–17, IL-22, interstitial lung disease, TGF-β, systemic sclerosis, vasculopathy

10. Literatura

1. Smeets RL, Kersten BE, Joosten I, Kaffa C, Alkema W, Koenen HJPM, Vonk MC, i sur. Diagnostic profiles for precision medicine in systemic sclerosis; stepping forward from single biomarkers towards pathophysiological panels. Autoimmun Rev. 2020;19(5):102515.
2. Pasero G, Marson P. Hippocrates and rheumatology. Clin Exp Rheumatol. 2004;22(6):687-689.
3. Rodnan GP, Benedek TG. History of Scleroderma. Ann Intern Med.1978;89:725-725.
4. Bergamasco A, Hartmann N, Wallace L, Verpillat P. Epidemiology of systemic sclerosis and systemic sclerosis-associated interstitial lung disease. Clin Epidemiol. 2019;11:257-273.
5. Di Battista M, Barsotti S, Orlandi M, Lepri G, Codullo V, Della Rossa A, i sur. One year in review 2021: systemic sclerosis. Clin Exp Rheumatol.2021;39(4):3-12.
6. Xu Y, Mo N, Jiang Z, Lu S, Fu S, Wei X, i sur. Human leukocyte antigen (HLA)-DRB1 allele polymorphisms and systemic sclerosis. Mod Rheumatol. 2019;29(6):984-991.
7. Ota Y, Kuwana M. Updates on genetics in systemic sclerosis. Inflamm Regen. 2021;41(1):17
8. Hanson AL, Sahhar J, Ngian GS, Roddy J, Walker J, Stevens W, i sur. Contribution of HLA and KIR Alleles to Systemic Sclerosis Susceptibility and Immunological and Clinical Disease Subtypes. Front Genet. 2022;13:913196.
9. Angiolilli C, Marut W, van der Kroef M, Chouri E, Reedquist KA, Radstake TRDJ. New insights into the genetics and epigenetics of systemic sclerosis. Nat Rev Rheumatol. 2018;14(11):657-673.
10. Truchetet ME, Brembilla NC, Chizzolini C. Current Concepts on the Pathogenesis of Systemic Sclerosis. Clin Rev Allergy Immunol. 2021;10.1007/s12016-021-08889-8.
11. Wajda A, Walczyk M, Dudek E, Stypińska B, Lewandowska A, Romanowska-Próchnicka K, i sur. Serum microRNAs in Systemic Sclerosis, Associations with Digital Vasculopathy and Lung Involvement. Int J Mol Sci. 2022;23(18):10731.
12. Singhvi G, Manchanda P, Krishna Rapalli V, Kumar Dubey S, Gupta G, Dua K. MicroRNAs as biological regulators in skin disorders. Biomed Pharmacother. 2018;108:996-1004.

13. Mora GF. Systemic sclerosis: environmental factors. J Rheumatol. 2009;36(11):2383-2396.
14. Lescoat A, Ballerie A, Lecureur V, Belhomme N, Cazalets C, Jouneau S, et al. The neglected association of crystalline silica exposure and systemic sclerosis. Rheumatology (Oxford). 2020;59(12):3587-3588.
15. Moroncini, G, Mori, S, Tonnini, C, Gabrielli, A. (2013). Role of viral infections in the etiopathogenesis of systemic sclerosis. Clin Exp Rheumatol, 2013; 31.2 (76)3-7.
16. Farina A, Cirone M, York M, Lenna S, Padilla C, Mclaughlin S, i sur. Epstein–Barr Virus Infection Induces Aberrant TLR Activation Pathway and Fibroblast–Myofibroblast Conversion in Scleroderma. J Invest Dermatol. 2014;134(4):954-964.
17. Grossman C, Dovrish Z, Shoenfeld Y, Amital H. Do infections facilitate the emergence of systemic sclerosis?. Autoimmun Rev. 2011;10(5):244-247.
18. Radić M, Martinović Kaliterna D, Radić J. Infectious disease as aetiological factor in the pathogenesis of systemic sclerosis. Neth J Med. 2010;68(11):348-353.
19. De Angelis R, Di Battista J, Smerilli G, Cipolletta E, Di Carlo M, Salaffi F. Association of Silicone Breast Implants, Breast Cancer and Anti-RNA Polymerase III Autoantibodies in Systemic Sclerosis: Case-Based Review. Open Access Rheumatol. 2020;12:207-213.
20. De Martinis M, Ciccarelli F, Sirufo MM, Ginaldi L. An overview of environmental risk factors in systemic sclerosis. Expert Rev Clin Immunol. 2016;12(4):465-478.
21. Niklas K, Niklas AA, Majewski D, Puszczewicz M. Rheumatic diseases induced by drugs and environmental factors: the state-of-the-art - part one. Reumatologia. 2016;54(3):122-127.
22. Lazzaroni MG, Cavazzana I, Colombo E, Dobrota R, Hernandez J, Hesselstrand R, i sur. Malignancies in patients with Anti-RNA polymerase III antibodies and systemic sclerosis: analysis of the EULAR scleroderma trials and research cohort and possible recommendations for screening. J Rheumatol. 2017;44:639–47.
23. Peoples C, Medsger TA, Lucas M, Rosario BL, Feghali-Bostwick CA. Gender differences in systemic sclerosis: relationship to clinical features, serologic status and outcomes. Journal of Scleroderma and Related Disorders. 2016;1(2):204-212.
24. Ciaffi J, van Leeuwen NM, Schoones JW, Huizinga TWJ, de Vries-Bouwstra JK. Sex hormones and sex hormone-targeting therapies in systemic sclerosis: A systematic literature review. Semin Arthritis Rheum. 2020;50(1):140-148.
25. Jimenez SA, Artlett CM. Microchimerism and systemic sclerosis. Curr Opin Rheumatol. 2005;17(1):86-90.

