

# Monoklonska protutijela na TNFalfa u liječenju najtežih oblika reumatoidnog artritisa

---

**Novak, Srđan**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2004**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:188:928426>

*Rights / Prava:* [Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-03**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University of Rijeka Library - SVKRI Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Srdan Novak**

**MONOKLONSKA PROTUTIJELA NA TNF $\alpha$  U  
LIJEČENJU NAJTEŽIH OBLIKA REUMATOIDNOG  
ARTRITISA**

**Doktorska disertacija**

**Rijeka, srpanj 2004.**

## I AUTOR

---

Ime i prezime : Srđan Novak

Datum i mjesto rođenja.: 29. rujna 1966. Rijeka

Završeni fakultet : Medicinski fakultet Rijeka -1992.

Postdiplomski studij: Medicinski fakultet Rijeka, 1999.

Sadašnje zaposlenje: asistent- internist, Medicinski fakultet Rijeka

---

## II PODACI O DISERTACIJI I MENTORIMA

---

Naslov rada: Monoklonska protutijela na TNF  $\alpha$  u liječenju najtežih oblika reumatoidnog artritisa

Broj str. 134, sl.00, tab. 00, graf. 00, bibliografskih podataka: 278

Ustanova ili mjesto gdje je disertacija izrađena: – KBC Rijeka, KBC Zagreb

Znanstveno područje: BIOMEDICINA I ZDRAVSTVO

Znanstveno polje: Kliničke medicinske znanosti

Znanstvena grana: interna medicina

Mentori: prof.dr.sc. Nada Čikeš

Fakultet na kojem je obranjena: Medicinski fakultet Rijeka

---

## III OCJENA I OBRANA

---

Datum prijave teme: 4. lipnja 2002.

Datum predaje rad: 10. travnja 2004.

Datum sjednice Vijeća na kojoj je rad prihvaćen: 29. lipnja 2004.

Sastav Povjerenstva koje je rad ocijenilo

prof.dr.sc. Davor Štimac, prof.dr.sc. Jadranka Morović-Vergles, doc.dr.sc. Jagoda Ravlić Gulan i prof.dr.sc. Siniša Volarević

Datum obrane : 20. srpnja 2004.

Sastav Povjerenstva pred kojim je rad obranjen: prof.dr.sc. Davor Štimac, prof.dr.sc. Jadranka Morović-Vergles, doc.dr.sc. Jagoda Ravlić Gulan, prof.dr.sc. Siniša Volarević i prof.dr.sc. Nada Čikeš

---

**Mentor rada: prof. dr. sc. Nada Čikeš**

**Rad ima 139 listova**

**UDK 616-097:616-006:616-002(043)**



Rad je izrađen na Klinici za internu medicinu Kliničkog bolničkog centra Rijeka i Klinici za internu medicinu Kliničkog bolničkog centra " Rebro" u Zagrebu.

## Zahvala

Najiskrenije se zahvaljujem mojoj mentorici prof.dr.sc. Nadi Čikeš na dragocjenim savjetima i nesebičnoj pomoći koju mi je pružala u izradi ovoga rada.

Također se zahvaljujem prof.dr.sc. Davoru Štimcu na podršci i korisnim savjetima.

Veliku zahvalnost dugujem i doc. Branimiru Aniću kao i drugim kolegama sa Zavoda za reumatologiju i kliničku imunologiju KBC Rebro u Zagrebu te Klinike za internu medicinu KBC Rijeka bez kojih ova doktorska disertacija nebi bila moguća.

## SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Procijeniti djelotvornost i neškodljivost monoklonskog protutijela anti-TNF $\alpha$  (infliksimaba) i metotreksata (MTX) u liječenju najtežih oblika reumatoidnog artritisa (RA) rezistentnog na liječenje MTX-om tijekom 62 tjedna, dodatno procijeniti kretanje IL-6, sTNFR i IL-10 tijekom tog razdoblja; odrediti učestalost i kliničko značenje pojave antinuklearnih protutijela (ANA) te anti-ds-DNA, ENA i ACL-protutijela, te je usporediti s učestalošću pojavljivanja tih protutijela u bolesnika liječenih salazopirinom (SZP), samo MTX-om te SZP-om i MTX-om; analizirati djelotvornost liječenja infliksimabom i učestalost pojave ANA i anti-ds-DNA u odnosu na biljege HLA sustava.

**Ispitanici i metode:** 18 žena i 6 muškaraca, s aktivnim RA uspkos terapije MTX-om, liječeno je infliksimabom u dozi od 3 mg/kg u tjednima 0, 2, 6 i zatim svakih 8 tjedana tijekom 54 tjedna. Bolesnici su nastavili uzimati tjednu dozu MTX-a. S ciljem evaluacije djelotvornosti liječenja određivali smo sedimentaciju eritrocita (SE), C-reaktivni protein (CRP), jutarnju zakočenost (JZ), broj bolnih zglobova (BBZ), broj otečenih zglobova (BOZ), bolesnikovu i liječnikovu procjenu težine bolesti te bolesnikovu procjenu boli na vizualnoj analognoj skali (VAS) te funkcionalne sposobnosti na temelju modificiranog upitnika i to prije početka liječenja te u 2., 6., 30., 46. i 62. tjednu, a SE i CRP i dodatno u 14., 22., 38. i 54. tjednu. Indeks ACR (od engl. American Colleague of Rheumatology) izračunavan je u tjednima 2, 6, 30 i 62. IL-6, TNFR i IL-10 su određivani u nultom, 2., 4., 6., 14., 30., 54, i 62. tjednu. Formirane su i tri usporedne skupine. Bolesnici skupine 2 liječeni su SZP-om, skupine 3 MTX-om, a skupine 4 SZP-om i MTX-om. U svih smo bolesnika određivali ANA, anti-ds-DNA, ENA i ACL u nultom, 6., 22., 38., 54. i 62. tjednu, a u onih liječenih infliksimabom i dodatno u 2., 4., 14., 30. i 46. tjednu.

**Rezultati:** Već nakon prve aplikacije lijeka došlo je do značajnog smanjenja vrijednosti SE ( $p=0,006$ ), CRP-a ( $p=0,0004$ ), IL-6 ( $p=0,000002$ ) i sTNFR ( $p=0,00003$ ), a statistički značajna razlika zadržana je do 62. tjedna. Tijekom promatranog razdoblja nije bilo statistički značajne promjene IL-10. Kod svih bolesnika zabilježeno je statistički značajno smanjenje JZ

( $p=0,00001$ ), BOZ ( $p<0,0001$ ), BBZ ( $p =0,000009$ ), vrijednosti VAS bolesnikove procjene boli ( $p<0,00001$ ), VAS procjene težine bolesti ( $p<0,00001$ ), VAS liječnikove procjene težine bolesti ( $p<0,00001$ ), te poboljšanja funkcionalnih sposobnosti ( $p =0,00002$ ). S dužinom trajanja terapije rastao je broj bolesnika koji su ostvarili ACR50 i ACR70. Prije početka liječenja infliksimabom 3/24 (12,5%) bolesnika imalo je pozitivna ANA, a niti jedan nije imao anti-ds-DNA. Nakon 62 tjedna 14/17 (82,35%) ih je bilo ANA -pozitivno što je značajno više nego u svim usporednim skupinama ( $p =0,0055$ ). Tijekom liječenja u 66,7% registrirano je protutijelo anti-ds-DNA što je značajno više nego u svim ostalim skupinama ( $p=0,033$ ). Nije bilo statistički značajno učestalijeg javljanja protutijela ACL, dok je statistički značajan porast ENA ( $p =0,00031$ ) zabilježen u 46.tjednu. Jedna naša bolesnica razvila je kliničku sliku sindroma *lupus like* nakon 4. aplikacije lijeka, ali s obzirom da i godinu dana nakon ukidanja infliksimaba ima simptome sistemskog eritemskog lupusa (SLE), vjerujemo da je kod nje riječ o sindromu preklapanja (RA+SLE) kojeg je primjena infliksimaba razotkrila. Petero bolesnika odustalo je od daljnjeg liječenja zbog infuzijskih reakcija (od toga dvoje zbog teže alergijske reakcije), a jedan zbog izostanka učinka lijeka. Nadalje, naši rezultati ne ukazuju na povezanost biljega HLA-sustava s kliničkim tijekom bolesti uz liječenje infliksimabom i pojavom protutijela ANA i anti-ds-DNA.

**Zaključak:** Infliksimab se pokazao vrlo djelotvoran u liječenju najtežih oblika RA, a s dužom primjenom lijeka raste broj bolesnika s dobrim kliničkim odgovorom. Liječenje infliksimabom dovodi do značajne redukcije IL-6 i TNFR dok se vrijednosti IL-10 nisu značajno mijenjale. U velikog broja naših bolesnika tijekom jednogodišnjeg liječenja infliksimabom pojavila su se ANA, anti-ds-DNA i ENA. Njihovo kliničko značenje nije veliko. Postoji opasnost od pojave lijekom induciranog lupusa ali je, s obzirom na naš slučaj koji se tijekom vremena razotkrio kao sindrom preklapanja, potrebno dugotrajno i pažljivo praćenje takvih bolesnika

**Ključne riječi:** infliksimab, djelotvornost, neškodljivost, antinuklearna protutijela, sindrom *lupus like*; citokini; reumatoidni artritis, liječenje

## SUMMARY

**Objectives:** To evaluate in the course of 62 weeks the efficacy and safety of chimeric monoclonal anti-TNF $\alpha$  antibody (infliximab) in combination with methotrexate (MTX) in patients with active rheumatoid arthritis (RA) despite therapy with MTX; to estimate dynamics of IL-6, TNFR and IL-10 during this period; to compare frequency and clinical significance of occurrence of antinuclear antibodies (ANA), anti-double-stranded DNA antibodies (anti-ds-DNA), antibodies to extractable nuclear antigen (ENA) and anticardiolipin antibodies (ACLA) in patients treated with infliximab or salazopyrine (SZP), MTX alone or combination of MTX and SZP; to analyse efficacy of infliximab treatment and occurrence of autoantibodies regarding HLA genes.

**Patients and Methods:** 18 women and 6 men with active RA despite therapy with MTX received infliximab 3mg/kg in the dosage of 3 mg/kg given week 0, 2, 6 and every 8th week thereafter. All patients were on weekly MTX too. To evaluate efficacy we checked erythrocyte sedimentation rate (ESR), C- reactive protein (CRP), morning stiffness, swollen joint count (SJC), tender joint count (TJC), patient and physician global assessment on VAS, patient pain score on VAS and patient disability assessed by modified Health Assessment Questionnaire (HAQ) before treatment and at week 2, 6, 30, 46 i 62. SE and CRP were measured in week 14, 22, 38 and 54 as well. ACR index was calculated in week 2, 6, 30 and 62. IL-6, TNFR and IL-10 was measured before treatment and in week 2, 4, 6, 14, 30, 54 and 62. There were three control groups. In group no. 2 patients were treated with SZP, in group no. 3 with MTX and in no. 4 with SZP plus MTX. In all patients tests for ANA, anti-ds-DNA, ENA and ACLA were performed in week 0, 6, 22, 38, 54 and 62; in patients treated with infliximab in week 2, 4, 14, 30 and 46 too.

**Results:** After 1st infusion of infliximab significant reduction was seen in ESR ( $p=0,006$ ), CRP-a ( $p=0,0004$ ), IL-6 ( $p=0,000002$ ) and TNFR ( $p=0,00003$ ) and it was maintained until week 62. During the period of treatment there were no significant changes in IL-10 values. In all patients significant reduction could be noticed in morning stiffness ( $p=0,00001$ ), SJC

( $p < 0,0001$ ), TJC ( $p = 0,000009$ ), patient pain score on VAS ( $p < 0,00001$ ), patient global assessment on VAS ( $p < 0,00001$ ), physician global assessment on VAS ( $p < 0,00001$ ), and HAQ ( $p = 0,00002$ ). As the therapy continued the number of patients with ACR50 and ACR70 increased. Before treatment with infliximab 3/24 (12,5%) of our patients had positive ANA and no patients had anti-ds-DNA. After 62 weeks 14/17 (82,35%) were ANA positive which is significantly higher than in control groups ( $p = 0,0055$ ). During treatment in 66,7% patients anti-ds-DNA were found which is higher than in all other controls ( $p = 0,033$ ). There was no significantly higher rate of occurrence of ACLA but statistically significant higher rate of ENA ( $p = 0,00031$ ) was noticed in week 46. One of our patients developed clinical picture of lupus like disease after 4<sup>th</sup> infusion of infliximab. As she still had clinical and laboratory signs of SLE one year after infliximab was stopped, we believe she has SLE-RA overlapping which is unmasked by infliximab. The reasons for exclusion of five of our patients were infusion reactions (in 2 patients there were severe allergic reactions) and for one patient lack of efficacy. There was no connection between HLA genes with the course of disease and occurrence of autoantibodies during infliximab treatment.

**Conclusion:** Infliximab is an effective drug in the treatment of severe RA. It seems that with longer treatment the number of patients who achieved clinical response is higher. The treatment with infliximab results in significant reduction in IL-6 and TNFR, while the values of IL-10 were not changed significantly. A high number of our patients developed ANA and anti-ds-DNA antibodies during one year treatment. It seems that its clinical significance is not so high. There is possibility of developing drug induced lupus (DIL) but considering our case which was during the time unmasked as SLE-RA overlapping, further and careful monitoring of patients is needed.

**Key words:** infliximab, antinuclear autoantibodies, efficacy, lupus like syndrome, safety; cytokines; rheumatoid arthritis, therapy



# SADRŽAJ

<b>1</b>	<b>UVOD</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Definicija i epidemiologija</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Etiologija RA</b>	<b>1</b>
1.2.1	Genetički čimbenici	2
1.2.2	Infekcijski čimbenici	3
1.2.3	Hormonski čimbenici	5
1.2.4	Neurološki čimbenici	5
1.2.5	Vanjski čimbenici	6
<b>1.3</b>	<b>Patogeneza RA</b>	<b>6</b>
1.3.1	Citokini	7
1.3.1.1	Definicija	7
1.3.1.2	Klasifikacija i struktura citokina	8
1.3.1.3	Citokinski receptori	10
1.3.1.4	Citokinski inhibitori	10
1.3.1.5	Uloga citokina u upalnom procesu	11
1.3.1.6	Uloga citokina u RA	12
1.3.1.6.1	Faktor nekroze tumora $\alpha$ (TNF $\alpha$ ) i interleukin 1 (IL-1)	12
1.3.1.6.2	Uloga ostalih citokina u RA	14
1.3.2	Ostali upalni čimbenici i adhezijske molekule	16
1.3.3	Apoptoza	17
1.3.4	Mehanizam destrukcije tkiva u RA	17
1.3.5	Humoralna imunost u RA	18
1.3.5.1	Reumatoidni faktor	19
1.3.5.2	Protutijela protiv citruliniranog peptida	20
<b>1.4</b>	<b>Klinička slika RA</b>	<b>20</b>
1.4.1	Rani reumatoidni artritis	21
1.4.2	Razvijeni reumatoidni artritis	22
1.4.3	Izvanzglobna očitovanja RA	23
<b>1.5</b>	<b>Dijagnostika RA</b>	<b>24</b>
1.5.1	Laboratorijski testovi	25
1.5.2	Radiologija	26
1.5.3	Pretrage sinovijske tekućine	26
<b>1.6</b>	<b>Liječenje RA</b>	<b>27</b>
1.6.1	Nefarmakološko liječenje	27
1.6.2	Farmakološko liječenje	28
1.6.2.1	Nesteroidni antireumatici	28
1.6.2.2	Kortikosteroidi	29
1.6.2.3	Lijekovi koji modificiraju bolest (DMARD)	29
1.6.2.4	Kombinirana terapija	31
1.6.2.5	Biološka terapija	32
1.6.2.5.1	Lijekovi koji inhibiraju TNF $\alpha$	32
1.6.2.5.2	Lijekovi koji inhibiraju djelovanje interleukina 1	35

1.6.2.5.3	Ostali biološki lijekovi .....	35
1.6.3	Kirurško liječenje .....	36
<b>2</b>	<b>CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>37</b>
<b>3</b>	<b>ISPITANICI i METODE .....</b>	<b>39</b>
<b>3.1</b>	<b>Ispitanici .....</b>	<b>39</b>
3.1.1	Bolesnici .....	39
3.1.2	Usporedne skupine .....	41
<b>3.2</b>	<b>Metode .....</b>	<b>41</b>
3.2.1	Primjena infliksimaba .....	41
3.2.2	Metode praćenja djelotvornosti liječenja infliksimabom i metotreksatom .....	42
3.2.2.1	Metode praćenja aktivnosti bolesti .....	42
3.2.2.2	Metode određivanja citokina i citokinskih receptora .....	43
3.2.2.3	Metode praćenja neškodljivosti primjene infliksimaba s metotreksatom .....	44
3.2.3	Metode procjene učestalosti javljanja protutijela .....	45
3.2.4	Metode dokazivanja HLA-antigena .....	47
3.2.5	Statističke metode .....	48
<b>4</b>	<b>REZULTATI .....</b>	<b>50</b>
<b>4.1</b>	<b>Procjena djelotvornosti terapije infliksimabom .....</b>	<b>50</b>
4.1.1	Laboratorijski pokazatelji .....	50
4.1.1.1	SE .....	51
4.1.1.2	CRP .....	52
4.1.1.3	IL-6 .....	53
4.1.1.4	IL-10 .....	54
4.1.1.5	Solubilni receptori TNF $\alpha$ .....	55
4.1.2	Klinički pokazatelji .....	56
4.1.2.1	Jutarnja zaočćenost .....	58
4.1.2.2	Broj otečenih zglobova .....	58
4.1.2.3	Broj bolnih zglobova .....	60
4.1.2.4	Bolesnikova procjena boli metodom VAS .....	61
4.1.2.5	Bolesnikova procjena težine bolesti metodom VAS .....	62
4.1.2.6	Liječnikova procjena težine bolesti metodom VAS .....	63
4.1.2.7	Procjena funkcionalnih sposobnosti bolesnika temeljem HAQ-a .....	63
4.1.2.8	Indeks ACR .....	64
4.1.3	Usporedba laboratorijskih i kliničkih pokazatelja .....	66
<b>4.2</b>	<b>Procjena pojave protutijela tijekom liječenja infliksimabom i metotreksatom. 68</b>	
4.2.1	ANA .....	68
4.2.1.1	Učestalost javljanja i obilježja ANA u bolesnika liječenih infliksimabom i MTX-om .....	68
4.2.1.2	ANA i klinička slika .....	69
4.2.1.3	Usporedba ANA nalaza u ispitivanoj i usporednim skupinama .....	71
4.2.2	Anti-ds-DNA .....	73
4.2.2.1	Učestalost javljanja i obilježja anti-ds-DNA tijekom liječenja infliksimabom i MTX-om .....	73
4.2.2.2	Anti-ds-DNA i klinički pokazatelji .....	75

4.2.2.3	Usporedba nalaza anti-ds-DNA u ispitivanoj i usporednim skupinama.....	77
4.2.3	ENA.....	78
4.2.3.1	Učestalost pozitivnih nalaza ENA kod bolesnika liječenih infliksimabom i MTX-om.....	78
4.2.4	ACL.....	79
4.2.4.1	Učestalost pozitivnih nalaza ACL tijekom terapije infliksimabom i MTX-om .....	79
<b>4.3</b>	<b>Nuspojave i razlozi ranije obustave liječenja infliksimabom.....</b>	<b>81</b>
4.3.1	Infuzijske reakcije u ispitivanoj skupini.....	81
4.3.2	Ostale nuspojave u ispitivanoj skupini.....	82
4.3.3	Razlozi obustave liječenja infliksimabom.....	82
4.3.4	Nuspojave u usporednim skupinama.....	84
4.3.5	Usporedba javljanja nuspojava u ispitivanoj i usporednim skupinama .....	86
<b>4.4</b>	<b>Uspjeh liječenja i učestalost javljanja protutijela u odnosu na HLA.....</b>	<b>87</b>
4.4.1	Bolesnici s DR1 i/ili DR4.....	87
4.4.2	Bolesnici s B8DR3 .....	89
<b>5</b>	<b>RASPRAVA.....</b>	<b>92</b>
<b>6</b>	<b>ZAKLJUČCI .....</b>	<b>107</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>109</b>
	<b>ŽIVOTOPIS (Curriculum vitae) .....</b>	<b>135</b>



# **1 UVOD**

## **1.1 Definicija i epidemiologija**

Reumatoidni artritis (RA) je kronična, progresivna, sistemska upalna bolest vezivnog tkiva koja se primarno ispoljava na perifernim zglobovima udova, a može imati i sistemska očitovanja.