26. Laurent P, Sisirak V, Lazaro E, Richez C, Duffau P, Blanco P, i sur. Innate Immunity in Systemic Sclerosis Fibrosis: Recent Advances. Front Immunol. 2018;9:1702.
27. O'Reilly S. Innate immunity in systemic sclerosis. Clin Exp Immunol. 2020;201(1):12-13
28. Dowson C, Simpson N, Duffy L, O'Reilly S. Innate Immunity in Systemic Sclerosis. Curr Rheumatol Rep. 2017;19(1):2.
29. Raker V, Haub J, Stojanovic A, Cerwenka A, Schuppan D, Steinbrink K. Early inflammatory players in cutanous fibrosis. J Dermatol Sci. 2017;87(3):228-235.
30. Brown M, O'Reilly S. The immunopathogenesis of fibrosis in systemic sclerosis. Clin Exp Immunol. 2019;195(3):310-321.
31. Ah Kioon MD, Tripodo C, Fernandez D, Kirou KA, Spiera RF, Crow MK, i sur. Plasmacytoid dendritic cells promote systemic sclerosis with a key role for TLR8. Sci Transl Med. 2018;10(423):eaam8458**.**
32. Prescott RJ, Freemont AJ, Jones CJ, Hoyland J, Fielding P, i sur. Sequential dermal microvascular and perivascular changes in the development of scleroderma. J Pathol 1992;166:255–263
33. Fuschiotti P. T cells and cytokines in systemic sclerosis. Curr Opin Rheumatol. 2018;30(6):594-599.
34. Kreuter A, Höxtermann S, Tigges C, Hahn SA, Altmeyer P, Gambichler T. Clonal T-cell populations are frequent in the skin and blood of patients with systemic sclerosis. Br J Dermatol. 2009;161:785–90.
35. Frantz C, Auffray C, Avouac J, Allanore Y. Regulatory T Cells in Systemic Sclerosis. Front Immunol. 2018;9:2356.
36. Slobodin, G., Rimar, D. Regulatory T Cells in Systemic Sclerosis: a Comprehensive Review. Clinic Rev Allerg Immunol. 2017; 52, 194–201
37. Melissaropoulos K, Daoussis D. B cells in systemic sclerosis: from pathophysiology to treatment. Clin Rheumatol. 2021;40(7):2621-2631.
38. Yoshizaki A, Fukasawa T, Ebata S, Yoshizaki-Ogawa A, Sato S. Involvement of B cells in the development of systemic sclerosis. Frontiers in Immunology. 2022;13:938785.
39. Thoreau B, Chaigne B, Mouthon L. Role of B-Cell in the Pathogenesis of Systemic Sclerosis. Front Immunol. 2022;13:933468.
40. Horii M, Fushida N, Ikeda T, Oishi K, Hamaguchi Y, Ikawa Y, i sur. Cytokine-producing B-cell balance associates with skin fibrosis in patients with systemic sclerosis. J Dermatol. 2022;49(10):1012-1019.

41. Cutolo M, Soldano S, Smith V. Pathophysiology of systemic sclerosis: current understanding and new insights. Expert Rev Clin Immunol. 2019;15(7):753-764.
42. Benfaremo D, Svegliati S, Paolini C, Agarbati S, Moroncini G. Systemic Sclerosis: From Pathophysiology to Novel Therapeutic Approaches. *Biomedicines*. 2022;10(1):163.
43. Salojin KV, Le Tonquèze M, Saraux A, Nassonov EL, Dueymes M, Piette JC, i sur. Antiendothelial cell antibodies: useful markers of systemic sclerosis. Am J Med. 1997;102(2):178-185.
44. Asano Y. The Pathogenesis of Systemic Sclerosis: An Understanding Based on a Common Pathologic Cascade across Multiple Organs and Additional Organ-Specific Pathologies. J Clin Med. 2020;9(9):2687.
45. Rabquer BJ, Koch AE. Angiogenesis and vasculopathy in systemic sclerosis: evolving concepts. Curr Rheumatol Rep. 2012;14(1):56-63. doi:10.1007/s11926-011-0219-1
46. Freedman RR, Baer RP, Mayes MD. Blockade of vasospastic attacks by alpha 2-adrenergic but not alpha 1-adrenergic antagonists in idiopathic Raynaud's disease. Circulation. 1995;92(6):1448-1451.
47. Herrick AL, Wigley FM. Raynaud's phenomenon. Best Pract Res Clin Rheumatol. 2020;34(1):101474.
48. Thoreau B, Chaigne B, Renaud A, Mouthon L. Pathophysiology of systemic sclerosis. Presse Med. 2021;50(1):104087
49. Thuan DTB, Zayed H, Eid AH, Abou-Saleh H, Nasrallah GK, Mangoni AA, i sur. A Potential Link Between Oxidative Stress and Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Systemic Sclerosis. Front Immunol. 2018;9:1985.
50. Rosendahl AH, Schönborn K, Krieg T. Pathophysiology of systemic sclerosis (scleroderma). Kaohsiung J Med Sci. 2022;38(3):187-195
51. Bhattacharyya S, Wei J, Tourtellotte WG, Hinchcliff M, Gottardi CG, Varga J. Fibrosis in systemic sclerosis: common and unique pathobiology. Fibrogenesis Tissue Repair. 2012;5(1):S18.
52. Bhattacharyya S, Wei J, Varga J. Understanding fibrosis in systemic sclerosis: shifting paradigms, emerging opportunities. Nat Rev Rheumatol. 2011;8(1):42-54.
53. Raja J, Denton, CP. Cytokines in the immunopathology of systemic sclerosis. Semin Immunopathol.2015;37:543–557.
54. Higashi-Kuwata N, Jinnin M, Makino T, Fukushima S, Inoue Y, Muchemwa FC, i sur. Characterization of monocyte/macrophage subsets in the skin and peripheral blood derived from patients with systemic sclerosis. Arthritis Res Ther. 2010;12(4):R128.

55. Fuschiotti P. Current perspectives on the immunopathogenesis of systemic sclerosis. Immunotargets Ther. 2016;5:21-35.
56. Brkic Z, van Bon L, Cossu M, van Helden-Meeuwsen CG, Vonk MC, Knaapen H, i sur. The interferon type I signature is present in systemic sclerosis before overt fibrosis and might contribute to its pathogenesis through high BAFF gene expression and high collagen synthesis. Ann Rheum Dis. 2016;75(8):1567-73.
57. Fensterl V, Sen GC. Interferons and viral infections. Biofactors. 2009 Jan-Feb;35(1):14-20.
58. Jabs WJ, Hennig C, Zawatzky R, Kirchner H. Failure to detect antiviral activity in serum and plasma of healthy individuals displaying high activity in ELISA for IFN-alpha and IFN-beta. J Interferon Cytokine Res. 1999;19(5):463-9.
59. Skaug B, Assassi S. Type I interferon dysregulation in Systemic Sclerosis. Cytokine. 2020;132:154635
60. Muskardin TLW, Niewold TB. Type I interferon in rheumatic diseases. Nat Rev Rheumatol. 2018;14(4):214-228.
61. Kakkar V, Assassi S, Allanore Y, Kuwana M, Denton CP, Khanna D, i sur. Type 1 interferon activation in systemic sclerosis: a biomarker, a target or the culprit. Curr Opin Rheumatol. 2022;34(6):357-364.
62. Chrobak I, Lenna S, Stawski L, Trojanowska M. Interferon-γ promotes vascular remodeling in human microvascular endothelial cells by upregulating endothelin (ET)-1 and transforming growth factor (TGF) β2. J Cell Physiol. 2013;228(8):1774-1783.
63. Cardoneanu A, Burlui AM, Macovei LA, Bratoiu I, Richter P, Rezus E. Targeting Systemic Sclerosis from Pathogenic Mechanisms to Clinical Manifestations: Why IL-6?. Biomedicines. 2022;10(2):318.
64. Kawaguchi Y, Hara M, Wright TM. Endogenous IL-1alpha from systemic sclerosis fibroblasts induces IL-6 and PDGF-A. J Clin Invest. 1999;103(9):1253–60.
65. Shima Y. The benefits and prospects of interleukin-6 inhibitor on systemic sclerosis. Mod Rheumatol. 2019;29(2):294-301.
66. van Bon L, Affandi AJ, Broen J, Christmann RB, Marijnissen RJ, Stawski L, i sur. Proteome-wide analysis and CXCL4 as a biomarker in systemic sclerosis. N Engl J Med.
67. Gasparini G, Cozzani E, Parodi A. Interleukin-4 and interleukin-13 as possible therapeutic targets in systemic sclerosis. Cytokine. 2020;125:154799.
68. Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor-beta and fibrosis. World J Gastroenterol. 2007;13(22):3056-3062.