RA je česta bolest koja podjednako zahvaća sve rase. U većini populacija prevalencija RA je oko 1% bez obzira na zemljopisne i klimatske razlike (1,2). Međutim, postoje populacije u kojima je bolest češća; npr. 5% u Pima Indijanaca. RA se javlja 2-3 puta češće u žena. Ta razlika značajnija je u generativnoj dobi, a s godinama se izjednačava (3,4). Incidencija novootkrivenih bolesnika sa RA izrazito se razlikuje od studije do studije i kreće se od 30 do 300 na 100000 stanovnika na godinu (1).

Iako se RA smatra prvenstveno bolešću koja dovodi do invalidnosti, mortalitet u RA je također povećan. Prosječna životna dob muškaraca s teškim RA smanjena je za 7, a žena za 4 godine (5). Najčešći uzroci smrti su vaskularni incidenti usljed arteroskleroze, maligne bolesti i infekcije (5). Rizik smrti od infekcija povezan je i s imunosupresivnom terapijom, pogotovo kod bolesnika s teškim oblikom bolesti.

RA je bolest s velikim socio-medicinskim značenjem jer teška oštećenja lokomotornih organa smanjuju radnu sposobnost, a ponekad i sposobnost bolesnika za svakodnevne aktivnosti što dovodi do invalidnosti. Ukupni troškovi društvene zajednice za bolesnika s RA su izrazito veliki, a oni su direktni (lijekovi, primarna i sekundarna njega, rehabilitacija te kirurški zahvati) i indirektni (posljedice nezaposlenosti i smanjene produktivnosti) (6,7). Praćenje bolesnika s RA tijekom 10 godina ukazalo je na radnu nesposobnost u 40-60 % bolesnika (8,9).

## **1.2 Etiologija RA**

Točan uzrok RA do danas nije poznat. Poznato je da se RA češće javlja u pojedinim obiteljima te se vjeruje da različiti artritogeni antigeni aktiviraju imunološki odgovor u imunogenetički sklonoj

osobi. Međutim, niti jedan vanjski čimbenik do danas nije sa sigurnošću identificiran kao uzročnik RA. Kao mogući neposredni pokretači navode se različiti infektivni uzročnici, ali i endogene tvari kao što su proteini veziva (kolagen, proteoglikani) te mnoge druge endogene i egzogene tvari.

### 1.2.1 Genetički čimbenici

Obiteljske studije pokazale su da postoji nasljedna predispozicija za RA, naročito u obiteljima s teškim oblikom bolesti. Smatra se da je ukupan genetički doprinos etiologiji oko 30%, a riječ je o poligenom nasljeđivanju (10). S obzirom na izraziti polimorfizam, različiti genotipovi mogu predisponirati za različite fenotipove (kliničke slike) RA, dok će neki geni djelovati na težinu kliničke slike.

Glavni sustav tkivne podudarnosti (MHC, od engl. major histocompatibility complex) ili HLA (od engl. human leukocyte antigens) sustav u ljudi je jedina genska regija koja se sa sigurnošću može povezati uz sklonost oboljevanju od RA. Riječ je o velikom broju gena čiji produkti kontroliraju i reguliraju brojne imunološke funkcije te utječu na pojavu autoimunih bolesti uključujući i RA (11,12). HLA sustav gena se u ljudi nalazi na kratkom kraku šestog kromosoma i sadrži preko 100 gena. Unutar tog sustava geni su raspoređeni u tri regije nazvane razred I, II i III. Unutar razreda I nalaze se geni koji kodiraju molekule I MHC sustava (HLA-A, B i C). Razred II sastoji se od podrazreda DR, DP i DQ, a svaki od njih sadrži različit broj gena. Podrazred HLA- DR, koji se danas metodama sekvencioniranja DNA može razdijeliti na čitav niz haplotipova DRB-1 (13) vrlo je važan u patogenezi RA, jer kodira proteine koji određuju način na koji će imunološki sustav prepoznati i odgovoriti na određeni antigen. On obuhvaća gene koji kodiraju postojan  $\alpha$ -lanac (HLA-DRA) i izrazito polimorfan  $\beta$ -lanac (HLA-DRB1). Takav izraziti polimorfizam povećava sposobnost imunološke reaktivnosti organizma na širi spektar antigena što ovisi prvenstveno o T-limfocitnom prepoznavanju stranog peptida vezanog za određenu MHC molekulu. HLA DRB1 (DR1, DR4) molekule su česte u bolesnika s RA i one dijele određene sljedove aminokiselina koje utječu na bitne peptide u imunološkoj reakciji. Ti sljedovi aminokiselina nazivaju se zajedničkim epitopima (engl.

shared epitopes). Osnovna razlika između podtipova HLA-DRB1 leži u aminokiselinskom slijedu i to oko 70-og mjesta u prvoj domeni HLA-DR $\beta$  lanca (14,15). Postoje podaci da zajednički epitopi određuju sklonost bolesti (16,17), ali novija saznanja govore u prilog tome da njihova prisutnost značajnije utječe na tijek i težinu bolesti (18,19). Aleli koji se najčešće povezuju s RA su DRB1\*0401 (Dw4) i DRB1\*0404 (Dw14) (15).

Međutim, povezanost sustava HLA s RA je vrlo kompleksna i ne može se objasniti samo povezanošću sa lokusom DRB1. Postoje podaci da su i neki drugi geni povezani s imunološkom odgovornosti (20). U novije vrijeme se sa pojavom RA dovodi u vezu i gen koji kodira TNF $\alpha$ , te određeni imunoglobulinski geni a također i geni za neke druge citokine (21).

Postoje i druga potencijalna objašnjenja genetske predispozicije za RA. Sustav MHC ima važnu ulogu u stvaranju T-staničnog receptora u vrijeme timusne ontogeneze (22). Zajednički epitopi mogli bi selekcionirati T-stanice s posebnim afinitetom za zglobne antigene. S druge strane, zajednički epitopi bi mogli i sami postati autoantigeni, jer određeni virusi i bakterije sadrže identične peptidne sekvence unutar pojedinih proteina.

### 1.2.2 Infekcijski čimbenici

Iako je jasno da je neki vanjski čimbenik odgovoran za pokretanje imunološkog odgovora u imunogenetički sklonoj osobi, niti jedan antigen još nije definitivno identificiran.

Kao mogući pokretač autoimunosti spominje se infekcija. Postoje čvrsti dokazi da infekcija može pokrenuti autoimune bolesti, pa tako i RA, u genetski osjetljivoj jedinki (23, 24, 25). Jedna mogućnost je da infekcija narušava tkivnu ili staničnu barijeru i time izlaže inače skrivene autoantigene što dovodi do aktivacije autoreaktivnih klonova. Također je moguće da tijekom lokalnog upalnog odgovora, koji je pokrenut nekim infektivnim uzročnikom, dolazi do poticanja ekspresije molekula MHC i kostimulacijskih molekula na tkivnim stanicama što uzrokuje autoimuni odgovor. Moguće je da infektivni uzročnik potakne produkciju limfocita T ili B koji se svojim receptorima, osim na epitope infektivnih uzročnika, mogu križno vezati i na vlastite antigene. To se naziva

molekularna mimikrija (25). Nadalje, i superantigeni ili bakterijski produkti mogu izazvati poliklonsku aktivaciju T-klonova čime započinje autoimuni proces (24, 26). Te pretpostavke proizlaze iz eksperimentalnih modela autoimunih bolesti, ali još uvijek nedostaje potvrda njihove uključenosti u humanim autoimunim bolestima. Infekcijski antigeni, pogotovo oni za koje se zna da mogu uzrokovati artritis slične RA (kao npr. artritis kod Lyme bolesti, reaktivni artritis, različiti virusni artritis), smatrali su se jednim od mogućih, ali za to nema dovoljno dokaza.

Za parvovirus B19 se zna da može uzrokovati artritis odraslih. U nekih bolesnika s pozitivnim reumatoidnim faktorom (RF), u ranoj fazi RA dokazano je da je riječ o infekciji parvovirusom B19 (27). Predložene su i neke druge vrste parvovirusa kao uzročnika RA zbog njihove sposobnosti perzistencije u sinovijalnoj membrani (28).

O povezanosti virusa Epstein Barr (EBV) i RA raspravlja se 30-ak godina. EBV predstavlja poliklonski aktivator limfocita B koji regulira hiperprodukciju imunoglobulina uključujući RF. Također, koncentracija protutijela na EBV povećana je kod RA, a količina EBV u perifernoj krvi bolesnika s RA upotrebom PCR-metode je značajno veća (29). Uloga EBV u nastanku RA nastoji se objasniti i fenomenom molekulske mimikrije između virusnog glikoproteina gp 110 i varijabilne regije  $\beta$ -lanca MHC-molekule II razreda HLA-DRB1 (30). Bolesnici sa serološki utvrđenom infekcijom EBV posjeduju protutijela koja prepoznaju isti peptid koji se nalazi i na gp110 i na HLA-DRB1 iz čega proizlazi da infekcija EBV može izazvati produkciju protutijela koja križno prepoznaju antigene HLA-DRB1 što može biti uzrokom RA (31,32).

Mikobakterije kao mogući uzročnici RA također su predmet istraživanja već niz godina. Naime, mikobakterije eksprimiraju HSP (od engl. heat shock proteins) koji predstavlja artritogeni antigen u modelu adjuvantnog artritisa štakora (33). Bakterijski HSP je vrlo sličan ljudskom te se smatra da ima ulogu superantigena u izazivanju upale. Tako superantigeni mogu pokrenuti mehanizam molekulske mimikrije i pokrenuti stimulaciju T-staničnih klonova. To dodatno podržava činjenica da su geni za ljudske HSP smješteni unutar sustava MHC (34).

Također je moguće da je RA posljedica kronične infekcije s nekim, do sada neidentificiranim uzročnikom (35).

### 1.2.3 Hormonski čimbenici

S obzirom da je RA 2-3 puta češći u žena, smatra se da spolni hormoni imaju ulogu u imunološkim zbivanjima u RA. Vjeruje se da povišena razina estrogena može potaknuti razvoj autoimune bolesti, kako u žena, tako i u muškaraca. U muškaraca oboljelih od RA ustanovljene su značajno veće količine estradiola, a značajno niže dehidroepiandrosterona nego u zdravih (36). Hidroksilacija estrogena je pojačana, i u muškaraca, i u žena s RA. Sam mehanizam pojačane hidroksilacije nije jasan iako se zna da estrogenski metaboliti mogu pridonijeti diferencijaciji limfocita B i aktivaciji limfocita T (37). Nadalje, trudnoća pogoduje RA. U trudnoći obično dolazi do remisije bolesti, a pogoršanja se često javljaju u puerperiju. Mehanizam utjecaja trudnoće na RA nije još potpuno razjašnjen. Smatra se da remisiji pridonosi promjena hormonskog profila tj. visoka razina progesterona, estrogena i kortizola. Također, u trudnoći dolazi do smanjenja stanicama posredovane imunosti i dominacije Th2 citokina (pojačano lučenje IL-10), promjena humoralne imunosti (pojačana glikozilacija IgG, povišena razina PAG, od engl. pregnancy associated globulin), te smanjenja funkcije neutrofila (38). U populaciji iznad 55 godina života RA ima podjednaku učestalost u oba spola. Populacijske studije pokazale su pad u incidenciji obolijevanja od RA, a jedan od razloga smatra se i upotreba oralnih kontraceptiva (39).

Stres i trauma mogući su pokretači bolesti kod nekih individua. Odgovornim za to smatra se poremećaj na razini hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda. S time se povezuje i uloga nedavno otkrivenog genskog lokusa za CRH (od engl. corticotrophin-releasing-hormon) (40).

### 1.2.4 Neurološki čimbenici

Postoje i studije koje ukazuju na ulogu živčanog sustava u nastanku i razvoju RA (41). Da je inervacija zgloba važna u stvaranju upale dokaz je i činjenica da se sinovitis ne razvija u paretičnom zglobu bolesnika s RA i hemiplegijom. Smatra se da je tvar P neuropeptid koji ima važnu ulogu u RA. On je uključen u prenošenje bolnih signala, a ima i višestruke proupalne osobitosti. Dokazano je,



između ostalog, da uzrokuje oslobađanje upalnih citokina iz makrofaga te produkciju prostaglandina u sinoviocitima. U eksperimentalnom artritisu izazvanom u štakora ustanovljena je izravna korelacija oslobođene tvari P i intenziteta upale (42).

### 1.2.5 Vanjski čimbenici

Postoje podaci koji ukazuju da hrana izrazito bogata bjelančevinama može kod genetski predisponiranih osoba pokrenuti RA (43). Ostali podaci o utjecaju prehrane na RA uglavnom se odnose na povoljan učinak pojedinih namirnica. Mnoge studije ukazuju na povoljan utjecaj nezasićenih masnih kiselina omega-3 u bolesnika s RA zbog njihovog utjecaja na sintezu prostaglandina (44,45). Recentni podaci ukazuju na dobar učinak mediteranske ishrane bazirane na maslinovom ulju i njen protuupalni učinak (46).

Podaci o pušenju kao rizičnom faktoru za RA su kontroverzni (47,48,49). Žestoko pušenje može pogoršati tijek bolesti (50).

## 1.3 Patogeneza RA

Osnovna značajka RA je upala koja dovodi do destrukcije zglobne hrskavice i subhondralne kosti uslijed hiperplazije sinovijskog tkiva. Sinovijska membrana zdravog zgloba sastoji se od intime koja sadrži dvije vrste sinoviocita: tip A i tip B. Matriks intime je bogat proteoglikanima i hijaluronskom kiselinom. Subintima sadrži krvne žile, te limfatične i nervne završetke koji su uklopljeni u kolagena vlakna. U RA sinovijska membrana izrazito zadeblja što se može lijepo vidjeti pri artroskopiji. Tada dolazi do povećanja broja sinoviocita (tipa A i tipa B), a u subintimi se nakupljaju imunosne i upalne stanice, prvenstveno makrofazi, limfociti T i B, te dendritičke stanice (51,52). Neovaskularizacija je glavna karakteristika hiperplazije subintimalnog dijela sinovijske membrane (53). Tijekom progresije bolesti sinoviociti migriraju prema hrskavici. Ta vaskularizirana i

limfocitnim infiltratima zadebljana sinovija koja prekriva zglobne površine naziva se panus. Uslijed sekrecije citokina i destruktivnih enzima dolazi do destruktivnih promjena karakterističnih za RA (54).

Oštećenje hrskavice i subhondralne kosti tijekom RA započinje predočavanjem artritogenog antigena pomoćničkim stanicama T u imunogenetički sklonom domaćinu. Stanice koje predočuju antigen (APC, od engl. antigen presenting cells) - makrofazi i dendritične stanice sinovijske membrane - fagocitiraju, prerađuju i prezentiraju antigen limfocitima T. Tako aktivirani T-limfociti stimuliraju B-limfocite na lučenje čitavog spektra protutijela među kojima su najpoznatiji RF, te protutijela usmjerena na komponente hrskavičnog matriksa. Na taj način stvaraju se imunokompleksi na površnom sloju hrskavice. Oni aktiviraju komplement, pokreću kaskadne reakcije aktivacije komplementa i oslobađanje čimbenika upale. Rezultat prepoznavanja antigena predočenog na APC nije samo klonska ekspanzija limfocita, već i poticaj sinovijskim makrofazima na lučenje citokina među kojima su najvažniji faktor nekroze tumora  $\alpha$  (TNF $\alpha$ , od engl. tumor necrosis factor  $\alpha$ ) i interleukin 1 (IL-1). Sinovijska membrana bogata je upalnim stanicama, naročito neutrofilima, a migraciju i aktivaciju neutrofila također potpomažu brojni citokini. Najznačajniju ulogu među njima ima TNF $\alpha$  (55).

### 1.3.1 Citokini

#### 1.3.1.1 Definicija

Citokini su proteini koji uspostavljaju komunikaciju među stanicama i reguliraju međustanične procese kao što su upala, imunost, diferencijacija i fibroza. Stvaraju ih sve stanice s jezgrom, imaju molekulsku masu od 6-70 kDa, a svoje djelovanje ispoljavaju preko specifičnih receptora na staničnoj membrani i u samoj stanici. Tip i količina produkcije citokina ovisi o vrsti stanice, stupnju diferencijacije i aktivaciji stanice. Za razliku od hormona citokini su proizvod različitih, nespecializiranih stanica, a djeluju lokalno, na mjestu produkcije. Oslobađaju se nakon

stanične aktivacije i obično su inaktivni u serumu i plazmi (56). Međutim, razlika između citokina i hormona nije apsolutna te pojedini citokini imaju više sličnosti s hormonima. Receptori za jedne i druge su često homologni. Upravo interakcija citokina i receptora rezultira kaskadom signala koji dovode do aktivacije transkripcije gena, pa može doći do podraživanja istovrsnih stanica (autokrini efekt), susjednih stanica (parakrini efekt), a mogu ispoljavati djelovanje i na udaljene organe i tkiva (endokrini efekt) (57).

### 1.3.1.2 Klasifikacija i struktura citokina

Nomenklatura citokina se oduvijek bazirala na njihovoj biološkoj aktivnosti. S vremenom se ustanovilo da različiti proteini mogu imati istu biološku aktivnost i obrnuto; pojedini citokin (npr IL-1) može imati izuzetno širok raspon različitih bioloških djelovanja.

Struktura citokina počela se upoznavati 80-ih i 90-ih godina XX. stoljeća i danas se zna da je izrazito heterogena. Međutim, postoje sličnosti u strukturi pojedinih citokina i na temelju njih oni se mogu klasificirati u nekoliko skupina (obitelji) (56) (Tablica 1).

TNF-skupina citokina je jedna od najvećih, a glavni predstavnik te skupine je  $\text{TNF}\alpha$ . Veliku skupinu čine i kemotaksijski proteini koji se još nazivaju i kemokini.

Kada su prvi put opisani citokini su se smatrali sekrecijskim proteinima, ali danas se zna da oni mogu imati različite osobitosti. Neki, kao npr.  $\text{TNF}\alpha$ , postoje u dva oblika; sekrecijskom i membranskom, a neki (kao npr.  $\text{LT}\alpha\beta$  i  $\text{CD40L}$ ) postoje samo na površini stanica. Usprkos različitim modelima ekspresije, svi oni pripadaju istoj skupini (TNF). Neki citokini, kao npr.  $\text{IL-1}\alpha$  oslobodaju se iz stanice samo nakon njene smrti, a neki ( $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-18}$ ) uz pomoć interleukin-1-konvertirajućeg enzima (ICE) poznatog i kao kaspaza-1 (58).



**Tablica 1: Obitelji citokina s obzirom na strukturne sličnosti**

(modificirano prema: Maini RN, Feldmann M. TNF $\alpha$  antagonism and rheumatoid arthritis. Science Press 2000, London, UK; str.4 i La Cava A. Cytokines and autoimmune rheumatic diseases. Int J Advances Rheumatol 2003;1(1): 11

<b>TNF obitelj</b>
TNF $\alpha$ , LT $\alpha$ , LT $\beta$ , CDL40L, CD30L, CD27L, FasL
<b>IL-1 obitelj</b>
IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1Ra, IL-18
<b>hematopoetini</b>
<b><math>\gamma</math>c obitelj - citokini koji se vežu na receptore koji sadrže zajednički <math>\gamma</math> lanac</b>
IL-4, IL-2, IL-7, IL-9, IL-15
<b><math>\beta</math>c obitelj – citokini koji se vežu na receptore koji sadrže zajednički <math>\beta</math> lanac</b>
IL-3, IL-5, GM-CSF
<b>citokini koji se vežu za zajednički receptorski kompleks IL-4/IL-13</b>
IL-4, IL-13
<b>gp130 obitelj – citokini koji se vežu na homologne gp 130 receptore</b>
IL-6, IL-11, G-CSF
<b>citokini sa jedinstvenim karakteristikama koji ne pripadaju niti jednoj drugoj obitelji</b>
IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$
<b>PDGF obitelj</b>
PDGF-A, PDGF-B, CSF-1
<b>Kemokini</b>
<b><math>\alpha</math> (C-X-C) obitelj</b>
IL-8, gro $\alpha/\beta/\gamma$ , NAP-2, ENA-78, GCP-2, PF4, CTAP-3, Mig, $\gamma$ IP-10
<b><math>\beta</math> (C-C) obitelj</b>
MCP-1, MCP-2, MCP-3, MIP-1 $\beta$ , MIP-1 $\alpha$ , RANTES
<b>TGF <math>\beta</math> obitelj</b>
TGF $\beta$ , inhibin- $\beta$ -2A, inhibin- $\beta$ -2B, aktivin-1, aktivin-2a, aktivin-2b, activin-4, BMP-1, BMP-2A, BMP-2B, BMP-4

kratice:

LT	limfotoksin
PDGF	trombocitni čimbenik rasta, od engl. platelet-derived growth factor
CSF	čimbenik stimulacije kolonija, od engl. colony-stimulating factor
NAP	peptid aktivacije neutrofila, od engl. neutrophil-activating peptide
ENA	peptid aktivacije epitelnih neutrofila, od engl. epithelial neutrophil- activating peptide
GCP	granulocitni kemotaktički peptid, od engl. granulocyte chemotactic peptide
PF	čimbenik trombocita, od engl. platelet factor
CTAP	peptid aktivacije vezivnog tkiva, od engl. connective tissue activating peptide
$\gamma$ IP-10	$\gamma$ interferon inducibilni protein, od engl. $\gamma$ interferon inducible protein
RANTES	topljivi receptor koji je reguliran nakon aktivacije limfocita T, od engl. regulated upon activation T cell expressed and secreted soluble (receptor)
BMP	morfogenetski koštani protein, od engl. bone morphogenetic protein

### 1.3.1.3 Citokinski receptori

Citokinski receptori se nalaze na površini stanica i odgovorni su za prijenos signala citokina u unutrašnjost stanice pa tako i za njihov biološki učinak. Distribucija i gustoća receptora na različitim tkivima i organima je različita i o tome ovisi specifičnost različitih organa za pojedine citokine. Receptori citokina su također izrazito različite strukture te se mogu grupirati u obitelji na dva načina. Prva podjela temelji se isključivo na strukturi receptora pa tako imamo npr. imunoglobulinske ili dominantno cisteinske receptore. Druga podjela uzima u obzir zajedničke receptorske lance za pojedine proteine. Ti zajednički lanci odgovorni su za preklapajuća djelovanja pojedinih citokina.

Učinak citokina posredstvom receptora je vrlo kompleksan. Mnogobrojni unutarstanični mehanizmi započinju nakon vezanja citokina za pojedini receptor, aktivira se transkripcija gena i time mijenja metabolički kapacitet stanice (59).

S obzirom na kapacitet biološkog djelovanja citokina u zdravom ili u bolesnom organizmu, jasno je da njihovo djelovanje mora biti strogo kontrolirano. Ta se kontrola odvija na različite načine. Produkcija citokina u fiziološkim uvjetima je kratkotrajna, a genska ekspresija traje od par sati do dva dana. Dugotrajna ekspresija je obično znak bolesti. Važan oblik regulacije citokina posreduju citokinski inhibitori.

### 1.3.1.4 Citokinski inhibitori

Postoje tri vrste inhibitora citokina. Najčešći su tzv. topljivi receptori koji uglavnom nastaju cijepanjem membranskih receptora iako se mogu stvarati i *de novo*. Induciraju se aktiviranjem stanice i koreliraju s aktivnošću bolesti (60). Topljivi receptori obično blokiraju djelovanje pripadajućih citokina, jer vežući se za njih onemogućavaju njihovo vezanje za pripadajuće membranske receptore i time sprečavaju unutarstanično signaliranje. Cijepanjem membranskih receptora smanjuje se i njihova gustoća, a time i mogućnost križnog vezanja pojedinih protutijela. Poznati topljivi receptori su npr. topljivi p55 i p75 receptor za TNF (sTNFR), topljivi receptor za IL-1 (sIL-1R) tip 1 i 2, topljivi receptor za IFN $\gamma$  (s IFN $\gamma$ ) (56).

Postoje i antagonisti receptora. Do danas je otkriven samo jedan i to IL-1Ra. On se veže na tip I receptora za IL-1 i onemogućuje njegovu aktivaciju bilo s IL-1 $\alpha$ , bilo s IL-1 $\beta$  pa tako djeluje kao kompetitivni antagonist (61). Da bi ostvario svoje djelovanje, njegove koncentracije bi trebale biti deset puta veće od IL-1, što nije slučaj u zglobovima oboljelih od RA gdje mu je koncentracija 1,2 do 3,6 puta viša od koncentracije IL-1 (62,63).

Pojedini citokini imaju uglavnom inhibicijsko djelovanje. Takvi su npr. transformirajući faktor rasta (TGF) $\beta$ , IL-4, IL-10, IL-13, IFN $\alpha$  i IFN $\beta$ . Oni, dakle, inhibiraju produkciju drugih citokina, ali neke stanice mogu i stimulirati.

### 1.3.1.5 Uloga citokina u upalnom procesu

Citokini imaju ključnu ulogu u upalnom procesu i to naročito u subakutnoj i kroničnoj fazi. Neki drugi medijatori, kao npr. histamin i bradikinin, su važniji u akutnom upalnom odgovoru.

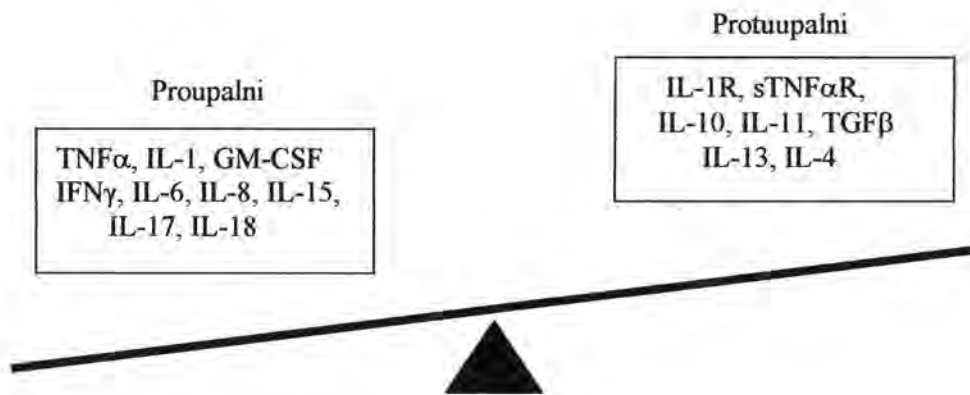
Nakon određenog stresa, bilo da je riječ o infekciji ili fizičkom stresu, TNF $\alpha$  najbrže se oslobađa od svih proupalnih citokina uključujući IL-1, IL-6 te različite kemokine (IL-8, upalne proteine makrofaga (MIPs, od engl. macrophage inflammatory proteins) i monocitne kemotaksijske proteine (MCPs, od engl. monocyte chemoattractant proteins) (64). Produkcija TNF $\alpha$  je prisutna u ranom upalnom procesu i potiče dodatno privlačenje leukocita. Adhezijske molekule i kemokini koji sudjeluju u migraciji krvnih stanica prema mjestu upale također su regulirani putem TNF $\alpha$  (57).

TNF $\alpha$  ima učinak na susjedne stanice. Sve stanice osim eritrocita imaju receptore za TNF $\alpha$  te stoga mogu biti potaknute njegovim djelovanjem. On je aktivan u obje forme. Vezan za površinu stanice on aktivira p75 TNF-receptor susjedne stanice, dok se sekretorni oblik može vezati na oba receptora i nekih udaljenih stanica (65).

TNF $\alpha$  kao i različite druge citokine mogu stvarati različite stanice kao što su makrofagi, dendritičke stanice, limfociti CD4+T, stanice NK, mastociti, eozinofili ili stanice endotela, a koji će se citokin oslobadati ovisi o pokretaču i vrsti podražene stanice (66).

### 1.3.1.6 Uloga citokina u RA

S obzirom da je sinovijsko tkivo lako dostupno, uloga pojedinih citokina u RA vrlo je dobro proučena. Vodeću ulogu u nastanku i razvoju upale u RA imaju citokini monocitno/makrofagnog reda kao što su  $\text{TNF}\alpha$  i IL-1, ali i mnogi drugi proupalni citokini: IL-6, IL-8, IL-12, IL-15 i IL-18 koji su također prisutni u sinovijskom tkivu bolesnika s RA. U zglobu bolesnika s RA prisutni su i protuupalni citokini: IL-10, IL-11, IL-13 i  $\text{TGF}\beta$ , te sTNFR i sIL-1R. Neravnoteža citokina u korist proupalnih citokina u zglobu bolesnika s RA je središnji patogenetski mehanizam te bolesti (slika 1). Uzorci reumatoidnih sinovijskih membrana pokazuju isti sastav proupalnih citokina bez obzira na dužinu trajanja ili stadij bolesti, ukazujući da je ispoljenost citokina u reumatoidnoj sinovijskoj membrani prolongirana, za razliku od prolazne indukcije koju posreduju mitogeni (56). Sinovijski  $\text{TNF}\alpha$  utječe na ekspresiju IL-1 i ostalih proupalnih citokina i tako potiče njihovu kaskadnu produkciju.



Slika 1: Neravnoteža citokina u RA

#### 1.3.1.6.1 Faktor nekroze tumora $\alpha$ ( $\text{TNF}\alpha$ ) i interleukin 1 (IL-1)

$\text{TNF}\alpha$  izlučuju prvenstveno makrofazi i fibroblasti podražene sinovijske membrane te neutrofili u sinovijskoj tekućini, a ostale stanice budu potaknute parakrino ili autokrino. Njegovim

učinkom tako bude inducirano oslobađanje mnogih drugih citokina uključujući IL-1, IL-6, IL-8 i GM-CSF (čimbenik stimulacije granulocitno-monocitnih kolonija, od engl. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor); drugih proupalnih medijatora kao što su prostaglandini i matriks-metaloproteinaze (MMP); kemokina te čimbenika vaskularnog endotelnog rasta (VEGF, od engl. vascular endothelial growth factor) (62,67). Njime su regulirane i važne stanične površinske strukture kao što su MHC-molekule i adhezijske molekule (68). Za razumijevanje njegove uloge u imunopatogenezi RA važno je naglasiti da on, doduše u manjoj mjeri, inducira i oslobađanje protuupalnih citokina kao što su IL-10, TGF $\beta$  (transformirajući čimbenik rasta  $\beta$ , od engl. transforming growth factor  $\beta$ ) te IL-1Ra. Regulacija produkcije tih citokina je vjerojatno jedan od važnijih faktora u održavanju i nastajanju kroničnog upalnog procesa (69). TNF $\alpha$  može regulirati stanično preživljavanje a u određenim okolnostima inducirati apoptozu, inducirati nekrozu ili pak imati antiapoptotički učinak. Nadalje, on utječe na indukciju adhezijskih molekula na endotelnim stanicama. S obzirom da je ključna uloga endotelnih stanica održavanje antitrombotičke površine krvne žile, prisutnost TNF $\alpha$  dovodi do protrombotičkog učinka. Indukcija adhezijskih molekula na endotelnim stanicama malih krvnih žila važna je, jer dovodi do nakupljanja leukocita u ekstravaskularnom tkivu. U eksperimentalnim modelima dokazano je da ih inducira TNF $\alpha$ . Endotelne stanice potaknute s TNF $\alpha$ , također luče kemokine kao što su IL-8 i MCP-1 (od engl. monocyte chemotactic protein-1). To pridonosi migraciji polimorfonukleara i mononukleara na mjesto upale. Povećana količina TNF $\alpha$  nađena je u sinovijskoj tekućini u više od 50% bolesnika s RA, naročito u onih s teškim oblikom bolesti (70). TNF $\alpha$  se u većim količinama može dokazati u makrofazima koji oblažu sinovijsku membranu te u perivaskularnim odjeljcima subintime, a može se dokazati i u graničnom sloju između panusa i hrskavice, dakle na mjestima gdje nastaju prve patološke promjene u RA.

IL-1 uglavnom izlučuju mononuklearni fagociti, a u ranijim istraživanjima se opisivao kao faktor aktivacije limfocita. Prisustvo IL-1 u sinovijskoj membrani dokazano je još 1968. kada su Bodel i Hollingsworth opisali endogeni pirogen u eksudatima zglobova bolesnika s RA (71), a kasnije su njegovu prisutnost potvrdile mnoge studije. IL-1 postoji u obliku  $\alpha$  i  $\beta$ . U različitim tkivima se



relativni omjer oblika  $\alpha$  i  $\beta$  razlikuje, ali biološki učinci oba su vrlo slični (72). IL-1 ima sličan spektar djelovanja kao i TNF $\alpha$ , samo znatno slabije djeluje na ekspresiju MHC i induciranje apoptoze.

I IL-1 i TNF $\alpha$  imaju važnu ulogu u metabolizmu vezivnog tkiva. Oni dovode do aktivacije puta degradacije hrskavice. Na fibroblastima induciraju proliferaciju, a hondrociti odgovaraju na TNF $\alpha$  i IL-1 produkcijom IL-6 i drugih citokina te produkcijom degradacijskih enzima hrskavice - matrix metaloproteinaza (stromelizin, kolagenaza) (73,74).

Nadalje, i TNF $\alpha$  i IL-1 djeluju na osteoklaste te dovode do gubitka koštane mase. Obzirom da reguliraju djelovanje osteoklastnog diferencijacijskog faktora (ODF), čije djelovanje na prekursor osteoklasta se ostvaruje preko membranskih receptora (74,75), njihov učinak na osteoklaste je izravan i neizravan.

#### 1.3.1.6.2 Uloga ostalih citokina u RA

Interleukin 6 (IL-6) se nalazi u brojnim tkivima a stvaraju ga fibroblasti, monociti te koštane i hrskavične stanice (57). On potiče sazrijevanje limfocita B u plazma stanice, pojačava fagocitozu i ispoljavanje receptora na makrofazima. Od svih citokina, on ima daleko najveću bioaktivnost u krvi te je njegov učinak moguć i na udaljenim organima. On utječe na stvaranje C-reaktivnog proteina u jetri i njihove vrijednosti dobro koreliraju (76).