69. Ayers NB, Sun CM, Chen SY. Transforming growth factor-β signaling in systemic sclerosis. J Biomed Res. 2018;32(1):3-12.
70. Lomelí-Nieto JA, Muñoz-Valle JF, Baños-Hernández CJ, Navarro-Zarza JE, Godínez-Rubí JM, García-Arellano S, i sur. Transforming growth factor beta isoforms and TGF-βR1 and TGF-βR2 expression in systemic sclerosis patients. Clin Exp Med. 2022;10.1007/s10238-022-00841-0.
71. Bruni C, Frech T, Manetti M, Rossi FW, Furst DE, De Paulis A, i sur. Vascular Leaking, a Pivotal and Early Pathogenetic Event in Systemic Sclerosis: Should the Door Be Closed?. Front Immunol. 2018;9:2045.
72. McGeachy MJ, Cua DJ, Gaffen SL. The IL-17 Family of Cytokines in Health and Disease. Immunity. 2019;50(4):892-906.
73. Majumder S, McGeachy MJ. IL-17 in the Pathogenesis of Disease: Good Intentions Gone Awry. Annu Rev Immunol. 2021;39:537-556.
74. Li H, Tsokos GC. IL-23/IL-17 Axis in Inflammatory Rheumatic Diseases. Clin Rev Allergy Immunol. 2021;60(1):31-45.
75. Gonçalves RSG, Pereira MC, Dantas AT, Almeida AR, Marques CDL, Rego MJBM, i sur. IL-17 and related cytokines involved in systemic sclerosis: Perspectives. Autoimmunity. 2018;51(1):1-9.
76. Lei L, Zhao C, Qin F, He ZY, Wang X, Zhong XN. Th17 cells and IL-17 promote the skin and lung inflammation and fibrosis process in a bleomycin-induced murine model of systemic sclerosis. Clin Exp Rheumatol. 2016;34 Suppl 100(5):14-22.
77. Park MJ, Moon SJ, Lee EJ, Jung KA, Kim EK, Kim DS, i sur. IL-1-IL-17 Signaling Axis Contributes to Fibrosis and Inflammation in Two Different Murine Models of Systemic Sclerosis. Front Immunol. 2018;9:1611.
78. Brembilla NC, Montanari E, Truchetet ME, Raschi E, Meroni P, Chizzolini C. Th17 cells favor inflammatory responses while inhibiting type I collagen deposition by dermal fibroblasts: differential effects in healthy and systemic sclerosis fibroblasts. Arthritis Res Ther. 2013;15(5):R151.
79. Yang X, Yang J, Xing X, Wan L, Li M. Increased frequency of Th17 cells in systemic sclerosis is related to disease activity and collagen overproduction. Arthritis Res Ther. 2014;16(1):R4.
80. Nakashima T, Jinnin M, Yamane K, Honda N, Kajihara I, Makino T, i sur. Impaired IL-17 signaling pathway contributes to the increased collagen expression in scleroderma fibroblasts. J Immunol. 2012;188(8):3573-3583.

81. Vettori S, Barra G, Russo B, Borgia A, Pasquale G, Pellecchia L, i sur. T-Cell Proapoptotic and Antifibrotic Activity Against Autologous Skin Fibroblasts in vitro Is Associated With IL-17A Axis Upregulation in Systemic Sclerosis. Front Immunol. 2020;11:220.
82. Dufour AM, Borowczyk-Michalowska J, Alvarez M, Truchetet ME, Modarressi A, Brembilla NC, i sur. IL-17A Dissociates Inflammation from Fibrogenesis in Systemic Sclerosis. J Invest Dermatol. 2020;140(1):103-112.e8.
83. Kurasawa K, Hirose K, Sano H, Endo H, Shinkai H, Nawata Y, i sur. Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis. Arthritis Rheum. 2000;43(11):2455-2463.
84. Dudakov J, Hanash A, van den Brink MR. Interleukin-22: Immunobiology and Pathology. Annu Rev Immunol. 2015;33(1):747-785.
85. McGee HM, Schmidt BA, Booth CJ, Yancopoulos GD, Valenzuela DM, Murphy AJ, i sur. IL-22 promotes fibroblast-mediated wound repair in the skin. J Invest Dermatol. 2013;133(5):1321-1329.
86. Mathian A, Parizot C, Dorgham K, Trad S, Arnaud L, Larsen M,i sur. Activated and resting regulatory T cell exhaustion concurs with high levels of interleukin-22 expression in systemic sclerosis lesions. Ann Rheum Dis. 2012;71(7):1227-1234.
87. Truchetet ME, Brembilla NC, Montanari E, Allanore Y, Chizzolini C. Increased frequency of circulating Th22 in addition to Th17 and Th2 lymphocytes in systemic sclerosis: association with interstitial lung disease. Arthritis Res Ther. 2011;13(5):R166.
88. Brembilla NC, Dufour AM, Alvarez M, Hugues S, Montanari E, Truchetet ME, i sur. IL-22 capacitates dermal fibroblast responses to TNF in scleroderma. Ann Rheum Dis. 2016;75(9):1697-1705.
89. Derrett-Smith EC, Denton CP. Systemic sclerosis: clinical features and management. Medicine. 2010;38(2):109 – 115
90. Nitsche A. Raynaud, digital ulcers and calcinosis in scleroderma. Reumatol Clin. 2012;8(5):270-277.
91. Walker UA, Tyndall A, Czirják L, Denton C, Farge-Bancel D, Kowal-Bielecka O, i sur. Clinical risk assessment of organ manifestations in systemic sclerosis: a report from the EULAR Scleroderma Trials And Research group database. Ann Rheum Dis. 2007;66(6):754-763.