Interleukin 10 (IL-10) proizvode klonovi Th2 pomoćničkih stanica te ima inhibicijsko djelovanje na sintezu proupalnih citokina iz stanica Th1, vjerojatno potiskujući prezentirajuću funkciju makrofaga i drugih APC (77). Poznati su i njegovi inhibicijski učinci na aktivnost monocita i T-limfocita, ekspresiju molekula MHC (78), kao i na sekreciju IgG iz mononuklearnih stanica perifere krvi (79). IL-10 spontano proizvode stanice sinovijske membrane bolesnika s RA, a rezultati više autora ukazuju na IL-10 kao važnu imunoregulacijsku molekulu u reumatoidnoj sinoviji (80).

Za IL-2 je poznato da aktivira citotoksičke limfocite T i NK-stanice, a u sinovijskoj tekućini ima ga u vrlo niskim koncentracijama.

Slične učinke ima i IL-15 koji uz to potiče i umnožavanje T-limfocita. U sinovijskoj membrani zglobova zahvaćenog s RA pronađen je u velikim količinama (81). Misli se da T- limfociti aktivirani s IL-15 izravnim staničnim kontaktom stimuliraju makrofage na produkciju TNF $\alpha$  (82,83). S obzirom da je izrazito povišen kod bolesnika s dugotrajnim RA smatra se da ima važnu ulogu u podržavanju reumatoidnog sinovitisa (84).

Recentna istraživanja ukazuju da IL-16 ima značajnu ulogu u oštećenju zgloba kod bolesnika s RA (85).

IL -8 potiče kemotaksiju neutrofila i limfocita T, pa tako i u RA koncentracija IL-8 korelira s brojem neutrofila (86). On se izlučuje kao odgovor na IL-1, proizveden na mjestu odvijanja reakcije kasne preosjetljivosti, privlačeći limfocite T i započinjući tako imunološki posredovan upalni odgovor (87).

IL-12 je stimulirajući faktor NK-stanica a potiče diferencijaciju naivnih CD4+T-limfocita u stanice Th1-fenotipa i regulira njihovu funkciju potičući lučenje IFN $\gamma$ , te niza proupalnih citokina (88). Dokazana je njegova prisutnost u sinovijskoj tekućini (89).

IL-18 ima mnoge zajedničke karakteristike s IL-12, a izoliran je iz mišjih makrofaga kao odgovor na HSP. Luče ga i osteoblasti, a posredstvom GM-CSF inhibira aktivnost osteoklasta (90).

IL-17 luče CD4+ limfociti; djeluje na sinoviocite te inducira produkciju proupalnog citokinskog obrasca (91).

GM-CSF (čimbenik stimulacije granulocitno-monocitnih kolonija, od engl. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) sudjeluje u razvoju sinovitisa povećanjem ekspresije MHC-molekula II. razreda (92). U RA njegov glavni izvor su sinovijalni makrofazi, a za njegovo lučenje potrebna je stalna prisutnost TNF $\alpha$  (93).

EGF-CSF (čimbenik rasta fibroblasta, od engl. epidermal growth factor) snažno inhibira sintezu kolagena tipa 1, a djeluje i kemotaksijski na mezenhimalne stanice. U sinovijskoj membrani bolesnika s RA igra važnu ulogu u hiperplaziji sinovije (94).

Interferon-gama (IFN $\gamma$ ) je snažan inhibitor koštane resorpcije što ostvaruje inhibiranjem stvaranja i diferencijacije osteoklasta iz njihovih prekusora.

TGF $\beta$  (transformirajući čimbenik rasta  $\beta$ , od engl. transforming growth factor  $\beta$ ) povećava sposobnost migracije osteoblasta potičući migraciju prekursora osteoblasta u područja aktivne koštane resorpcije, a može stimulirati i osteoklastičnu aktivnost. S druge strane, on može potisnuti većinu znakova sinovijske upale uključujući T-staničnu aktivaciju i proliferaciju, B- staničnu diferencijaciju i migraciju leukocita u upalno područje (95).

Iz navedenog možemo zaključiti da je djelovanje pojedinih citokina tijesno povezano u tzv. citokinsku mrežu te da nazočnost jednih ovisi o lučenju drugih. Njihova isprepletenost je složena i još uvijek nije potpuno jasna. TNF $\alpha$  ima središnje mjesto u toj mreži, a time i u patogenezi RA (56,69,74).

### 1.3.2 Ostali upalni čimbenici i adhezijske molekule

Brojni stimuli odgovorni su za pojačanu neovaskularizaciju u reumatoidnoj upali. Osim hipoksije, na bujanje endotelnih stanica utječu topljivi vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF od engl. vascular endothelial growth factor) i topljive vaskularne adhezijske molekule 1 (VCAM-1 od engl. vascular cell adhesion molecule-1). Na endotelnim stanicama nalaze se i brojne druge adhezijske molekule kao što su E- selektin te unutarstanične adhezijske molekule (ICAM od engl. intracellular adhesion molecules), a već smo prethodno naglasili da proupalni citokini, u prvom redu TNF  $\alpha$  i IL-1, stimuliraju njihovu ekspresiju i nakupljanje upalnih stanica. Daljnje napredovanje upale potiču kemokini kao što su MCP-1, IL 8 i MCP-2, čija je ekspresija u reumatoidnoj sinoviji vrlo izražena (87,96).

Ostali proupalni čimbenici koje nalazimo u sinoviji bolesnika s RA su dušik-II-oksidi (NO), prostaglandini i leukotrieni te slobodni kisikovi radikali (97).



### 1.3.3 Apoptoza

S obzirom da programirana smrt stanica, odnosno apoptoza, u normalnim okolnostima onemogućava hiperplaziju tkiva i proliferaciju limfocita, njen poremećaj smatra se odgovornim za podržavanje upalnog procesa u zglobu bolesnika s RA (98). Ona se ostvaruje putem površinske molekule Fas. Fas ligand (FasL) je molekula koja pripada obitelji TNF, a ispoljena je na površini efektorskih stanica te predstavlja glavni nesekretorski mehanizam citotoksičnosti posredovane stanicama (99). Unatoč hipoksiji i  $TNF\alpha$ , malo je apoptotičkih stanica prisutno u reumatoidnoj sinoviji (100). Tome u prilog ide i obilje protuapoptotičkih molekula u sinoviji (101). TGF $\beta$ 1 je važan u sprečavanju apoptoze stanica T i time odgovoran za produljeno T-stanično preživljavanje u RA. Stvaraju ga sinovijski fibroblasti i makrofazi (102). Međutim, proces apoptoze ne smijemo promatrati izolirano. Sinovijski mikrookoliš aktivno pridonosi apoptozi lučenjem raznih kemokina koji su odgovorni za pretjerano nakupljanje leukocita. Apoptoza oštećenih limfocita mogla bi biti posljedica mutacije protektivnih onkogenih kao što je p53, a može biti i posljedica intraartikularne hipoksije (103). Recentna istraživanja navode važnu ulogu čimbenika inhibicije migracije makrofaga (MIF od engl. macrophage migration inhibitor factor) u regulaciji ekspresije p53 (104).

### 1.3.4 Mehanizam destrukcije tkiva u RA

Iako precizni mehanizam destrukcije hrskavice i kosti u RA još nije u potpunosti razjašnjen, poznato je da IL-1 i  $TNF\alpha$  značajno potiču sintezu i lučenje destruktivnih enzima u panusu. Ta skupina proteolitičkih enzima naziva se matrix-metaloproteinaze (MMP).

MMP se oslobađaju iz sinoviocita, hondrocita, makrofaga, neutrofila i T-limfocita. One se sintetiziraju i luče u inaktivnom obliku proenzima, a za njihovu aktivaciju potreban je kalcij. Mogu biti u solubilnom ili membranskom obliku (105). Za njihovu aktivaciju potreban je plazmin, koji nastaje iz plazminogena, a tu reakciju potiče tkivni plazminogeni aktivator. Njegovu pak sintezu potiče IL-1. Najznačajnije MMP su kolagenaze, zatim gelatinaze koje razgrađuju denaturirani kolagen,

stromelizin koji aktivira kolagenaze i degradira proteoglikan te serinske i cisteinske proteaze, kao što je npr. katepsin. Već je ranije naglašeno da sintezu MMP mogu potaknuti  $TNF\alpha$ , IL-1 i EGF dok  $TGF\beta$ ,  $INF\gamma$  i kortikosteroidi mogu inhibirati njihovo djelovanje (106).

Postoje i fiziološki inhibitori MMP. To je skupina enzima pod nazivom tkivni inhibitori metaloproteinaza (TIMP, od engl. tissue inhibitors of metalloproteinases) koji se vežu samo za aktivne oblike MMP. U RA MMP prevladavaju u odnosu na TIMP (74,107).  $TGF-\beta$  (108), ali i IL-6 (108, 109) i IL-11 (110) mogu poticati lučenje TIMP u sinovijskoj membrani i hondrocitima. Razgradnjom hrskavice, kosti i tetiva nastaje detritus koji mehanički i kemijski podržava nastali sinovitis.

Ostali destruktivni faktori uključuju citokine kao što su  $TNF\alpha$  i IL-1, a oni aktiviraju osteoklaste i dovode do resorpcije subhondralne kosti. Važan medijator oštećenja kosti, koji je nedavno opisan, je osteoklastni diferencijacijski faktor (ODF). Riječ je o transmembranskom proteinu koji je izražen na osteoblastima i stromalnim stanicama, a luče ga u solubilnom obliku aktivirani limociti (74,111,112). Poznat je i pod akronimom TRANCE (od engl. TNF-related activation induced cytokine) (113). ODF djeluje preko membranskog receptorskog aktivatora nuklearnog faktora kappa B (RANKL, od engl. receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand) na prekursorima osteoklasta i tako dovodi do destrukcije kosti (113,114). Prema tome, aktivirani limfociti uz  $TNF\alpha$ , IL-1 i ODF dovode do periartikularne i sistemske osteoporoze u bolesnika s RA. Postoji i solubilni oblik molekule RANK koji se naziva osteoprotegerin ili OCIF (od engl. osteoclastogenesis inhibitory factor) koji djeluje kao receptor koji štiti osteoklaste od djelovanja ODF (74,114).

### 1.3.5 Humoralna imunost u RA

Limfociti B zastupljeni su u sinovijskoj membrani u manjoj mjeri u odnosu na limfocite T, a mogu se naći u svim razvojnim oblicima. U sinovijskoj membrani su organizirani u sekundarne folikule. Oni pak sadrže germinativne centre koji se mogu diferencirati u plazma stanice i proizvoditi imunoglobuline specifične za pojedine antigene (115,116). U sinovijskoj membrani postoje i folikularne dendritičke stanice za koje se smatra da imaju važnu ulogu u humoralnom imunom

odgovoru. One imaju sposobnost zadržavanja antigena u nepromijenjenom obliku i privlačenja B-limfocita u folikule. U produkciji imunoglobulina značajnu ulogu imaju i sinoviociti (117).

#### 1.3.5.1 Reumatoidni faktor

B-limfociti u sinovijskom tkivu, sinovijskoj tekućini i perifernoj krvi mogu lučiti protutijela usmjerena na Fc fragment IgG. Ta protutijela nazivamo reumatoidnim faktorom (RF). Na njegovo postojanje ukazao je Rose još 1947., a 1948. tu ideju je preuzeo Ragan i razvio test aglutinacije ovčjih eritrocita.

Međutim, još od tada se zna da ne moraju svi bolesnici s RA imati pozitivan RF, stoga u 25-30 % bolesnika možemo govoriti o tzv. seronegativnom RA. Ti se podaci odnose na određivanje RF klasičnim metodama kao što su test aglutinacije ovčjih eritrocita i test fiksacije čestica lateksa. Međutim, enzimski imuno test (ELISA) otkriva pozitivan RF i u do 90% bolesnika s RA (118). Pozitivan RF može biti prisutan i u zdravih ljudi (prevalencija raste s dobi) te u nizu drugih bolesti kao npr. u kroničnim bakterijskim infekcijama, sistemskom eritemskom lupusu i drugim kroničnim upalnim bolestima, malignomima (119). Dakle, njegova nazočnost apsolutno ne potvrđuje, a odsutnost ne isključuje RA. RF može biti imunoglobulinskog razreda IgM, IgA, IgG i IgE, a konvencionalnim testovima dokazuje se IgM-RF. ELISA testovi omogućuju određivanje RF svih imunoglobulinskih razreda. Često se prisutnost RF u ranoj fazi bolesti ne može otkriti, no s druge strane može se naći u serumu bolesnika i prije kliničkog očitovanja artritisa. Njegova precizna uloga u patogenezi RA nije razjašnjena, no njegova prisutnost je udružena s agresivnijim oblikom bolesti (120,121,122) i izvanzglobnim očitovanjima bolesti (123).

Postoje male različitosti u specifičnosti i molekularnoj strukturi RF. Dokazana je križna reaktivnost ovih protutijela (124) te sposobnost prepoznavanja različitih epitopa na Fc- fragmentu teškog lanca IgG. Poliklonska stimulacija subpopulacije B-limfocita superantigenima (125) uključena je u rano stvaranje RF, a u jednoj fazi dolazi do aktivacije pomagačkih T-limfocita koji u određenim B-limfocitima uzrokuju gensko prekapčanje što rezultira produkcijom IgG s visokim afinitetom za Fc fragment. Imunogenetske studije su pokazale da se seropozitivni i seronegativni RA bolesnici mogu

razlikovati. Obje forme povezane su sa zajedničkim epitopima na HLA DRB-1 molekulama u kojima postoje razlike u sekvencama. U seropozitivnih bolesnika na poziciji 71 HLA-DR $\beta$ 1 lanca je lizin, a u seronegativnih arginin (15,126). RF i drugi mali srodni imunokompleksi imaju ulogu u nastajanju izvanzglobnih očitovanja RA. Prema toj teoriji IgG-RF imunokompleksi prelaze iz zgloba u cirkulaciju, a potom u tkiva. U tkivima aktiviraju makrofage koji imaju receptore za IgG (Fc- $\gamma$  receptore) te zatim luče proupalne citokine i kemokine (118). Nadalje, poznato je da IgM-RF ima veliku sposobnost aktiviranja komplementa i tim mehanizmom nastaje vaskulitis u sklopu RA (127).

#### 1.3.5.2 Protutijela protiv citruliniranog peptida

Unatrag nekoliko godina došlo se do spoznaje da se u bolesnika s RA mogu verificirati protutijela koja se vežu na cirkulirajući citrulinirani peptid (anti-CCP) (128). Citrulinacija je posljedica posttranslacijske modifikacije arginina (129). Smatra se da je citrulinacija vimentina u makrofazima početni korak u apoptotičkim procesima, a da citrulinirani proteini u sinoviji mogu biti odgovorni za kronični tijek RA (128). Citrulinske epitope prepoznaju antikeratinska protutijela (AKA), antiperinuklearni faktor (APF) te anti-Sa protutijela. Danas je stvorena i ELISA metoda za prepoznavanje citrulinskog peptida koja ima vrlo veliku specifičnost (97,4%) i nešto manju senzitivnost (47-68 %) za RA (130,131). Taj test se preporučuje kao novi dijagnostički biljeg za RA, a smatra se da može pomoći u otkrivanju ranog RA (132) te diferenciranju bolesnika koji će razviti dugotrajnu erozivnu bolest (133).

## 1.4 Klinička slika RA

Etiološka i patofiziološka raznolikost RA očituje se i u kliničkoj slici. Naročito je teško sa sigurnošću dijagnosticirati rani RA što je neophodno zbog ranog započinjanja liječenja diferentnim lijekovima.

#### 1.4.1 Rani reumatoidni artritis

Iako klinička slika RA ima neke osobitosti, ne postoje klinički i laboratorijski znakovi koji su patognomonični za tu bolest.

Dijagnoza RA zasniva se na prisutnosti određenih kliničkih i laboratorijskih parametara pa je na temelju tih parametara Američko reumatološko društvo (ACR, od engl. American College of Rheumatology) 1987. definiralo revidirane kriterije za klasifikaciju RA. (Tablica 2) (135).

**Tablica 2:** ACR klasifikacijski kriteriji za RA

1. jutarnja zakočenost zglobova u trajanju od najmanje 1 h
2. otok mekog tkiva (artritis) 3 ili više područja zglobova
3. artritis proksimalnih interfalangealnih (PIP), metakarpofalangealnih (MCP) ili radiokarpalnih (RC) zglobova
4. simetrični artritis
5. potkožni čvorići
6. prisutnost reumatoidnog faktora (RF)
7. radiološki nalaz erozija i/ili periartikularne osteopenije na RC i zglobovima šaka
Kriteriji 1-4 moraju biti prisutni najmanje 6 tjedana. Za dijagnozu RA moraju biti ispunjena najmanje 4 kriterija.

Međutim, ti su klasifikacijski kriteriji ustanovljeni za bolesnike s razvijenom slikom bolesti i imaju malu specifičnost i senzitivnost za rani RA (136). S obzirom da se reumatoidni čvorići i radiološke promjene javljaju rijetko na početku bolesti, a RF je često negativan (samo 33% bolesnika koji će kasnije biti seropozitivni imaju u prva tri mjeseca pozitivan RF, a 10-30% bolesnika trajno će imati negativan RF (137)), RA najčešće započinje simetričnim artritisom malih zglobova šaka te radiokarpalnih (RC) zglobova i jutarnjom zakočenošću u trajanju najmanje jednog sata.

Početak bolesti najčešće (u 50-70% bolesnika) je postupan i neprimjetan. Simptomi se pojavljuju tijekom nekoliko tjedana ili mjeseci, a često su praćeni i općim simptomima kao što su umor, slabost, blago povišena tjelesna temperatura, te nespecifičnim bolovima u kostima i mišićima. U 10 do 30 % bolesnika bolest može nastupiti naglo, kao akutni poliartritis, a najrjeđe prvo očitovanje bolesti je monoartritis. U 10-20% bolesnika simptomi se pojavljuju tijekom nekoliko tjedana (138).



Tijek bolesti može biti raznolik: od brzo progresivnog oblika bolesti do tzv. palindromskog oblika bolesti u kojem simptomi traju od nekoliko sati do nekoliko dana, a ponovno se javljaju tek nakon dužeg vremenskog razdoblja. Kod starijih bolesnika često se u početku bolesti javljaju mialgije te je rani reumatoidni artritis teško razlikovati od polimialgije reumatike (139).