92. Hachulla E, Clerson P, Launay D, Lambert M, Morell-Dubois S, Queyrel V, i sur. Natural history of ischemic digital ulcers in systemic sclerosis: single-center retrospective longitudinal study. J Rheumatol. 2007;34(12):2423-2430.
93. Hughes M, Allanore Y, Chung L, Pauling JD, Denton CP, Matucci-Cerinic M. Raynaud phenomenon and digital ulcers in systemic sclerosis [published correction appears in Nat Rev Rheumatol. 2021 Apr;17(4):246]. Nat Rev Rheumatol. 2020;16(4):208-221.
94. Matucci-Cerinic M, Krieg T, Guillevin L, Schwierin B, Rosenberg D, Cornelisse P, i sur. Elucidating the burden of recurrent and chronic digital ulcers in systemic sclerosis: long-term results from the DUO Registry. Ann Rheum Dis. 2016;75(10):1770-1776.
95. Mihai C, Distler O, Gheorghiu AM, Constantin PI, Dobrota R, Jordan S, i sur. Incidence and risk factors for gangrene in patients with systemic sclerosis from the EUSTAR cohort. Rheumatology (Oxford). 2020;59(8):2016-2023.
96. Kucharz EJ, Kopeć-Mędrek M. Systemic sclerosis sine scleroderma. Adv Clin Exp Med. 2017;26(5):875-880.
97. Ferreli C, Gasparini G, Parodi A, Cozzani E, Rongioletti F, Atzori L. Cutaneous Manifestations of Scleroderma and Scleroderma-Like Disorders: a Comprehensive Review. Clin Rev Allergy Immunol. 2017;53(3):306-336.
98. Sobolewski P, Maślińska M, Wieczorek M, Łagun Z, Malewska A, Roszkiewicz M, i sur. Systemic sclerosis - multidisciplinary disease: clinical features and treatment. Reumatologia. 2019;57(4):221-233.
99. Pearson DR, Werth VP, Pappas-Taffer L. Systemic sclerosis: Current concepts of skin and systemic manifestations. Clin Dermatol. 2018;36(4):459-474.
100. Mar D, Valenzuela A, Stevens KJ, Chung L, Fairchild RM. A narrative review of imaging in calcinosis associated with systemic sclerosis. Clin Rheumatol. 2021;40(10):3867-3874.
101. Khanna D, Furst DE, Clements PJ, Allanore Y, Baron M, Czirjak L,i sur. Standardization of the modified Rodnan skin score for use in clinical trials of systemic sclerosis. J Scleroderma Relat Disord. 2017;2(1):11-18.
102. Martinović Kaliterna D. Sistemska skleroza: pregled. Reumatizam [Internet]. 2017; 64(1). Dostupno na: https://hrcak.srce.hr/188329
103. Lóránd V, Czirják L, Minier T. Musculoskeletal involvement in systemic sclerosis. Presse Med. 2014;43(10 Pt 2):e315-e328.

104. Doré A, Lucas M, Ivanco D, Medsger TA Jr, Domsic RT. Significance of palpable tendon friction rubs in early diffuse cutaneous systemic sclerosis. Arthritis Care Res (Hoboken). 2013;65(8):1385-1389.
105. Avouac J, Clements PJ, Khanna D, Furst DE, Allanore Y. Articular involvement in systemic sclerosis. Rheumatology (Oxford). 2012;51(8):1347-1356.
106. Suliman S, Al Harash A, Roberts WN, Perez RL, Roman J. Scleroderma-related interstitial lung disease. Respir Med Case Rep. 2017;22:109-112.
107. Strollo D, Goldin J. Imaging lung disease in systemic sclerosis. Curr Rheumatol Rep. 2010;12(2):156-161
108. Bernstein EJ, Huggins JT, Hummers LK, Owens GM. Systemic sclerosis with associated interstitial lung disease: management considerations and future directions. Am J Manag Care. 2021;27(7):S138-S146.
109. Fischer A, Patel NM, Volkmann ER. Interstitial Lung Disease in Systemic Sclerosis: Focus on Early Detection and Intervention. Open Access Rheumatol. 2019;11:283-307.
110. Mirsaeidi M, Barletta P, Glassberg MK. Systemic Sclerosis Associated Interstitial Lung Disease: New Directions in Disease Management. Front Med (Lausanne). 2019;6:248
111. Perelas A, Silver RM, Arrossi AV, Highland KB. Systemic sclerosis-associated interstitial lung disease. Lancet Respir Med. 2020;8(3):304-320.
112. Haque A, Kiely DG, Kovacs G, Thompson AAR, Condliffe R. Pulmonary hypertension phenotypes in patients with systemic sclerosis. Eur Respir Rev. 2021;30(161):210053.
113. Haddad F, Doyle R, Murphy DJ, Hunt SA. Right ventricular function in cardiovascular disease, part II: pathophysiology, clinical importance, and management of right ventricular failure. Circulation. 2008;117(13):1717-1731.
114. Lechartier B, Humbert M. Pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis. Presse Med. 2021;50(1):104062.
115. Brown ZR, Nikpour M. Screening for pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis: Now or never!. Eur J Rheumatol. 2020;7(3):S187-S192.
116. Denton CP, Khanna D. Systemic sclerosis. Lancet. 2017;390(10103):1685-1699.
117. Woodworth TG, Suliman YA, Li W, Furst DE, Clements P. Scleroderma renal crisis and renal involvement in systemic sclerosis. Nat Rev Nephrol. 2016;12(11):678-691.
118. Bruni C, Ross L. Cardiac involvement in systemic sclerosis: Getting to the heart of the matter. Best Pract Res Clin Rheumatol. 2021;35(3):101668.

119. Nie LY, Wang XD, Zhang T, Xue J. Cardiac complications in systemic sclerosis: early diagnosis and treatment. Chin Med J (Engl). 2019;132(23):2865-2871
120. Nassar M, Ghernautan V, Nso N, Nyabera A, Castillo FC, Tu W, Gastrointestinal involvement in systemic sclerosis: An updated review. Medicine (Baltimore). 2022;101(45):e31780.
121. Hoffmann-Vold AM, Volkmann ER. Gastrointestinal involvement in systemic sclerosis: Effects on morbidity and mortality and new therapeutic approaches. J Scleroderma Relat Disord. 2021;6(1):37-43.
122. Kumar S, Singh J, Rattan S, DiMarino AJ, Cohen S, Jimenez SA. Review article: pathogenesis and clinical manifestations of gastrointestinal involvement in systemic sclerosis. Aliment Pharmacol Ther. 2017;45(7):883-898. doi:10.1111/apt.13963
123. Parat K, Radić M, Perković D, Lukenda DB, Kaliterna DM. Reduced salivary flow and caries status are correlated with disease activity and severity in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis. J Int Med Res. 2020;48(10):300060520941375.
124. Bellando-Randone S, Matucci-Cerinic M. Very early systemic sclerosis. Best Pract Res Clin Rheumatol. 2019;33(4):101428.
125. van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A, i sur. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. Ann Rheum Dis. 2013;72(11):1747-1755.
126. Yang C, Tang S, Zhu D, Ding Y, Qiao J. Classical Disease-Specific Autoantibodies in Systemic Sclerosis: Clinical Features, Gene Susceptibility, and Disease Stratification. Front Med (Lausanne). 2020;7:587773.
127. Stochmal A, Czuwara J, Trojanowska M, Rudnicka L. Antinuclear Antibodies in Systemic Sclerosis: an Update. Clin Rev Allergy Immunol. 2020;58(1):40-51.
128. Cavazzana I, Vojinovic T, Airo' P, Fredi M, Ceribelli A, Pedretti E, i sur. Systemic Sclerosis-Specific Antibodies: Novel and Classical Biomarkers [published online ahead of print, 2022 Jun 18]. Clin Rev Allergy Immunol. 2022;10.1007/s12016-022-08946-w.
129. Smith V, Herrick AL, Ingegnoli F, Damjanov N, De Angelis R, Denton CP, i sur. Standardisation of nailfold capillaroscopy for the assessment of patients with Raynaud's phenomenon and systemic sclerosis. Autoimmun Rev. 2020;19(3):102458.
130. Cutolo M, Sulli A, Pizzorni C, Accardo S. Nailfold videocapillaroscopy assessment of microvascular damage in systemic sclerosis. J Rheumatol. 2000;27(1):155-160