Najčešće su ranim RA zahvaćeni metakarpofalangealni (MCP) i proksimalni interfalangealni (PIP) zglobovi šaka i metatarzofalangealni (MTP) zglobovi stopala što dovodi do funkcionalnih oštećenja (140). Sinovitis se očituje bolnošću i otokom zglobova, a može se javljati i upala tetivnih ovojnica što dodatno pridonosi ograničenim kretanjama zglobova. Otekline su često vretenaste, i zbog izljeva u zglobu na opip fluktuiraju. Artritis je obično simetričan iako može biti i asimetričan, osobito na početku bolesti. RA može zahvatiti i druge zglobove te nerijetko budu zahvaćeni skočni zglobovi, koljena, laktovi. Rjeđe su zahvaćeni akromioklavikularni i sternoklavikularni zglobovi, a može se javljati otežano žvakanje uslijed afekcije temporomandibularnih zglobova te promuklost uslijed zahvaćanja zglobova grkljana. Upala vanzglobnog sinovijskog tkiva rezultira tendosinovitisom i burzitisom.

#### 1.4.2 Razvijeni reumatoidni artritis

U kasnijem tijeku RA zahvaćen je veći broj zglobova, a uslijed kombinacije sinovitisa koji rezultira oštećenjem zglobova, tendosinovitisa i oslabljenosti ligamenata javljaju se karakteristični deformiteti. Na šakama su to subluksacija i ulnarna devijacija MCP i RC zglobova, te deformiteti prstiju poznati kao znak rupice za dugme i znak labudeg vrata (141). Na stopalima su najčešće zahvaćeni skočni zglob te subtalarni i talonavikularni zglob. Česte su valgus deformacije, a zbog dodatnog oštećenja tetiva česte su i subluksacije nožnih prstiju (142). Ramena i kukovi također su češće zahvaćeni u kasnijem tijeku, a reumatoidni koksitis može potpuno onеспособiti bolesnika za hodanje.

Tijekom RA često se javlja i slabost mišića koja može biti udružena s bolešću vratne kralježnice te pridruženim radikulopatijama ili kompresivnim neuropatijama. Iako RA može zahvatiti

vratnu kralježnicu na svim razinama, najpoznatija je, premda ne i najčešća, atlantoaksijalna subluksacija gdje zbog upale i oslabljenosti poprečnog ligamenta atlasa zub aksisa može pritisnuti medulu oblongatu. Ta komplikacija povezana je s visokom smrtnošću (143). Rane i opsežne erozije na perifernim zglobovima mogu upućivati da će se atlantoaksijalna subluksacija javiti u kasnijem tijeku bolesti (144). Češće su zahvaćeni niži vratni kralješci koji uslijed subluksacije mogu dovesti do mijelopatije koja može imati različita klinička očitovanja (145). Od neuropatija najčešće se javlja sindrom karpalnog kanala uslijed kompresije medijalnog živca uzrokovanog sinovitisom RC zgloba. Mogu se javljati i oštećenja ulnarnog te medijalnog peronealnog živca s posljedičnim simptomima (146).

#### 1.4.3 Izvanzglobna očitovanja RA

Izvanzglobna očitovanja se obično javljaju u seropozitivnom i aktivnom RA (121, 122, 147). Znatno rjeđe ona se mogu javiti i u "mirnom" obliku bolesti.

Najčešća sistemska očitovanja RA su reumatoidni subkutani čvorići. Oni su tvrdi i bezbolni, a veličina im je u rasponu od nekoliko milimetara do nekoliko centimetara u dijametri. Obično se nalaze na ekstenzornim površinama laktova, šaka ili stopala. Čvorići se obično povlače pri uspješnom liječenju RA, iako je opisano i pogoršanje uslijed liječenja metotreksatom (148).

Limfadenopatija se također može javiti u sklopu RA i to obično uz sistemske znakove bolesti kao što su povišena temperatura i gubitak na tjelesnoj težini (149).

Sindrom Felty je rjeda komplikacija RA u kojoj se u bolesnika razvija splenomegalija uz znakove hipersplenizma, a neutropenija je obično dominantna u odnosu na anemiju i trombocitopeniju. Takvi bolesnici imaju učestale infekcije, kronične ulkuse na nogama i znatno veću smrtnost (147). Zapravo, populacijske studije pokazale su da bolesnici s vanzglobnim očitovanjima RA imaju znatno veću smrtnost (150).

Oštećenje jetre opisuje se učestalo kod bolesnika s RA, ali su patohistološke promjene minimalne i nespecifične (151). U slučaju povišenih vrijednosti transaminaza svakako je potrebno misliti na to da one mogu biti uzrokovane lijekovima.

Amiloidoza uslijed taloženja serumskog amiloida A u tkivu je danas rijetka komplikacija RA a javlja se kod dugotrajne aktivne bolesti. Amiloid se može taložiti u bubregu, jetri, slezeni ili srcu.

Bolest pluća je česta u RA. Najčešći je pleuralni izljev koji može biti asimptomatski, ali i prva manifestacija bolesti (152). Rjeđi je intersticijski pneumonitis koji može uzrokovati plućnu fibrozu.

Perikarditis je također češće bez simptoma, ali može biti praćen i karakterističnom kliničkom slikom (153). Reumatoidni čvorići u miokardu mogu uzrokovati miokarditis ili različite smetnje provođenja.

U RA je često zahvaćeno i oko. Najčešće se javlja keratokonjuktivitis (154). Episkleritis se obično manifestira samo nadražajem oka, dok skleritis može dovesti do nekroze i perforacije. Keratitis može biti akutan i bolan, dok posljedica korneomalacije može biti sljepoća (155).

Kao i kod drugih sistemskih bolesti vezivnog tkiva u RA se može pojaviti Raynaudov fenomen.

Reumatoidni vaskulitis zahvaća najčešće male krvne žile na prstima ruku i nogu, a mogu se javljati i ulkusi na nogama, koji su često tvrdokorni na terapiju (156). Vaskulitis vasa nervorum može se očitovati senzo-motornom neuropatijom.

Osteoporoza je česta komplikacija RA. Tijekom bolesti gustoća kostiju se smanjuje iz različitih razloga (74,114,157), a pridonosi joj i liječenje glukokortikoidima (158). Najnovija istraživanja ukazala su na povezanost radiografskih erozija zglobova i generalizirane osteoporoze (159).

## **1.5. Dijagnostika RA**

Iako nema patognomoničnih kliničkih i laboratorijskih znakova RA, neki laboratorijski testovi i karakteristične radiološke promjene mogu potvrditi dijagnozu.



### 1.5.1 Laboratorijski testovi

Od nespecifičnih laboratorijskih nalaza u RA često nalazimo normocitnu normokromnu anemiju kao posljedicu kronične upalne bolesti. Česta je trombocitoza, naročito u aktivnom obliku bolesti, a leukociti su obično normalnih vrijednosti.

Od proteina akutne faze najvažnije nam je određivanje C-reaktivnog proteina (CRP) koji dobro korelira s kliničkom slikom, iako su i ostali upalni proteini (fibrinogen, haptoglobin, komponente komplementa, ceruloplazmin, feritin) obično povišeni (160). Sedimentacija eritrocita (SE) je manje specifična iako u akutnoj fazi dobro korelira s CRP-om, dok je u kroničnoj fazi često ubrzana i radi disproteinemije (161). Globulini  $\alpha_2$  povišeni su u akutnoj fazi bolesti, a globulni  $\gamma$  u kroničnoj fazi.

Od imunoloških testova najznačajnije je određivanje RF (Vidi poglavlje 1.3.5.1). RF može biti imunoglobulinskog razreda IgM, IgA, IgG i IgE, a konvencionalnim testovima (Waler Roseov test aglutinacije senzibiliziranih eritrocita ovce i test fiksacije čestica latexa) dokazuje se IgM RF. Enzimski imuno test (ELISA) omogućuje određivanje RF svih imunoglobulinskih razreda. S obzirom da je RF prisutan u 75-80% bolesnika s RA, njegovo određivanje služi za potvrđivanje dijagnoze te upućuje na agresivniji tijek bolesti s vanzglobnim očitovanjima (119,121, 122). Titar RF povišen je u aktivnoj fazi bolesti.

Već su spomenuta i protutijela na citrulinirane proteine (anti-CCP) (vidi poglavlje 1.3.5.2) koja imaju znatno veću specifičnost, ali i manju senzitivnost u odnosu na RF (130, 131). Čini se da je njihova uloga značajna u otkrivanju ranog RF-negativnog RA (132).

Antinuklearna protutijela (ANA, od engl. antinuclear antibody) su prisutna u 20-40 % bolesnika s RA (162), obično u niskom titru. Neka istraživanja upućuju da njihova prisutnost može upozoriti na agresivniji tijek bolesti s vanzglobim očitovanjima (163,164).

## 1.5.2 Radiologija

Klasične radiografske tehnike u početku bolesti ne pokazuju karakteristične promjene. Može se zamijetiti otok mekih tkiva i periartikularna osteoporozna, koji nisu specifični. U daljnjem tijeku javljaju se jukstaartikularne erozije koje upućuju na RA. One se šire na subhondralna područja, zatim dolazi do suženja zglobnih pukotina, a konačno i sublukacija i ankiloze. Učestalost tih promjena izrazito se razlikuje od bolesnika do bolesnika. Najranije radiografske promjene obično se javljaju na šakama, radiokarpalnim zglobovima i stopalima. Ako su prisutne pri otkrivanju bolesti, loš su prognostički znak (165,166).

S obzirom da je imperativ postaviti dijagnozu RA što je ranije moguće, danas primjenjujemo i tehnike kao što su magnetska rezonancija (MR) te ultrazvuk visoke rezolucije (HRUS, od engl. high-resolution ultrasound). MR može ukazati na rane promjene na razini sinovijskog tkiva i na razini kosti (167), a glavni je nedostatak visoka cijena pretrage. HRUS može ukazati na subklinički sinovitis, a ponekad i na koštane defekte koji se ne primjećuju na klasičnim radiološkim snimkama šaka (168). HRUS ima značajnu ulogu i u otkrivanju patologije tetiva i mekih tkiva u sklopu RA.

## 1.5.3 Pretrage sinovijske tekućine

Pretraga sinovijske tekućine nije od presudne pomoći u dijagnozi RA. Međutim, postoje neke osobitosti sinovijske tekućine u RA. Broj leukocita obično je između 2000 i 75000 u  $\text{mm}^3$ . Nadalje, u mikroskopskom pregledu svježe kapljice tzv. mokrom preparatu mogu se verificirati ragociti. To su neutrofilni sa citoplazmatskim refraktilnim granulama koje su šire od konvencionalnih granulocitnih granula. Danas se zna da se oni mogu naći i u kristaličnoj artropatiji i septičkom artritisu. Najznačajnije su citološka i mikrobiološka dijagnostika, naročito pri sumnji na superponiranu bakterijsku infekciju, koja s obzirom da su bolesnici s RA često pod imunosupresivnom terapijom ili imaju endoproteze, nije rijetka. U septičkom artritisu ima više od 95% neutrofila među stanicama s jezgrom, a mikrobiološkom analizom mogu se naći stafilokoki i streptokoki. Rjeđe se verificiraju

neiserija, mikobakterija tuberkuloze, gljivice ili virusi. Prisutnost malih limfocita karakteristična je za bolju prognozu RA (169, 170).

## 1.6 Liječenje RA

Osnovni cilj liječenja RA je spriječiti progresiju bolesti što znači suzbiti znakove i simptome bolesti, spriječiti strukturalna oštećenja zglobova i pripadajućih im struktura, tj. sačuvati funkcije zglobova te održati normalno fizičko i psihičko zdravlje bolesnika i radnu sposobnost.

S obzirom da akutne i kronične posljedice RA nastaju uslijed trajne upale koja dovodi do destrukcije tkiva, cilj liječenja je postići trajnu i potpunu kontrolu upale (170). Ostvarivanje tog cilja direktno je ovisno o ranoj dijagnozi RA dok erozije još nisu razvijene (171,172). Zakašnjenjem u početku liječenja većim od 12 tjedana propušta se prilika poboljšanja prognoze bolesti (173). Budući da je točan uzrok RA još uvijek nepoznat, današnje liječenje je usmjereno na različite razine kroničnog upalnog procesa i za liječnika reumatologa predstavlja veliki izazov.

### 1.6.1 Nefarmakološko liječenje

Redukcija tjelesne težine, imobilizacija, pravilno kretanje i specijalna pomagala mogu značajno reducirati opterećenje zahvaćenog zgloba. Uloga fizikalne terapije i rehabilitacije te edukacijskih programa je važna, ali ne smije biti prenaplašena. Odmor, poštedita i kriomasaža zahvaćenog zgloba, adekvatna pomagala, primijenjen program vježbanja, odgovarajuća obuća te pravilna ishrana i psihološka potpora od temeljne su važnosti za uspješno cjelokupno liječenje.

## 1.6.2 Farmakološko liječenje

Temeljni principi farmakološkog liječenja RA unatrag desetak godina radikalno su se izmijenili. Tradicionalni, tzv. piramidni, pristup podrazumijevao je započinjanje liječenja nesteroidnim protuupalnim lijekovima (NSAID od engl. non-steroidal anti-inflammatory drugs), dok su se lijekovi koji modificiraju bolest (DMARD od engl. disease modifying anti-rheumatic drugs) primjenjivali tek kad NSAIDs nisu doveli do značajnijeg poboljšanja.

Danas se zna, i to su pokazale mnogobrojne studije, da rana primjena DMARD značajno učinkovitije usporava progresiju bolesti (174). Postoji opća suglasnost da je liječenje s DMARD potrebno započeti što je prije moguće i održavati što duže (175). Mnogi od tih lijekova zahtijevaju pažljivo nadziranje bolesnika da bi se što ranije otkrile potencijalne nuspojave.

### 1.6.2.1 Nesteroidni antireumatici

NSAID su u pravilu prvi lijek kod pojave muskuloskeletnih simptoma, jer dovode do smanjenja boli i poboljšanja funkcije zglobova, a lako su dostupni. Nema dokaza da imaju učinak na tijek bolesti i česte su egzacerbacije simptoma nakon metaboličke eliminacije lijeka. U suvremenom pristupu liječenja RA, vrlo rijetko se primjenjuju izolirano bez dodatnog DMARD-a.

Glavni učinak NSAID temelji se na njihovoj sposobnosti da suprimiraju sintezu prostaglandina inhibicijom enzima ciklooksigenaze (COX). Danas se zna da COX postoji u dva izoformna oblika: COX-1 i COX-2. COX-1 je konstitucijski enzim u mnogim tkivima i primarno je odgovoran za produkciju prostaglandina vaskularnog endotela, trombocita i želučane sluznice te je time odgovoran za hemostazu i zaštitu sluznice želuca. Ekspresija COX-2 javlja se u pojedinim tkivima u toku upale. Koksibi su selektivni inhibitori COX-2 i danas se često upotrebljavaju u liječenju RA. Njihov analgetski i protupalni učinak sličan je klasičnim NSAID, dok je rizik ozbiljnih gastrointestinalnih nuspojava i utjecaj na vrijeme krvarenja značajno manji (176,177).

### 1.6.2.2 Kortikosteroidi

Kortikosteroidi su vrlo moćni protuupalni lijekovi koji dovode do brze i snažne supresije upale te značajnog poboljšanja općeg stanja bolesnika te brzog suzbijanja otoka i boli. Oni inhibiraju fosfolipazu A2 i selektivno ekspresiju COX-2. Randomizirane, dvostruko-slijepo, placebo kontrolirane studije pokazale su da je kod bolesnika s RA liječenih malom dozom prednizolona ( $\leq 7.5$  mg) tijekom dvije godine došlo do smanjenja progresije zglobnih erozija te stoga imaju potencijal modificiranja bolesti (178). U liječenju RA prednizolon (ili ekvivalent) se najčešće koristi u dozi 5-10 mg jednom dnevno; često na početku bolesti kao premosna terapija dok se čeka učinak DMARD (179,180). Kod teških kliničkih slika, a pogotovo kod zahvaćanja unutarnjih organa indicirane su i znatno više doze (do 1mg/kg). Intraartikularna primjena indicirana je kod monoartikularnog sinovitisa.

Nuspojave kortikosteroida su povezane s imunosupresijom i metaboličkim posljedicama te ograničavaju njihovu primjenu, pogotovo kada se primjenjuju u visokim dozama. Potrebno je periodično praćenje gustoće kosti (denzitometrija) kako bi se otkrila kortikosteroidima inducirana osteoporoza (158). Kao prevencija se preporučuje terapija kalcijem (1500 mg) i vitaminom D (400-800IJ) (181).

### 1.6.2.3 Lijekovi koji modificiraju bolest (DMARD)

To su lijekovi kojima je primarna uloga kontrola patofiziološkog procesa te dovode do usporavanja strukturnih oštećenja zgloba i poboljšavanja funkcijske sposobnosti bolesnika. Nemaju simptomatsko djelovanje, a njihov učinak nastupa nakon nekoliko tjedana ili mjeseci. Svi bolesnici s RA trebali bi primiti DMARD (182). Često njihova primjena ne uspijeva potpuno zaustaviti upalni proces. Potrebno je titrirati dozu, a često i mijenjati lijek. Primjenjuju se dok su djelotvorni ili dok nema nuspojava. S obzirom da je riječ o izrazito heterogenoj skupini lijekova moguće ih je i kombinirati. Iz ove skupine danas se najčešće primjenjuju metotreksat, sulfasalazin, antimalarici, leflunomid, ciklosporin i azatioprin. Soli zlata i penicilamin danas se znatno manje upotrebljavaju zbog sporog djelovanja i nuspojava.



Antimalarici (klorokin i hidoksiklorokin; CLQ) su često upotrebljavani lijekovi u blažim i srednje teškim oblicima bolesti i imaju relativno malo nuspojava. Najteža nuspojava je retinalna toksičnost zbog retinalnih depozita i to prvenstveno kod primjene klorokina. Hidoksiklorokin (CLQ) (200-400mg) se često kombinira s ostalim DMARD, a nema podataka da njegova samostalna primjena sprečava ili smanjuje radiološka oštećenja kod RA.