131. Bukiri H, Volkmann ER. Current advances in the treatment of systemic sclerosis. Curr Opin Pharmacol. 2022;64:102211.
132. Misra DP, Ahmed S, Agarwal V. Is biological therapy in systemic sclerosis the answer?. Rheumatol Int. 2020;40(5):679-694.
133. Bukiri H, Volkmann ER. Current advances in the treatment of systemic sclerosis. Curr Opin Pharmacol. 2022;64:102211.
134. Fiorentini E, Bonomi F, Peretti S, Orlandi M, Lepri G, Matucci Cerinic M, i sur. Potential Role of JAK Inhibitors in the Treatment of Systemic Sclerosis-Associated Interstitial Lung Disease: A Narrative Review from Pathogenesis to Real-Life Data. Life (Basel). 2022;12(12):2101.
135. Zhao M, Wu J, Wu H, Sawalha AH, Lu Q. Clinical Treatment Options in Scleroderma: Recommendations and Comprehensive Review. Clin Rev Allergy Immunol. 2022;62(2):273-291.
136. Fallet B, Walker UA. Current immunosuppressive and antifibrotic therapies of systemic sclerosis and emerging therapeutic strategies. Expert Rev Clin Pharmacol. 2020;13(11):1203-1218.
137. Martin-Lopez M, Carreira PE. Antifibrotics in systemic sclerosis. Best Pract Res Clin Rheumatol. 2021;35(3):101671.
138. Roofeh D, Khanna D. Management of systemic sclerosis: the first five years. Curr Opin Rheumatol. 2020;32(3):228-237.
139. Gomes JP, Santos L, Shoenfeld Y. Intravenous immunoglobulin (IVIG) in the vanguard therapy of Systemic Sclerosis. Clin Immunol. 2019;199:25-28.
140. Bagnato G, Versace AG, La Rosa D, De Gaetano A, Imbalzano E, Chiappalone M, Autologous Haematopoietic Stem Cell Transplantation and Systemic Sclerosis: Focus on Interstitial Lung Disease. Cells. 2022;11(5):843.
141. Kolčić I, Vorko Jović A. Epidemiologija. Zagreb: Medicinska naklada, 2012
142. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA Jr, i sur. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. J Rheumatol. 1988;15(2):202-205
143. Czerwiński E, Badurski JE, Marcinowska-Suchowierska E, Osieleniec J. Current understanding of osteoporosis according to the position of the World Health Organization (WHO) and International Osteoporosis Foundation. Ortop Traumatol Rehabil. 2007;9(4):337-356.

144. Harari S, Wells AU, Wuyts WA, Nathan SD, Kirchgaessler KU, Bengus M, i sur. The 6-min walk test as a primary end-point in interstitial lung disease. Eur Respir Rev. 2022;31(165):220087. Published 2022 Aug 23.
145. Hall GL, Filipow N, Ruppel G, Okitika T, Thompson B, Kirkby J, i sur. Official ERS technical standard: Global Lung Function Initiative reference values for static lung volumes in individuals of European ancestry. Eur Respir J. 2021;57(3):2000289.
146. Yasmeen N, Sawyer LM, Malottki K, Levin LÅ, Didriksen Apol E, Jemec GB. Targeted therapies for patients with moderate-to-severe psoriasis: a systematic review and network meta-analysis of PASI response at 1 year. J Dermatolog Treat. 2022;33(1):204-218.
147. Brembilla NC, Senra L, Boehncke WH. The IL-17 Family of Cytokines in Psoriasis: IL-17A and Beyond. Front Immunol. 2018;9:1682.
148. Martin DA, Towne JE, Kricorian G, Klekotka P, Gudjonsson JE, Krueger JG, i sur. The emerging role of IL-17 in the pathogenesis of psoriasis: preclinical and clinical findings. J Invest Dermatol. 2013;133(1):17-26.
149. Bai F, Zheng W, Dong Y, Wang J, Garstka MA, Li R, i sur. Serum levels of adipokines and cytokines in psoriasis patients: a systematic review and meta-analysis. Oncotarget. 2017;9(1):1266-1278
150. Yilmaz SB, Cicek N, Coskun M, Yegin O, Alpsoy E. Serum and tissue levels of IL-17 in different clinical subtypes of psoriasis. Arch Dermatol Res. 2012;304(6):465-469
151. Skaug B, Khanna D, Swindell WR, Hinchcliff ME, Frech TM, Steen VD, i sur. Global skin gene expression analysis of early diffuse cutaneous systemic sclerosis shows a prominent innate and adaptive inflammatory profile. Ann Rheum Dis. 2020;79(3):379-386.
152. Raker V, Haub J, Stojanovic A, Cerwenka A, Schuppan D, Steinbrink K. Early inflammatory players in cutanous fibrosis. J Dermatol Sci. 2017;87(3):228-235.
153. Bellando-Randone S, Della-Torre E, Balanescu A. The role of interleukin-17 in the pathogenesis of systemic sclerosis: Pro-fibrotic or anti-fibrotic?. J Scleroderma Relat Disord. 2021;6(3):227-235.
154. Papp G, Horvath IF, Barath S, Gyimesi E, Sipka S, Szodoray P, i sur. Altered T-cell and regulatory cell repertoire in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis. Scand J Rheumatol. 2011;40(3):205-210.
155. Fukasawa T, Yoshizaki A, Ebata S, Fukayama M, Kuzumi A, Norimatsu Y, i sur. Interleukin-17 pathway inhibition with brodalumab in early systemic sclerosis:

Analysis of a single-arm, open-label, phase 1 trial [published online ahead of print, 2023 Mar 29]. J Am Acad Dermatol. 2023;S0190-9622(23)00516-9.