Metotreksat (MTX) je antagonist folne kiseline koji inhibira sintezu pirimidina i purina, a ima anticitotoksični i antiproliferativni učinak. Zbog svoje odlične učinkovitosti, dobre podnošljivosti, relativno male toksičnosti i povoljne cijene danas je vodeći DMARD. Više od 50% bolesnika uzima MTX više od 5 godina, što je dulje od bilo kojeg drugog DMARD (183). Učinkovita doza je 7.5-25 mg tjedno, a potrebno je naglasti da je upravo tjedna doza povezana s znatno manjom potencijalnom supresijom koštane srži. Klinički učinak pojavljuje se nakon nekoliko tjedana te je često potrebno povećavati dozu da bi bolest bila u potpunosti kontrolirana. MTX dokazano usporava radiološku progresiju bolesti (184). Tijekom primjene potrebno je redovito praćenje jetrenih i bubrežnih testova te krvne slike. Hepatotoksičnost je ovisna o dozi a može se prevenirati, kao i mijelosupresija, primjenom folne kiseline (185). Lijek treba izbjegavati kod bolesnika s bubrežnom insuficijencijom. Mučnina je relativno česta nuspojava a opisan je intersticijski pneumonitis uslijed terapije s MTX-om.

Sulfasalazin (SSZ) odnosno salazopirin (SZP) je konjugat salicilata i sufapiridinske molekule, a osim protuupalnog učinka kojeg ima zahvaljujući salicilatskoj komponenti, ima i dodatni imunomodulacijski učinak. Obično se primjenjuje u dozi od 2-3 mg dnevno. Primjenjuje se kod blažih oblika RA te kao dio kombinirane terapije (186). Najčešće nuspojave su gastrointestinalni simptomi i hematološke abnormalnosti (agranulocitoza, aplastična ili hemolitička anemija). Potrebno je i praćenje jetrenih testova.

Leflunomid ima imunomodulacijsko djelovanje. Njegov aktivirani metabolit inhibira sintezu pirimidina potrebnog za proliferaciju limfocita odgovornih za održavanje upalnog procesa u RA. Učinak mu je sličan MTX-u (187), a nakon početne doze od 100 mg dnevno tijekom 3 dana doza održavanja je 10-20 mg/dan. Nuspojave uključuju oštećenje jetre, alopeciju, stomatitis i toksični učinak na koštano srž.



Ciklosporin (CSA) inhibira stanični imuni odgovor T-stanica, a primjenjuje se kod refraktornih oblika bolesti, često zajedno s MTX-om (188). Nefrotoksičnost ograničava njegovu primjenu.

Citotoksični lijekovi kao azatioprin i ciklofosfamid uglavnom se primjenjuju kod bolesnika kod kojih uobičajeno liječenje nije bilo učinkovito. Aktivna komponenta azatioprina, 6-merkaptopurin, ima imunomodulirajuća svojstva, a najčešće nuspojave su hematološke. Ciklofosfamid ima svoje mjesto u liječenju reumatoidnog vaskulitisa ili teških ekstraartikularnih oblika bolesti. Najčešće se primjenjuje intermitentno intravenozno.

#### 1.6.2.4 Kombinirana terapija

S obzirom da monoterapija često ne dovodi do željene remisije, mogu se primjenjivati različite kombinacije DMARD koji imaju različite mehanizme djelovanja pa stoga i utječu na različite faze upalnog procesa. Na taj način različiti DMARD djeluju sinergistički te poboljšavaju učinkovitost. Postoje dileme da li započeti sa tzv. *step-up* pristupom dodavajući novi lijek bolesniku kod kojeg je monoterapija neučinkovita ili započeti sa kombiniranom terapijom u ranoj bolesti pa upotrijebiti tzv. *step-down* pristup ukidanjem pojedinog lijeka kada se postigne remisija (186). Ipak, najučinkovitijim se pokazao agresivni pristup liječenju koji kombinira DMARD od samog početka bolesti (189).

Najčešći lijek u kombinacijama je MTX. Prva terapija koja kombinira MTX bila je ona s CSA (188). Kasnije su provedene studije koje kombiniraju MTX + SZP i MTX + HCQ, a najčešća kombinacija je MTX+SZP+CLQ koja se pokazala i najdjelotvornijom (190). Veliki broj radova analizira različite kombinacije i gotovo sve mogućnosti su dozvoljene (189,191,192).

Od posebnog interesa je i primjena kombinirane terapije kod ranog artritisa te se očekuje da će dodatne studije prepoznati najbolju terapijsku strategiju liječenja koje će prevenirati oštećenje zglobova (191,193). Recentno istraživanje finske grupe autora pokazalo je da bolesnici s ranim RA koji su primali MTX+ SSZ+ HCQ + mala doza prednizolona postižu značajno češću i bržu remisiju nego oni koji su primali SSZ, sam ili u kombinaciji sa prednizolonom (194). Isto istraživanje ukazuje da je kod tih bolesnika znatno poboljšana radna sposobnost.

### 1.6.2.5 Biološka terapija

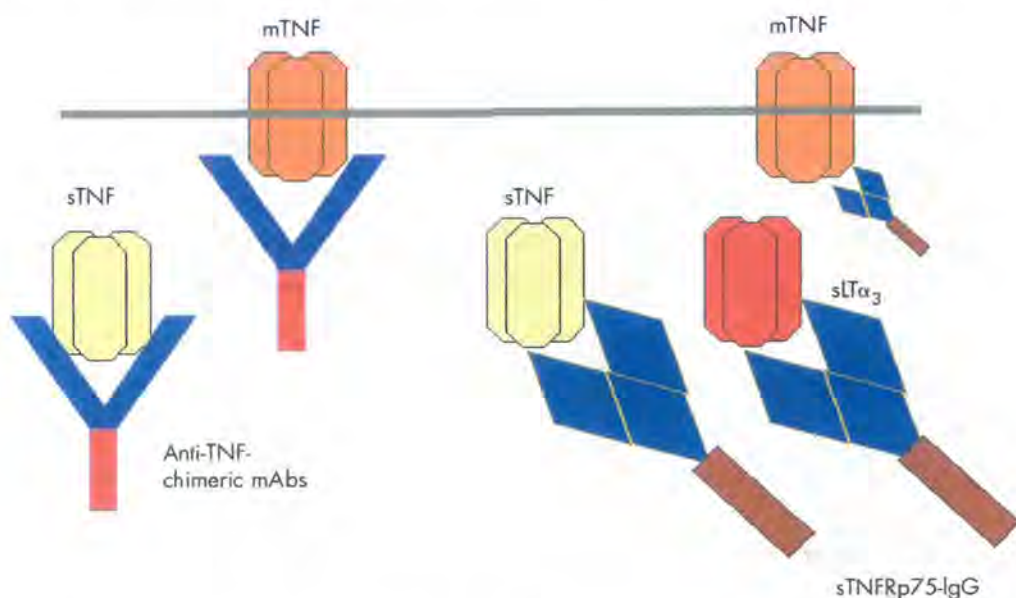
Napredak u temeljnim istraživanjima i biotehnologiji doveo je do boljeg razumijevanja patogeneze RA, tako da danas imamo cijelu novu skupinu lijekova koje nazivamo biološkom terapijom (BRM od engl. biological response modifiers). Radi se o rekombinantnim proteinima koji se vežu na specifične molekule koje sudjeluju u imunološkom i upalnom procesu. Ta skupina obuhvaća monoklonska protutijela (mAbs od engl. monoclonal antibodies), rekombinantne citokine i inhibitore citokina te fuzijske proteine solubilnih receptora.

#### 1.6.2.5.1 Lijekovi koji inhibiraju TNF $\alpha$

TNF $\alpha$  je ključni citokin u pokretanju upalnog procesa u RA te su mnogi eksperimentalni modeli dokazali da monoklonska protutijela koja se vežu na TNF $\alpha$  neutraliziraju ne samo njegovo djelovanje nego i produkciju IL-1, IL-6, IL-8 te GM-CSF i VEGF (56,69,195,196). Nakon što je u animalnim modelima artritisa došlo do značajnog smanjenja upale i destrukcije zglobova i boljeg razumijevanja isprepletene citokinske mreže, počeli su se proizvoditi rekombinantni pripravci koji su usmjereni na TNF $\alpha$ , namijenjeni liječenju RA u ljudi. Primjena monoklonskog protutijela na TNF $\alpha$  (anti-TNF $\alpha$ ) u bolesnika s RA dovela je do kliničkog poboljšanja, neutralizacije solubilnog i membranskog oblika TNF $\alpha$  uz značajno smanjenje drugih proupalnih citokina (najuočljivije je smanjenje serumske koncentracije IL-6) te do smanjenja ekspresije adhezijskih molekula i kemokina. Biopitički materijali sinovijskog tkiva pokazali su redukciju angiogeneze. Upravo su to i mehanizmi na kojima se temelji klinički učinak anti-TNF $\alpha$  terapije (197,198,199,200,201).

Etanercept je prvi genetički dobiven biološki pripravak ciljano namijenjen vezanju na TNF $\alpha$  u svrhu liječenja RA. Ta proteinska molekula sadrži dva humana solubilna receptora p75 TNF vezana na fragment Fc humanog IgG1 te tako inhibira i neutralizira djelovanje cirkulirajuće molekule TNF $\alpha$ , a

može se, doduše vrlo slabo, vezati i na membranski oblik TNF $\alpha$  (slika 2). Placebo-kontrolirane, dvostruko-slijepo, randomizirane kliničke studije pokazale su dobru učinkovitost tog lijeka na aktivnost bolesti i progresiju oštećenja zglobova (202,203). Preporučena doza za odrasle je 25 mg subkutano dva puta tjedno, a primjenjuje se i kod djece. Etanercept se pokazao učinkovitiji od MTX-a u brzini postizanja kliničkog učinka i usporejnu radioloških promjena bolesnika s ranim aktivnim RA (204). Najčešća nuspojava etanercepta je kožna reakcija na mjestu ubrizgavanja u vidu eritematozne papule. Kod liječenja ovim pripravkom opisana je i povišena incidencija limfoproliferativnih zloćudnih bolesti (205). Međutim, potrebno je naglasiti da se u toj skupini bolesnika s teškim RA liječenim imunosupresivima i inače javlja veća učestalost limfoproliferativnih malignoma. Praćenjem bolesnika tijekom dvije godine nije se ustanovila veća učestalost infekcija. U kliničkoj praksi lijek se primjenjuje kod srednjih do teških oblika bolesti, sam ili u kombinaciji s MTX-om.



Slika 2: Način djelovanja infliksimaba (anti-TNF-chimeric mAbs) i etanercepta (sTNFRp75-IgG)

Preuzeto iz: Ehlers S. Role of tumour necrosis factor (TNF) in host defence against tuberculosis: implications for immunotherapies targeting TNF. *Ann Rheum Dis* 2003; 62 (suppl III):ii37-ii42.

Infliksimab je kimeričko (humano/mišje) monoklonsko protutijelo, anti-TNF $\alpha$  koje se primjenjuje intravenski. Ono se veže za ljudski TNF $\alpha$  s visokim afinitetom i specifičnošću te neutralizira njegovu biološku aktivnost. Veže se, kao i etanercept, i za membranski i za sekretorni

oblik TNF $\alpha$ , s razlikom što je infliksimab brži u "prikapčanju" na TNF $\alpha$ . Za razliku od etanercepta on ima puno jači afinitet za molekulu TNF $\alpha$  koja je već vezana na TNF receptor i može je istisnuti. Od etanercepta ga također razlikuje i to što se ne veže za LT $\alpha$  (poznat i kao TNF $\beta$ ). Upravo ta njegova specifičnost smanjuje mogućnost neželjenih nespecifičnih učinaka (slika 2) (207,208). Monoterapije (1-10 mg/kg tjelesne mase) su pokazale dobre, ali samo prolazne rezultate. Kliničko poboljšanje trajalo je oko 4 tjedna, nakon terapije s 1 mg/kg, a 12 tjedana nakon terapije s 10 mg/kg (198,199). U kasnijem tijeku različite studije procjenivale su uspješnost i neškodljivost različitih doza infliksimaba s terapijom MTX-om ili bez nje, u različitim vremenskim intervalima (200,201,205-211). Terapija sa samim infliksimabom, kao i ona u kombinaciji s MTX-om u svim kliničkim istraživanjima pokazala je znatno veću djelotvornost nego placebo ili sam MTX (201,205-211). Bolesnici koji su primali infliksimab bez MTX-a imali su znatno promjenjiviji odgovor. Smatra se da je bolji klinički odgovor bolesnika koji primaju infliksimab s MTX-om rezultat stabilnije serumske koncentracije infliksimaba kod ponavljanih davanja, jer MTX značajno smanjuje formiranje protutijela na murinske djelove molekule (201). Preporuka je da se infliksimab primjenjuje uvijek uz MTX, a najčešće u dozi 3 mg/kg svakih 8 tjedana iako ima i drugih modaliteta (209). Osim dobre učinkovitosti na upalu i oštećenje zglobova, oba pripravka su pokazala odličan učinak na umor i malaksalost te znatan doprinos poboljšanju kvalitete života bolesnika s RA (205,209).

Infliksimab i etanercept mogu inducirati pojavu antinuklearnih protutijela koja je učestalija nakon ponavljanih primjena lijeka (200,206,212,213). U pojedinim slučajevima javila su se i protutijela na anti-ds-DNA, te je u nekoliko prikaza slučaja opisana pojava kliničke slike lupusa izazvanog lijekom (200,209,213-220), no neki su slučajevi diskutabilni (215,216). Od težih nuspojava ovih lijekova opisane su reaktivacija tuberkuloze i akutne demijelinizacije u CNS-u (205,220). Oba lijeka odobrena su za primjenu u SAD i većini europskih zemalja, a glavno ograničenje u primjeni je njegova cijena.

Nedavno je za primjenu odobreno i potpuno humano protutijelo na TNF $\alpha$  pod imenom adalimumab. Podjednako je djelotvoran sam i u kombinaciji s MTX-om, a primjenjuje se intravenski. Dobro se podnosi, a nuspojave su mu slične kao i ostalim lijekovima iz ove skupine (205,221).



#### 1.6.2.5.2 Lijekovi koji inhibiraju djelovanje interleukina 1

S obzirom na proupalni učinak IL-1 i njegovu ulogu u nastanku erozija inhibitori djelovanja IL-1 također se primjenjuju u liječenju RA. Budući da se u bolesnika s RA, na mjestu upale u sinovijskom tkivu, antagonist IL-1 receptora stvara u nedovoljnim količinama, ideja je bila rekombinantnim tehnikama proizvesti taj receptor. Tako je dobiven rekombinantni humani antagonist receptora interleukina 1 (IL-1ra): anakinra (222). U kontroliranim kliničkim ispitivanjima pokazao je dobar protupalni i minimalan antierozivan učinak a moguće nuspojave su neutropenija i posljedične infekcije (223,224).

#### 1.6.2.5.3 Ostali biološki lijekovi

S obzirom na spoznaju da su i drugi citokini uključeni u imunopatogenezu RA, razni protucitokinski biološki preparati su predmet istraživanja u liječenju RA. U tijeku su klinička ispitivanja učinkovitosti i neškodljivosti monoklonskog protutijela koje se veže na IL-6 (225).

Uzimajući u obzir saznanja o potencijalnom protuupalnom učinku citokina Th2 skupine, pokušana je primjena rekombinantnog IL-10 u liječenju RA. Međutim ona nije dovela do značajnijeg poboljšanja kod bolesnika s RA. U tijeku je kliničko ispitivanje faze II u kojem se ispituje klinički učinak rekombinantnog IL-11 (226).

Nadalje, nova terapijska stremljenja u liječenju RA usmjerena su na limfocite B. Rituksimab je monoklonsko protutijelo usmjereno na površinski biljeg CD20 limfocita B koje se primjenjuje u liječenju B-staničnih limfoma. Isti lijek u kombinaciji sa ciklofosamidom pokazao je dobar učinak u liječenju aktivnog, na terapiju refraktornog, RA (227). Klinička ispitivanjima faze II koja su uspoređivala učinak MTX-a s rituksimabom, rituksimabom i MTX-om te rituksimabom i

ciklofosfamidom pokazala su dobar učinak rituksimaba i odličan učinak kombinacija rituksimaba s MTX-om i ciklofosfamidom (225).

Recentna istraživanja usmjerena su i na inhibiciju aktivacije T-stanica u svrhu liječenja RA. CTLA4 imunoglobulin je konstruiran s ciljem vezanja na B7 molekule i samim time inhibiranja aktivacije T-stanica preko liganda CD28. U tijeku su klinička istraživanja faze III u kojima se primjenjuje taj pripravak u kombinaciji s MTX-om kod bolesnika kod kojih se anti-TNF $\alpha$  terapija pokazala neučinkovitom (228).

To su samo neki od mnogobrojnih primjera budućih terapijskih mogućnosti RA, usmjerenih na različite razine kompliciranog i još uvijek nepotpuno razjašnjenog imunopatogenetskog mehanizma ove bolesti (225).

### 1.6.3 Kirurško liječenje

Unatrag dvadesetak godina ortopedski zahvati značajno su unaprijeđeni što je znatno poboljšalo kvalitetu života mnogih bolesnika s RA. Postoje dvije glavne indikacije za ortopedske zahvate. Prve se odnose na rješavanje ireverzibilnih oštećenja i specifične komplikacije bolesti a uključuju endoprotetske zahvate. Endoproteze se najčešće ugrađuju na velikim zglobovima (kuk, koljeno). Druga kategorija indikacija odnosi se na profilaktičku kirurgiju kojom se sprečava razvoj deformiteta i gubitak funkcije zgloba. Tu, u prvom redu, spada sinovijektomija koja se najčešće primjenjuje na malim zglobovima šaka gdje su fleksorne tetive često zahvaćene patološkim procesom. S obzirom na kompleksnost reumatskih poremećaja, uspjeh kirurškog liječenja značajno ovisi o kordinaciji rada između različitih liječnika specijalista, zdravstvenog osoblja i samog bolesnika (229).



## 2 CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. procijeniti djelotvornost liječenja RA monoklonskim protutijelom anti-TNF $\alpha$  (infliksimabom) i MTX-om na temelju objektivnih kliničkih i laboratorijskih pokazatelja
2. procijeniti kretanje proupalnih (TNFR, IL-6) i protuupalnih citokina (IL-10) tijekom terapije infliksimabom i MTX-om u razdoblju od 62 tjedna od početka liječenja te korelirati njihove vrijednosti sa kliničkim varijablama
3. odrediti učestalost javljanja antinuklearnih protutijela (ANA), anti-ds-DNA, ENA i antikardiolipinskih (ACL) protutijela u bolesnika koji su liječeni infliksimabom i MTX-om te procijenti njihovo kliničko značenje
4. usporediti učestalost javljanja ANA i anti-ds-DNA protutijela u bolesnika liječenih infliksimabom i MTX-om s učestalošću javljanja istih protutijela kod RA bolesnika liječenih SZP-om, MTX-om te onih koji su liječeni kombinacijom SZP-a i MTX-a
5. procijeniti neškodljivost pojedinačnih i ponavljanih doza infliksimaba uz tjednu terapiju MTX-om praćenjem infuzijskih reakcija tijekom aplikacije lijeka te mogućih ranih i kasnih nuspojava
6. usporediti nuspojave u bolesnika liječenih infliksimabom i MTX-om s nuspojavama u bolesnika liječenih SZP-om, MTX-om te onih koji su liječeni kombinacijom SZP-a i MTX-a

7. analizirati učinkovitost terapije anti-TNF $\alpha$  i učestalost javljanja ANA i anti-ds-DNA protutijela u odnosu na pojedine biljege HLA sustava (DR 1 i /ili DR4; B8DR3) u toj skupini bolesnika

### 3 ISPITANICI i METODE

#### 3.1 Ispitanici

##### 3.1.1 Bolesnici

U kliničko istraživanje su uključena 24 bolesnika s RA kod kojih je bila prisutna upalna aktivnost unatoč terapije MTX-om te su podvrgnuti liječenju monoklonskim protutijelom na TNF $\alpha$  (infliksimab). Uključivanje bolesnika je započelo u svibnju 2001., a trajalo je do siječnja 2003. Sve smo bolesnike pratili 62 tjedna, tj. zaključno do ožujka 2004. Bolesnici su se liječili na Odjelu za kliničku imunologiju i reumatologiju Klinike za unutarnje bolesti Kliničkog bolničkog centra (KBC) u Rijeci, te na Zavodu za kliničku imunologiju i reumatologiju Klinike za unutarnje bolesti KBC u Zagrebu.

Kriteriji za uključivanje bolesnika bili su:

- a) dob između 18 i 75 godina
- b) dijagnoza RA postavljena po kriterijima ACR prije najmanje 6 mjeseci  
(ranije poznatog kao ARA, od engl. American Rheumatology Association)
- c) prisutna aktivnost bolesti unatoč terapiji MTX-om u dozi od najmanje 7,5 mg tjedno tijekom najmanje dva mjeseca
- d) uzimanje folne kiseline u dozi 5 mg dnevno, najmanje 4 tjedna prije početka primjene infliksimaba

Aktivnost bolesti bila je prisutna ako je bilo otečeno ili osjetljivo 6 ili više zglobova + dva od sljedećih kriterija: 1) jutarnja zakačenost duža od 45 min; 2) CRP veći od 20 mg/l; 3) SE veća od 28 mm/h.

Bolesnici koji su uzimali NSAID i kortikosteroide morali su biti na stabilnoj dozi najmanje 4 tjedna prije početka liječenja infliksimabom i nastavljali su uzimati istu dozu tih lijekova. Bolesnice u reproduktivnoj dobi obvezale su se na zaštitu od trudnoće. Svi bolesnici bili su detaljno upoznati s lijekom i načinom provođenja istraživanja te su, s obzirom da ovaj lijek u Republici Hrvatskoj još nije

odobren za liječenje RA od strane Hrvatskog zavoda za zdravstveno osiguranje, potpisali informirani pristanak prije započinjanja liječenja infliksimabom.

U ispitivanje nisu smjeli biti uključeni bolesnici s RA koji su uzimali druge DMARDs izuzev MTX-a najmanje 4 tjedna prije započinjanja liječenja infliksimabom. Također, trudnicama i onima koje planiraju trudnoću, bolesnicima s RA koji su potpuno nesposobni samostalno se brinuti o sebi te onima s drugim upalnim reumatskim bolestima nije bilo dozvoljeno uključivanje u ovakav način liječenja. Nadalje, bolesnici koji su imali bilo kakvu težu (hepatitis, pijelonefritis, upala pluća) ili oportunističku infekciju posljednja tri mjeseca te oni sa znacima teške ili progresivne bubrežne, srčane, jetrene (uključujući alkoholnu bolest jetre ili drugu kroničnu jetrenu bolest), plućne, endokrine, hematološke ili neurološke bolesti nisu smjeli primati infliksimab. Prisutnost maligne bolesti ili podatak o njoj unatrag pet godina, kao i poznata alergija na murine proteine te ranija izloženost lijekovima koji djeluju na TNF $\alpha$ , također su onemogućavali uključivanje u liječenje infliksimabom.

Bilo je predviđeno da svaki bolesnik primi infliksimab 9 puta i to u dozi od 3 mg/kg intravenski te da nastavlja s tjednim uzimanjem MTX. Aplikacije su predviđene u nultom, 2., 6., 14., 22., 30., 38., 46. i 54. tjednu, a praćenje bolesnika do 62 tjedna.

Svi bolesnici uključeni u studiju zadovoljili su navedene kriterije. To su bolesnici koji imaju najteži oblik RA i kod kojih niti jedan od standardnih DMARDs, uključujući i MTX, nije doveo do smanjenja upalne aktivnosti i remisije bolesti.

Od ukupno 24 bolesnika, 18 (75%) ih je bilo ženskog, a 6 (25%) muškog spola.

Dobni raspon kretao se od 20 do 70 godina. Prosječna dob bila je (srednja vrijednost  $\pm$  SD =)  $45 \pm 13$  godina; medijan: 50 g., donja kvartila 34 g., gornja kvartila 54 g.

Svi bolesnici nastavili su uzimati MTX jednom tjedno. Prosječna tjedna srednja doza MTX-a iznosila je  $10,72 \pm 3,25$  mg, u rasponu od 7,5-17,5 mg. Dva bolesnika nisu uzimala kortikosteridnu terapiju, a ostali su uzimali prednizolon (ili ekvivalent) u dozi od 5-20 mg dnevno. Srednja dnevna doza prednizolona iznosila je  $10,47 \pm 5,26$  mg u rasponu od 0-20 mg.

### 3.1.2 Usporedne skupine

Zbog procjene učestalosti javljanja protutijela tijekom terapije formirane su usporedne skupine bolesnika s RA, koji se liječe drugim temeljnim antireumatikom (DMARDs) i to:

- a) sulfasalazinom
- b) metotreksatom
- c) sulfasalazinom i metotreksatom

Te skupine obuhvaćaju bolesnike s postavljenom dijagnozom RA unatrag najmanje 3 mjeseca kod kojih se prvi put započinje jednim od gore navedenih načina liječenja i bolesnike koji su već ranije liječeni s DMARDs a sada se uvodi novi lijek (ili lijekovi). Ti bolesnici bili su randomizirani, a randomizacija je započela 1.svibnja 2001. U svaku usporednu skupinu uključeno je 23 bolesnika slične prosječne životne dobi, zastupljenosti po spolu i dužine trajanja bolesti. Kod bolesnika u kontrolnim skupinama prvenstveno nas je zanimala pojava induciranih protutijela i moguće nuspojave liječenja, a bili su praćeni tijekom 62 tjedna kao i skupina bolesnika koja je primala infliksimab.

## 3.2 Metode

### 3.2.1 Primjena infliksimaba

Infliksimab je kimeričko (humano/mišje) IgG protutijelo usmjereno na TNF $\alpha$ . Proizvedeno je u laboratorijima Centrocor B.V. pod imenom Remicade, a u Europi ga distribuira farmaceutska tvrtka Schering Plough koja ga je našim bolesnicima i besplatno osigurala. Primjenjuje se intravenski. Tvornička ampula od 20 ml sadrži 100 mg liofiliziranog infliksimaba, 0,5 grama sukroze, 6,1 mg dibazičnog natrijevog fosfat dihidrata, 2,2 monobazičnog natrijevog fosfata monohidrata i 0,5 mg polisorbata 80, a priprema se s 10 ml sterilne vode. Remicade se čuva na temperaturi od 2°C do 8°C zaštićen od svjetla. Priprema se tako da se liofilizirani sadržaj otopi u sterilnoj vodi unutar 5 minuta

opreznim rotiranjem ampule. Pripremljeni Remicade primjenjivao se odmah i to u fiziološkoj otopini ukupnog volumena 250 ml.

Za primjenu infliksimaba koristio se ne-DEHP (od engl. di-[2-etilhexyl]phthalate) 1,2 (ili manji) mikronski filter uz strogo poštivanje aseptičkih mjera. Primjena lijeka (infuzije) odvijala se najmanje 2 sata, a promatranje bolesnika najmanje 1h nakon aplikacije.

### 3.2.2 Metode praćenja djelotvornosti liječenja infliksimabom i metotreksatom

#### 3.2.2.1 Metode praćenja aktivnosti bolesti

- 1) određivanje broja bolnih/osjetljivih zglobova od ukupno 66 zglobova
- 2) određivanje broja otečenih zglobova od ukupno 66 zglobova
- 3) trajanje jutarnje zakočenosti u minutama
- 4) liječnikova procjena težine bolesti metodom vizualne analogne skale (VAS) 100 mm (na dužini od 100 mm početna točka označava jako dobro, a završna jako loše stanje bolesti)
- 5) bolesnikova procjena težine bolesti metodom VAS 100 mm (na dužini od 100 mm početna točka označava jako dobro, a završna jako loše)
- 6) bolesnikova procjena boli metodom VAS 100 mm (na dužini od 100 mm početna točka označava da nema boli a završna ozbiljnu bol)
- 7) procjena funkcionalnih sposobnosti bolesnika s RA na temelju modificiranog upitnika HAQ (od engl. health assessment questionnaire) (Tablica 3) (230)
- 8) sedimentacija eritrocita (SE) po Westergrenu, zatvoreni sustav Seditainer, Becton, Dickinson and Co., SAD
- 9) C-reaktivni protein (CRP) - imunoturbidimetrijska metoda na automatskom analizatoru Olympus AU640, Olympus diagnostica GmbH, Irska. Koncentracija CRP-a izražena je u mg/l.



Tablica 3: Modificirani upitnik za procjenu funkcionalnih sposobnosti kod bolesnika s RA (bez poteškoća=0, s malo poteškoća=1, s puno poteškoća=2, nisam sposoban=3)

Trenutačno sam sposoban:	BEZ POTEŠKOĆA	S MALO POTEŠKOĆA	S PUNO POTEŠKOĆA	NISAM SPOSOBAN
Samostalno se obući, zakopčati, zavezati vezice				
Samostalno ustati iz kreveta				
Podignuti punu šalicu k ustima				
Šetati vani na ravnom terenu				
Oprati se u potpunosti				
Sagnuti se da bih podigao stvar s poda				
Otvoriti i zatvoriti slavinu				
Ući i izaći iz automobila				

Sve navedeno određivali smo prije početka liječenja te u 2., 6., 30., 46., i 62. tjednu, a SE i CRP također i u tjednima 14., 22., 38. i 54. tjednu. Serum i su analizirani odmah.

10) određivanje indeksa ACR 20/50/70 (od engl. American College of Rheumatology Index)

gdje brojevi 20, 50 i 70 označavaju poboljšanje izraženo u postotku ( 208, 212, 231).

ACR-indeks izračunava se na temelju gore navedenih metoda na taj način da je za ACR 20 (20% poboljšanje) potrebno smanjenje broja bolnih i broja otečenih zglobova za najmanje 20% u odnosu na početne vrijednosti, te 20% poboljšanje najmanje tri parametra od slijedećih: a) SE, b) CRP, c) liječnikova procjena stanja bolesti (VAS), d) bolesnikova procjena stanja bolesti (VAS), e) bolesnikova procjena boli (VAS), i f) funkcionalne sposobnosti bolesnika (modificirani HAQ). Na isti način izračunavalo se 50% i 70% poboljšanje. ACR-indeks izračunavan je u tjednima 2, 6, 30 i 62.

### 3.2.2.2 Metode određivanja citokina i citokinskih receptora

U nultom, 2., 4., 6., 14., 30., 54, i 62. tjednu određivali smo sljedeće citokine i citokinske receptore:

- 1) IL-6
- 2) IL-10
- 3) solubilni receptor za TNF $\alpha$  (sTNFR)

Navedene citokine određivali smo heterogenom enzimimunokemijskom metodom na mikrotitarskoj pločici, na automatiziranom sustavu ELISA Mini BOS, Biomedicine GmbH, Graz, Austrija s reagensijama Quantikine immunoassay, R&D System INC. SAD.

Serumi su se pohranjivali smrzavanjem na  $-70^{\circ}$  i analizirali u roku od 9 mjeseci. Testovi su izvođeni po strogim uputama proizvođača. Uzorak seruma stavljali smo zajedno s puferom u jažice mikrotitarske pločice, koje su bile obložene protutijelom specifičnim za pojedini citokin (IL-6 ili IL-10 ili sTNFR). Nakon inkubacije i ispiranja u jažice smo dodavali peroksidazom obilježeno poliklonsko protutijelo prema drugom epitopu pojedinog citokina. Tijekom inkubacije stvarao se "sendvič" kompleks od dva protutijela i citokina eventualno prisutnog u ispitivanom uzorku. Nevezani materijal smo uklanjali ispiranjem. U sljedećoj fazi reakcije dodavali smo kromogeni supstrat (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine TMB) kojim se razvija boja čiji intenzitet je upravo proporcionalan koncentraciji određivanog citokina.

Referentna vrijednost za IL-6 je, po proizvođaču, od 3,13-12,5 pg/ml, a donja granica osjetljivosti je 0,7 pg/ml.

Referentna vrijednost za IL-10 je do 7,8 pg/ml, a donja granica osjetljivosti 1,9 pg/ml.

Za sTNFR referentne vrijednosti su 749-1966 pg/ml, a donja granica osjetljivosti 3,0 pg/ml.

### 3.2.2.3 Metode praćenja neškodljivosti primjene infliksimaba s metotreksatom

Tijekom aplikacije infliksimaba koja je trajala najmanje 2 sata, pratili su se vitalni parametri : tjelesna temperatura, krvni tlak i puls, i to na samom početku primjene lijeka, te nadalje svakih 30 minuta do zaključno 1 sat nakon završetka infuzije, u slučaju da nije bilo značajnijih odstupanja.

Značajnom promjenom tjelesne temperature smatrala se razlika veća od  $0,5^{\circ}\text{C}$  u odnosu na početnu tjelesnu temperaturu. Značajnom razlikom krvnog tlaka smatrala se razlika  $> 15$  mm Hg , a značajnom razlikom pulsa, razlika  $> 10$  otkucaja u minuti.

Bolesnici su promatrani u smislu eventualnih alergijskih reakcija (fizikalni pregled) u tijeku primjene lijeka i jedan sat nakon isteka terapije. Također, bili su upozoreni da svaku moguću nuspojavu (alergijsku reakciju, kožne promjene, gastrointestinalne smetnje, porast tjelesne temperature ili drugi znak infekcije) odmah prijave ispitivaču.

U skupini bolesnika liječenih infliksimabom prije svake terapije analizirali su se broj eritrocita, leukocita, trombocita, leukogram, hemoglobin i hematokrit te AST, ALT,  $\gamma$ GT, ALP. U usporednim skupinama isti laboratorijski testovi primjenjivani su u tjednima 0, 6, 22, 38, 54 i 62.

Vrijednosti hemoglobina i hematokrita određivane se na automatskom hematološkom analizatoru cijanmethemoglobin-kalorimetrijskom metodom (Bayer Technicon H-3 RTC, Bayer Diagnostics GmbH, München, Njemačka). Normalne vrijednosti hemoglobina za muškarca su 140-180g/L, a za ženu 120-160g/L. Na istom hematološkom analizatoru određivali smo broj eritrocita, leukocita i trombocita.

Vrijednosti ALT, AST,  $\gamma$ GT, ALP, određivale su se na automatskom analizatoru (Olympus AU 640, Tokio, Japan). Enzimi AST i ALT određivali su se optimiziranom UV metodom, bez piridoksalfosfata, za AST uz pH 7,8, a za ALT uz pH 7,3. Vrijednosti  $\gamma$ GT-a su određivane po Satzu uz  $\gamma$ -glutamil-karboksi-p-nitroanilid te glicilglicin na pH 8,2, a vrijednosti ALP po metodi *International Federation Clinical Chemistry*, uz p-nitrofenilfosfat i amino-metilpropanolol pri pH 10,4. Normalne serumske vrijednosti za ALT su do 37 U/L; AST do 37 U/L;  $\gamma$ GT-a do 49 U/L; ALP do 104 U/L. Hepatotoksičnost smo definirali najmanje trostrukim uvećanjem barem jednog od navedenih enzima (232).

### 3.2.3 Metode procjene učestalosti javljanja protutijela

U bolesnika koji su liječeni infliksimabom i metotreksatom određivali smo ANA (antinuklearna protutijela), anti-ds-DNA (protutijela na dvostruke uzvojnice DNA), ENA (protutijela na ekstraktibilni nuklearni antigen) i ACLA (antikardiolipinska protutijela) u nultom, 2., 4., 6., 14., 22., 30., 38., 46., 54. i 62. tjednu, a u bolesnika usporednih skupina koji su liječeni drugim DMARD

ista protutijela određivali smo u tjednima 0, 6, 22, 38, 54 i 62. Pojedini uzorci seruma analizirani su odmah a pojedini su se smrzavali na  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  i analizirali u roku od 30 dana.

1) antinuklearna protutijela (ANA) određivali smo metodom indirektno imunofluorescencije a kao tkivni test antigen upotrebljavali smo jetru štakora; kao fluorokrom koristili smo fluorescein izotiocijanat (FITC) proizvođača The Binding Site Limited, Birmingham, UK. Metodu smo izvodili tako da smo tkivo jetre štakora rezali na debljinu 4-6 mikrona, zatim sušili na sobnoj temperaturi 20 minuta, a potom preljevali serumom i fosfatnim puferom (PBS) pH 7,2 u razrjedenju 1:10. Nakon što je preparat razmazan na stakalcu odstojao u vlažnoj komori pola sata, isprali smo ga u fosfatnom puferu 20 minuta a potom nakapali s razrijeđenim polivalentnim konjugatom (FITC). Nakon što je odstajao daljnih pola sata, ponovno smo ga isprali a zatim gledali pod fluorescentnim mikroskopom. Ako je fluorescencija pozitivna, postupak se ponavlja tako da se serum razrjeđuje do najvećeg titra. U našem istraživanju titar ANA veći od 1:20 smatrali smo pozitivnim.