156. Radstake TR, van Bon L, Broen J, Hussiani A, Hesselstrand R, Wuttge DM, i sur. The pronounced Th17 profile in systemic sclerosis (SSc) together with intracellular expression of TGFbeta and IFNgamma distinguishes SSc phenotypes. PLoS One. 2009;4(6):e5903.

157. Robak E, Gerlicz-Kowalczuk Z, Dziankowska-Bartkowiak B, Wozniacka A, Bogaczewicz J. Serum concentrations of IL-17A, IL-17B, IL-17E and IL-17F in patients with systemic sclerosis. Arch Med Sci. 2019;15(3):706-712.

158. Bălănescu P., Lădaru A., Bălănescu E., Nicolau A., Băicuş C., Dan G. IL-17, IL-6 and IFN-γ in systemic sclerosis patients. Romanian Journal of Internal Medicine. 2015;53(1): 46-51.

159. Valentini G, Iudici M, Walker UA, Jaeger VK, Baron M, Carreira P, i sur. The European Scleroderma Trials and Research group (EUSTAR) task force for the development of revised activity criteria for systemic sclerosis: derivation and validation of a preliminarily revised EUSTAR activity index. Ann Rheum Dis. 2017;76(1):270-276.

160. Murata M, Fujimoto M, Matsushita T, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Takehara K, Komura K, i sur. Clinical association of serum interleukin-17 levels in systemic sclerosis: is systemic sclerosis a Th17 disease?. J Dermatol Sci. 2008;50(3):240-242.

161. Olewicz-Gawlik A, Danczak-Pazdrowska A, Kuznar-Kaminska B, Gornowicz-Porowska J, Katulska K, Trzybulska D, i sur. Interleukin-17 and interleukin-23: importance in the pathogenesis of lung impairment in patients with systemic sclerosis. Int J Rheum Dis. 2014;17(6):664-670.

162. Batah SS, Alda MA, Rodrigues Lopes Roslindo Figueira R, Cruvinel HR, Perdoná Rodrigues da Silva L, i sur. In situ Evidence of Collagen V and Interleukin-6/Interleukin-17 Activation in Vascular Remodeling of Experimental Pulmonary Hypertension. Pathobiology. 2020;87(6):356-366.

163. Mostmans Y, Cutolo M, Giddelo C, Decuman S, Melsens K, Declercq H, i sur. The role of endothelial cells in the vasculopathy of systemic sclerosis: A systematic review. Autoimmun Rev. 2017;16(8):774-786

164. Xing X, Yang J, Yang X, Wei Y, Zhu L, Gao D, i sur. IL-17A induces endothelial inflammation in systemic sclerosis via the ERK signaling pathway. PLoS One. 2013;8(12):e85032.

165. Liu M, Yang J, Xing X, Cui X, Li M. Interleukin-17A promotes functional activation of systemic sclerosis patient-derived dermal vascular smooth muscle cells by extracellular-regulated protein kinases signalling pathway. Arthritis Res Ther. 2014;16(6):4223.
166. Fukayama M, Yoshizaki A, Fukasawa T, Ebata S, Kuzumi A, Yoshizaki-Ogawa A, i sur. Interleukin (IL)-17F and IL-17E are related to fibrosis and vasculopathy in systemic sclerosis. J Dermatol. 2020;47(11):1287-1292. Interleukin (IL)-17F and IL-17E are related to fibrosis and vasculopathy in systemic sclerosis. J Dermatol. 2020 Nov;47(11):1287-1292.
167. Dubin PJ, Kolls JK. Interleukin-17A and interleukin-17F: a tale of two cytokines. Immunity. 2009;30(1):9-11.
168. Iannone F, Praino E, Rotondo C, Natuzzi D, Bizzoca R, Lacarpia N, i sur. Body mass index and adipokines/cytokines dysregulation in systemic sclerosis. Clin Exp Immunol. 2021;206(2):153-160.
169. Chehimi M, Vidal H, Eljaafari A. Pathogenic Role of IL-17-Producing Immune Cells in Obesity, and Related Inflammatory Diseases. J Clin Med. 2017;6(7):68.
170. Medsger TA Jr, Bombardieri S, Czirjak L, Scorza R, Della Rossa A, Bencivelli W. Assessment of disease severity and prognosis. Clin Exp Rheumatol. 2003;21(3 Suppl 29):S42-S46.
171. Cereda E, Codullo V, Klersy C, Breda S, Crippa A, Rava ML, i sur. Disease-related nutritional risk and mortality in systemic sclerosis. Clin Nutr. 2014;33(3):558-561
172. Lee S, Chung W, Lee S, Lee CW, Kang EJ, i sur. AB0844 Interplay between body mass index and brain natriuretic peptide in screening for pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosisAnnals of the Rheumatic Diseases 2013;71:687
173. Jiang Q, Yang G, Xiao F, Xie J, Wang S, Lu L, i sur. Role of Th22 Cells in the Pathogenesis of Autoimmune Diseases. Front Immunol. 2021;12:688066.
174. Rolla G, Fusaro E, Nicola S, Bucca C, Peroni C, Parisi S, i sur. Th-17 cytokines and interstitial lung involvement in systemic sclerosis. J Breath Res. 2016;10(4):046013.
175. Sawamura S, Jinnin M, Inoue K, Yamane K, Honda N, Kajihara I, i sur. Regulatory mechanisms of collagen expression by interleukin-22 signaling in scleroderma fibroblasts. J Dermatol Sci. 2018;90(1):52-59
176. Liang M, Wang J, Chu H, Zhu X, He H, Liu Q, i sur. Interleukin-22 inhibits bleomycin-induced pulmonary fibrosis. Mediators Inflamm. 2013;2013:209179.
177. Gu P, Wang D, Zhang J, Wang X, Chen Z, Gu L, Liu M, i sur. Protective function of interleukin-22 in pulmonary fibrosis. Clin Transl Med. 2021;11(8):e509.

178. Zhou Y, Hou W, Xu K, Han D, Jiang C, Mou K, i sur. The elevated expression of Th17-related cytokines and receptors is associated with skin lesion severity in early systemic sclerosis. Hum Immunol. 2015;76(1):22-29.
179. Lin J, Yue LH, Chen WQ. Decreased plasma IL-22 levels and correlations with IL-22-producing T helper cells in patients with new-onset systemic lupus erythematosus. Scand J Immunol. 2014;79(2):131-136.
180. El-Gazzar II, Bahgat DMR, El Khateeb EM. IL22 in Egyptian SLE patients, could it reflect disease activity, skin or renal involvement or is it only an expensive ESR?. Egyptian Rheumatol 2017; 39:13–18.
181. Yousef, L., Aboalftoh, S., Abdel-Latef, T., Ali, K. The Use of Interleukin-22 as a Novel Marker of Disease Activity in Female Patients with Rheumatoid Arthritis. Sohag Medical Journal, 2018; 22(1): 143-153.
182. Arj A, Razavizadeh M, Mohammadi H, Nikoueinejad H, Akbari H. The Correlation between the Numerical Status of Th22 Cells and Serum Level of IL-22 with Severity of Ulcerative Colitis. Iran J Allergy Asthma Immunol. 2018;17(1):78-84.
183. Liang SC, Nickerson-Nutter C, Pittman DD, Carrier Y, Goodwin DG, Shields KM, i sur. IL-22 induces an acute-phase response. J Immunol. 2010;185(9):5531-5538.
184. Mitev A, Christ L, Feldmann D, Binder M, Möller K, Kanne AM, i sur. Inflammatory stays inflammatory: a subgroup of systemic sclerosis characterized by high morbidity and inflammatory resistance to cyclophosphamide. Arthritis Res Ther. 2019;21(1):262.
185. Lis-Święty A, Widuchowska M, Brzezińska-Wcisło L, Kucharz E. High acute phase protein levels correlate with pulmonary and skin involvement in patients with diffuse systemic sclerosis. J Int Med Res. 2018;46(4):1634-1639.
186. Chikhoune L, Brousseau T, Morell-Dubois S, Farhat MM, Maillard H, Ledoult E, i sur. Association between Routine Laboratory Parameters and the Severity and Progression of Systemic Sclerosis. J Clin Med. 2022 Aug 30;11(17):5087.
187. Varga J, Whitfield ML. Transforming growth factor-beta in systemic sclerosis (scleroderma). Front. Biosci. (Schol Ed) 2009, 1(1), 226–235.
188. Denton CP, Merkel PA, Furst DE, Khanna D, Emery P, Hsu VM, i sur. Recombinant human anti-transforming growth factor beta1 antibody therapy in systemic sclerosis: a multicenter, randomized, placebo-controlled phase I/II trial of CAT-192. Arthritis Rheum. 2007;56(1):323-333.
189. Lafyatis R, Spiera R, Domsic R, Papazoglou A, Ligon C, Morse CMZ, i sur. Safety, Target Engagement, and Initial Efficacy of Avid200, a First-in-Class Potent and Isoform-Selective Inhibitor of Tgf-Beta 1 and 3, in Patients with Diffuse Cutaneous

Systemic Sclerosis (dcssc): A Phase 1 Dose Escalation Study. Ann Rheum Dis 2020;79:394–395.

190. Dziadzio M, Smith RE, Abraham DJ, Black CM, Denton CP. Circulating levels of active transforming growth factor beta1 are reduced in diffuse cutaneous systemic sclerosis and correlate inversely with the modified Rodnan skin score. Rheumatology (Oxford). 2005 Dec;44(12):1518-24.

191. Scala E, Pallotta S, Frezzolini A, Abeni D, Barbieri C, Sampogna F, i sur. Cytokine and chemokine levels in systemic sclerosis: relationship with cutaneous and internal organ involvement. Clin Exp Immunol. 2004;138(3):540-546.

192. Higley H, Persichitte K, Chu S, Waegell W, Vancheeswaran R, Black C. Immunocytochemical localization and serologic detection of transforming growth factor beta 1. Association with type I procollagen and inflammatory cell markers in diffuse and limited systemic sclerosis, morphea, and Raynaud's phenomenon. Arthritis Rheum. 1994;37(2):278-288.

193. Majewski D, Majewska KA, Kuznar-Kaminska B, Runowska M, Piorunek T, Batura-Gabryel H, i sur. Systemic Sclerosis and Serum Content of Transforming Growth Factor. Adv Exp Med Biol. 2019;1153:63-67.

194. Dantas AT, Gonçalves SM, de Almeida AR, Gonçalves RS, Sampaio MC, Vilar KM, i sur. Reassessing the Role of the Active TGF-β1 as a Biomarker in Systemic Sclerosis: Association of Serum Levels with Clinical Manifestations. Dis Markers. 2016;2016:6064830.

195. Snowden N, Coupes B, Herrick A, Illingworth K, Jayson MI, Brenchley PE. Plasma TGF beta in systemic sclerosis: a cross-sectional study. Ann Rheum Dis. 1994;53(11):763-767.

196. Papadimitriou T-I, van Caam A, van der Kraan PM, Thurlings RM. Therapeutic Options for Systemic Sclerosis: Current and Future Perspectives in Tackling Immune-Mediated Fibrosis. Biomedicines. 2022; 10(2):316.

197. Denton CP, Ong VH, Xu S, Chen-Harris H, Modrusan Z, Lafyatis R, i sur. Therapeutic interleukin-6 blockade reverses transforming growth factor-beta pathway activation in dermal fibroblasts: insights from the faSScinate clinical trial in systemic sclerosis. Ann Rheum Dis. 2018;77(9):1362-1371.

198. Wakhlu A, Sahoo RR, Parida JR, Rai MK, Misra DP, Agrawal V, i sur. Serum Interleukin-6, Interleukin-17A, and transforming growth factor beta are raised in systemic sclerosis with interstitial lung disease. Indian J Rheumatol 2018;13:107-12

Životopis

Osobni podaci:

Ime i prezime: Željka (Utković) Kardum

Adresa: Odjel za reumatologiju, kliničku imunologiju i alergologiju, Klinika za unutarnje bolesti, Klinički bolnički centar Osijek

J. Huttlera 4, 31 000 Osijek

Tel: +385 31 511 743

e-mail: zeljkakardum@gmail.com

Datum rođenja: 23. 02. 1983.

Obrazovanje:

1997. – 2001. I. gimnazija Osijek

2001. – 2007. Medicinski fakultet Osijek

2009. – danas: Poslijediplomski doktorski studij "Biomedicina i zdravstvo", Medicinski fakultet Osijek

Zaposlenje:

2007. – 2008. Klinička bolnica Osijek, pripravnički staž

2008. – 2014. Klinička bolnica Osijek, specijalizant interne medicine

2014. - 2017. Klinički bolnički centar Osijek, internist, odjelni liječnik, Zavod za reumatologiju, kliničku imunologiju i alergologiju, Klinika za unutarnje bolesti

2017. – danas. Klinički bolnički centar Osijek, internist, klinički imunolog i alergolog, Zavod za reumatologiju, kliničku imunologiju i alergologiju, Klinika za unutarnje bolesti

2019. - danas. Klinički bolnički centar Osijek, internist, reumatolog, klinički imunolog i alergolog, Odjel za reumatologiju, kliničku imunologiju i alergologiju, Klinika za unutarnje bolesti

2020. - danas. Asistent na Katedri za internu medicinu i povijest medicine, Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku

Članstvo u stručnim društvima:

Hrvatska liječnička komora, Hrvatski liječnički zbor, Hrvatsko reumatološko društvo, Hrvatsko društvo za alergologiju i kliničku imunologiju

Bračno stanje: udana, majka troje djece

Znanstvena i stručna djelatnost:

Rad objavljen u časopisu koji je indeksiran u međunarodnoj sekundarnoj publikaciji Current Contents (CC):

1) Kardum Ž, Milas Ahić J, Lukinac AM, Ivelj R, Prus V. Optic neuritis as a presenting feature of Behçet's disease: case-based review. Rheumatol Int 2021;41(1):189-195.

Rad objavljen u časopisu koji je indeksiran u međunarodnoj sekundarnoj publikaciji Science Citation Index Expanded (SCIE):

1) Kardum Ž, Milas-Ahić J, Šahinović I, Masle AM, Uršić D, Kos M. Serum levels of interleukin 17 and 22 in patients with systemic sclerosis: a single-center cross-sectional study. Rheumatol Int 2023;43(2):345-354.

Radovi objavljeni u časopisima koji su indeksirani u publikaciji Index Medicus (Medline):

1) Kardum Ž, Prus V, Milas Ahić J, Kardum D. Successful treatment with Cinryze® replacement therapy of a pregnant patient with hereditary angioedema: a case report. J Med Case Rep 2021;15(1).
2) Prus V, Kardum Ž. Clinical entities and characteristics of pain in patients with rheumatic diseases. Reumatizam 2016;63:23-26.
3) Milas-Ahić J, Prus V, Sustić N, Višević R, Ivana Kovacević, Kardum Z. Cryoglobulinemic vasculitis as a manifestation of paraneoplastic syndrome - a case report. Reumatizam 2015;62(1):27-30.
4) Milas-Ahić J, Prus V, Kardum Z, Kovačević I. Pathophysiology of osteoporosis. Reumatizam 2014;61(2):65-69.
5) Fatović-Ferenčić S, Kardum D, Kardum Ž. Pablo Picasso's sfumato. Arh Hig Rada Toksikol. 2016; 29:67(1).

Objavljeni znanstveni radovi iz ostalih publikacija:

1) Kardum D, Kardum Ž, Nađ T, Müller A. He or She, What Will It Be: Old Wives´ Tales and Foetal Sex Prediction. SEEMEDJ 2020;4(1):96-101.
2) Uršić D, Kovačević I, Kardum Ž, Kovačević Stranski K, Masle AM, Kovač A, i sur. Therapeutic approach to a patient with antisynthetase syndrome – a case report. Reumatizam 2021;68(2):103-108.

3) Kardum Ž, Milas Ahić J, Kovačević I, Lukinac AM, Kovač A, Kovačević Stranski K., i sur. Prikaz bolesnice s c-ANCA vaskulitisom bez zahvaćenosti dišnih putova. Reumatizam 2019;66(1):26-33.

Sažeci kongresnih priopćenja objavljenih u časopisima koji se indeksiraju u drugim međunarodnim indeksnim publikacijama:

1) Kardum Z, Prus V, Milas Ahic J. Two cases of thrombotic thrombocytopenic purpura in patients with SLE. Clin Exp Rheumatol. 2018;38(109)
2) Dorner S, Kardum D, Malcic I, Benjak V, Gverieri M, Kardum Ž. A newborn with high-output cardiac failure due to a large vein of Galen malformation, Cardiovasc J Afr. 2013;24(1)
3) Milas Ahic J, Kardum Z, Tokic S, Prus V. Male microchimerism in SSc patients. Journal Scleroderma Rel Disord 2020;5(1)1-307
4) Milas-Ahic J, Prus V, Kardum Z, Kovacevic I; Autoantibody and clinical profile of SSc patients in a single center-retrospective analysis: Journal of Scleroderma Relat Disord. 2016;1(1)

Sažeci kongresnih priopćenja objavljenih u zbornicima skupova:

1) Kardum Ž, Milas Ahić J, Lukinac AM, Prus V. Učestalost tromboembolijskih događaja u sistemskom obliku vaskulitisa i lokaliziranom kožnom vaskulitisu. Reumatizam 2019;66(1)
2) Lukinac AM, Kardum Ž, Kovačević I, Milas-Ahic J, Prus V. The occurrence of paraneoplastic syndromes in patients with polymyalgia rheumatica treated at the University Hospital Center Osijek. Reumatizam. 2018;65(1):20-20.
3) Milas Ahic J, Prus V, Kardum Z, Vujcic D, Sapina M. Interstitial lung disease in patients with systemic sclerosis in Univerity Hospital Osijek. Reumatizam 2015;62(1)99
4) Mitrović J, Borić K, Grazio S, Grubišić F, Kardum Ž, Kehler T, i sur. Disease activity and treatment patterns in patients with rheumatoid arthritis in Croatia. Reumatizam. 2018;65(1):17-18.
5) Kardum Z, Sola M, Milas Ahic J, Biljan M, Kovac A, Lukinac AM, i sur. Generalized telangiectasia misinterpreted as vasculitis- case report. Reumatizam 2018; 65(1)
6) Grubišić F, Borić K, Kardum Ž, Kehler T, Krstulović Marasović D, Ljubičić Marković N, i sur. Efficacy of biologic treatment on quality of life in rheumatoid arthritis

patients in Croatia: results from a non-interventional, multicenter, cross-sectional study to estimate disease activity and treatment patterns in patients with rheumatoid arthritis. Reumatizam. 2018;65(1)

7) Kovačević Stranski K, Kardum Ž, Kovačević I, Kovač A, Lukinac AM, Cvitkušić D, i sur. Granulomatoza s poliangitisom (GPA) sa zahvaćenošću dišnog sustava i rijetkom zahvaćenošću vagine- prikaz bolesnika. Reumatizam 2019;66(1)
8) Kardum Z, Milas Ahic J, Kovac A, Lukinac AM, Prus V. Predictors of poor outcome in small vessel vasculitis. 7th Slovenian Pneumology, Allergology and Immunology Congress : 10th - 12th of December 2020, online: [book of abstracts]
9) Kovač A, Kardum Ž, Milas-Ahić J, Masle AM, Prus V. One case of amyloidosis misinterpreted as angioedema. 7th Slovenian Pneumology, Allergology and Immunology Congress : 10th - 12th of December 2020, online: [book of abstracts]
10) Masle AM, Kardum Ž, Kovač A, Prus V. Case report of the patient with atypical clinical presentation of eosinophilic granulomatosis with polyangiitis. 7th Slovenian Pneumology, Allergology and Immunology Congress : 10th - 12th of December 2020, online: [book of abstracts]
11) Glasnović M, Kardum Ž, Kardum D, Včev A, Bošnjak I, Đanić D, i sur. Wegener granulomatosis - a case report, First Croatian Congress of Allergology and Clinical Immunology with International Participation; 2009:[book of abstracts]

Autorstvo u knjizi:

Imunološke, alergološke i reumatske bolesti, Interna medicina, Mihić, Mirat, Včev. Medicinski Fakultet Osijek 2021, Knjižara Ljevak