2) anti-ds-DNA određivali smo heterogenom enzimimunokemijskom metodom na mikrotitarskoj pločici na automatiziranom sustavu ELISA Mini BOS, Biomedicine GmbH Graz, Austrija s reagensima Hycor Biomedicine Inc. USA, gdje su antigeni vezani na čvrstu fazu, a sekundarna protutijela obilježena peroksidazom. Serumi ispitanika inkubirani su u jažicama mikrotitarske ploče na čije dno su vezane visoko pročišćene molekule DNA. Nakon inkubacije ispiranjem je uklonjen višak protutijela i serum ispitanika, a nastali kompleksi antigen-protutijelo inkubirani su sekundarnim protutijelom obilježenim peroksidazom. Ispiranjem je uklonjen višak obilježenog protutijela i učinjena je inkubacija supstratom enzima peroksidaze (tetra-metil-benzidin). U prisustvu imunokompleksa obilježenih peroksidazom, djelovanjem enzima bezbojni supstrat pretvara se u plavo obojeni produkt, a dodatkom sumporne kiseline prekida se enzimska reakcija i boja otopine prelazi u žutu. Intenzitet nastale boje mjeri se fotometrijski dvostrukom zrakom (450 i 600 nm), a proporcionalna je koncentraciji protutijela na dvostruku uzvojnici DNA u serumu ispitanika. Referentne vrijednosti: negativno  $<40\text{ U/ml}$ , suspektno od 40 do 60 U/ml, pozitivno  $>60\text{ U/ml}$ .

3) ENA smo također određivali heterogenom enzimimunokemijskom metodom na mikrotitarskoj pločici, automatizirani sustav ELISA Mini BOS, Biomedicine GmbH Graz, Austrija; reagensi Hycor Biomedicine Inc.USA. Postupak je bio identičan kao i kod određivanja anti-ds-DNA samo što su jažice prekrivene smjesom šest visoko pročišćenih ekstraktibilnih antigena jezgre: SS-A/Ro, SS-B/La, Sm, Sm/RNP, Scl-70 i Jo-1. Referentne vrijednosti: negativno < 10 U/ml

4) antikardiolipinska protutijela (ACL) smo određivali heterogenom enzimimunokemijskom metodom na mikrotitarskoj pločici, automatizirani sustav ELISA Mini BOS, Biomedicine GmbH Graz, Austrija, reagensi Hycor Biomedicine Inc.USA. Postupak je također bio identičan, samo što su jažice prekrivene visoko pročišćenim molekulama kardiolipina izoliranog iz govedeg srca. Referentne vrijednosti: negativno < 16 U/ml

### 3.2.4 Metode dokazivanja HLA-antigena

Serološka tipizacija HLA-antigena izvršena je u Zavodu za transfuzijsku medicinu KBC Rijeka. Navedena pretraga vrši se tako da se iz 20 ml heparinizirane venske krvi izdvoje limfociti na "Ficoll-Hypaque" gradijentu metodom po Boyumu. Iz dobivenih limfocita, koristeći karakteristiku T-limfocita da stvaraju rozete s ovčjim eritrocitima, separiraju se limfociti T i B. Limfociti T koji stvaraju rozete odvajaju se od limfocita B na "Ficoll-Metrizoat" gradijentu, a ovčji eritrociti se hemoliziraju s 0,9% amonijevim kloridom. Limfociti T i B suspendiraju se u Hanksovom mediju. Antigeni HLA-A i B dokazuju se na T-limfocitima, a HLA-DR i DQ na B-limfocitima klasičnim mikrolimfocitotoksičnim testom na Terasakijevim mikro-pločicama koje su prethodno nakapane specifičnim serumima i pohranjene do upotrebe u zamrzivaču na -30 °C. Pri određivanju antigena HLA-A i B, suspenzija T- limfocita nakapa se na Terasakijeve mikro-ploče i inkubira 30 minuta na sobnoj temperaturi. Kad se na limfocitima nalazi odgovarajući antigen na njega se vežu protutijela. Nakon dodavanja zečjeg komplementa i inkubacije od 60 minuta, vezana protutijela aktiviraju kaskadu komplementa te dolazi do oštećenja membrane limfocita. Stanice se boje tripan plavom



bojom i odmah se vrši očitovanje. Trajniji preparat postiže se bojanjem eozinom i fiksacijom u formaldehidu. HLA-DR i DQ antigene dokazujemo na isti način. Test se vrši na B-limfocitima, ali je vrijeme inkubacije različito. B-limfociti i serum inkubiraju se 60 minuta, a inkubacija s komplementom traje 120 minuta. Bojenje preparata vrši se na isti način kao u testiranju HLA-A i B antigena. Rezultat se očitava na inverznom mikroskopu.

### 3.2.5 Statističke metode

Za statističku obradu podataka korišten je programski paket *Statistica 6.1*, proizvođača *StatSoft Inc, USA* (licenca MZT RH).

Za usporedbu numeričkih varijabli prema određenim kategorijama korišten je parametrijski test analize varijanci, ANOVA. U slučajevima kada varijable nisu normalno raspodijeljene korištena je neparametrijska alternativa, Kruskal-Wallis test medijana. Kod obje analize razlike srednjih vrijednosti, odnosno medijana, smatraju se statistički značajnim ako je  $p < 0,05$ . Kod usporedbe vrijednosti zavisnih varijabli mjerenih na bolesnicima tijekom terapijskog postupka primjenjivana je analiza varijanci za ponavljana mjerenja (*repeated measures ANOVA*). U slučajevima malog broja podataka primjenjivana je neparametrijska alternativa testa (Friedman ANOVA), koja je obično dodatno provjeravana parametrijskim testom veće snage. Razlike se smatraju statistički značajnim ako je  $p < 0,05$ . Za usporedbu dvije ili više kontinuiranih numeričkih varijabli prema određenim kategorijama korišten je parametrijski test multivarijantne analize varijanci, MANOVA dok je za usporedbu jedne kontinuirane varijable prema dvije ili više vrsta kategoričkih varijabli korištena faktorska analiza varijanci (Factorial ANOVA). Kod obje analize razlike se smatraju statistički značajnim ako je  $p < 0,05$ .

Linearna regresija korištena je za određivanje moguće međusobne povezanosti numeričkih varijabli. Određivan je koeficijent korelacije  $r$ , te njegova statistička značajnost  $p$  ( $p < 0,05$ , statistički



značajno). Korelacija se smatra nepostojećom za  $r < 0,20$ , slabom za  $0,20 < r < 0,40$ , dobrom za  $0,40 < r < 0,70$ , te vrlo jakom za  $0,71 < r < 0,99$ .

Usporedba vrijednosti zavisnih ordinalnih varijabli prema kategorijama određivana je neparametrijskom Friedman analizom varijanci. U slučajevima usporedbe vrijednosti samo dvije ordinalne zavisne varijable korišten je Wilcoxon matched pairs test. Kod obje metode razlike se smatraju statistički značajnim ako je  $p < 0,05$ . Pri analizama frekvencija ordinalnih varijabli određivana je vrijednost Pearson  $\chi^2$  testa u frekvencijskim tablicama. Razlike frekvencija se smatraju statistički značajnim ako je  $p < 0,05$ . Udjeli ili postotni udjeli uspoređivani su testovima razlike proporcija. Također, razlike u udjelima smatraju se statistički značajnim ako je  $p < 0,05$ .

Povezanost ordinalnih i nominalnih (dihotomnih) kategoričkih varijabli analizirana je nelinearnom, logističkom regresijom.

Povezanost nominalnih nezavisnih varijabli određivana je vrijednošću Pearson  $\chi^2$  testa u kontingencijskim tablicama. Moguća povezanost nezavisnih nominalnih dihotomnih varijabli analizirana je putem  $\chi^2$  testa. Kod obje se povezanost varijabli smatra statistički značajnom, ako je razlika između opaženih i očekivanih frekvencija određena s  $p < 0,05$ . Pri analizama nominalnih dihotomnih varijabli, koje su određivane više puta u ispitivanoj skupini tijekom terapije (zavisni uzorci), raden je Cochran Q test. Promjena u frekvencijama smatra se statistički značajnom ako je  $p < 0,05$ .

## 4 REZULTATI

### 4.1 Procjena djelotvornosti terapije infliksimabom

Obzirom da TNF $\alpha$  igra ključnu ulogu u patogenezi RA primjena monoklonskog protutijela (infliksimaba), koje se na njega veže s velikom specifičnošću, potencijalno je vrlo djelotvorna u liječenju RA. Infliksimab je primjenjivan u dozi od 3 mg/kg a bolesnici su nastavili uzimati tjednu dozu metotreksata. Bilo je predviđeno devet aplikacija infliksimaba tijekom 54 tjedna, u vremenskim razmacima koji su ranije opisani. S ciljem procjene djelotvornosti takvog liječenja pratili smo određene laboratorijske i kliničke pokazatelje.

#### 4.1.1 Laboratorijski pokazatelji

Učinci blokade TNF $\alpha$  u bolesnika s RA očituju se promjenama u razini pojedinih citoikna i upalnih proteina. Za očekivati je da tijekom terapije infliksimabom dolazi do redukcije proupalnih citokina kao što su TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6. Posljedično tome dolazi i do redukcije CRP-a te drugih upalnih proteina.

Tijekom 62 tjedna liječenja infliksimabom i MTX-om, s ciljem procijene djelotvornosti terapije, određivali smo slijedeće laboratorijske pokazatelje: SE, CRP, solubilni receptor za TNF $\alpha$  (sTNFR), te citokine: IL-6 i IL-10. Rezultati su skupno prikazani na kraju ovog poglavlja u tablici 4, a promjene pojedinih laboratorijskih pokazatelja tijekom primjene infliksimaba i MTX-a pojedinačno smo opisali.

Sedmero bolesnika je odustalo od liječenja infliksimabom tijekom promatranog razdoblja. Kako se zbog odustajanja bolesnika ne bi izgubila potpunost podataka, statističke analize radene su na dva načina. Za cijelu skupinu bolesnika (N=24) upotrebljavali smo jednosmjerni parametrijski test analize varijanci ANOVA uzimajući u obzir promjenjivi broj bolesnika po pojedinim tjednima, dok

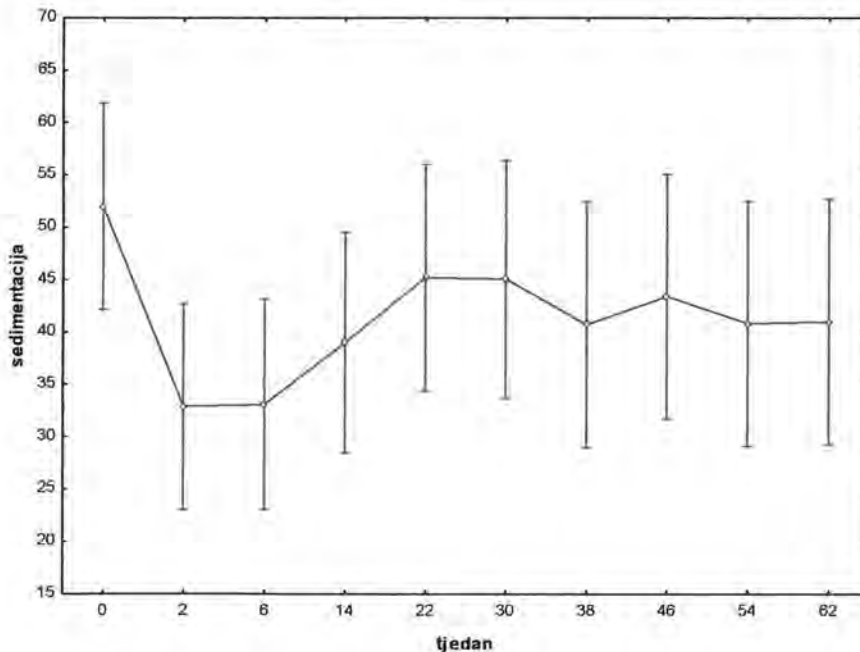
smo za bolesnike koji su cijelo vrijeme u terapiji (N=17) upotrebljavali ANOVA za ponavljanja mjerenja.

#### 4.1.1.1 SE

SE je nespecifična mjera aktivnosti kroničnih upalnih bolesti a time i RA. Rutinski se određuje u praćenju bolesnika s RA, iako je njena vrijednost ovisna o različitim čimbenicima (161).

Uzevši u obzir cijelu skupinu naših bolesnika, ukupne promjene SE nisu statistički značajne tijekom cijelog promatranog razdoblja ( $p=0,26$ ) (slika 3). Jedino u 2. tjednu dolazi do značajnog smanjenja SE u odnosu na početak terapije ( $p=0,006$ ). Između 6. i 22. tjedna uočljiv je porast SE. U posljednjem, 62. tjednu, vrijednost SE nije statistički značajno niža od vrijednosti prije početka terapije ( $p=0,15$ ).

Dakle, možemo zaključiti da liječenje infliksimabom i MTX-om nije dovelo do statistički značajnog pada vrijednostima SE u ovoj skupini bolesnika s RA.



Slika 3: Srednje vrijednosti SE u ispitivanoj skupini kroz promatrano razdoblje. Okomite crte predstavljaju 95% granice pouzdanosti oko srednje vrijednosti.

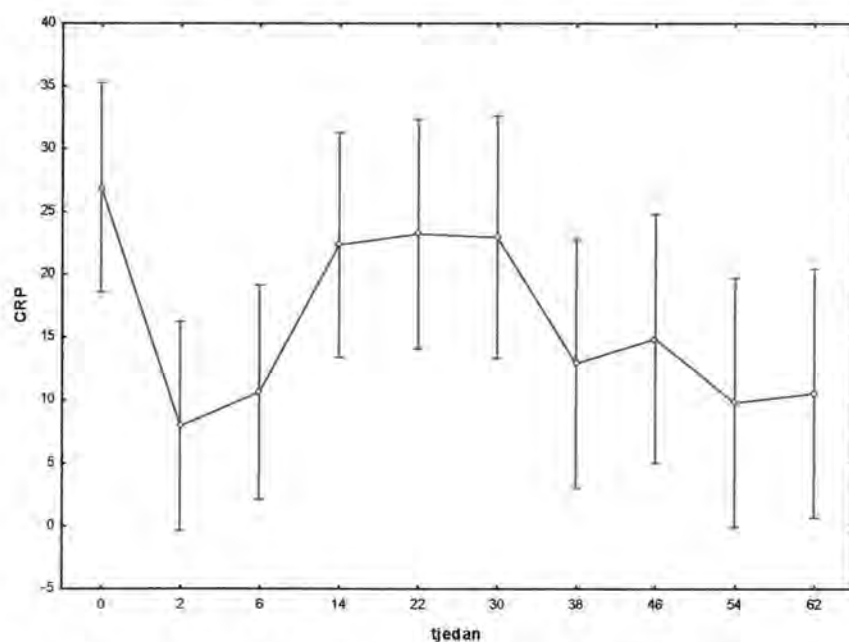
#### 4.1.1.2 CRP

CRP je protein akutne faze koji se proizvodi u jetri i vrlo dobro korelira s aktivnosti RA.

Rutinski se upotrebljava u reumatološkoj praksi i vjerodostojniji je pokazatelj upalne aktivnosti u odnosu na SE (160). Poznato je da je u bolesnika s upalnim artritismom njegova produkcija regulirana IL-6 (233).

Na slici 4 prikazano je kretanje vrijednosti CRP-a kod bolesnika liječenih s infliksimabom i MTX-om. Odmah nakon prve aplikacije lijeka vrijednosti CRP-a značajno padaju ( $p=0,0004$ ) da bi u daljnjem tijeku došlo do oscilacija njegove srednje vrijednosti. Nakon 6. tjedna prati se porast CRP-a koji je moguće uzrokovan duljim vremenskim razdobljem između pojedinih aplikacija. Tijekom daljnjeg liječenja srednja vrijednost CRP ponovno pada, te su vrijednosti od 38. do 62. tjedna približno iste onima u 2. i 6. tjednu. Usporedba početnih vrijednosti u 0. tjednu s konačnim u 62. tjednu, pokazuje značajan pad CRP-a ( $p=0,01$ ). Kod 17 pacijenata pristutnih tijekom cijelog promatranog razdoblja također je prisutna statistički značajna razlika u vrijednostima CRP-a ( $p=0,004$ ).

Iako je sniženje razine CRP-a do kojeg je došlo tijekom liječenja infliksimabom i MTX-om značajno, karakteristika ove skupine je izrazita oscilacija njegovih vrijednosti tijekom liječenja.



Slika 4: Srednje vrijednosti CRP u ispitivanoj skupini kroz promatrano razdoblje. Okomite crte predstavljaju 95% granice pouzdanosti oko srednje vrijednosti.

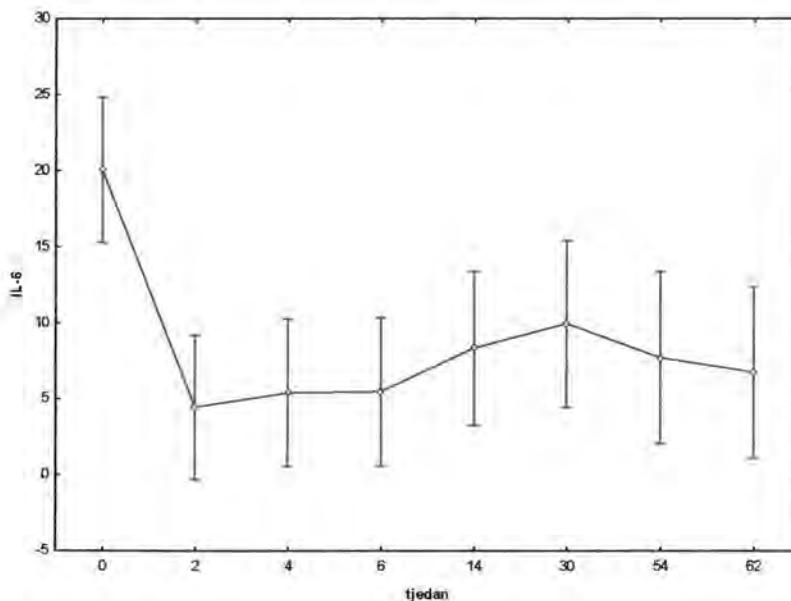
#### 4.1.1.3 IL-6

IL-6 je snažan proupalni citokin s velikom bioaktivnošću u krvi i mogućnošću djelovanja na udaljenim organima. TNF $\alpha$  inducira njegovo oslobađanje. Neutraliziranjem aktivnosti TNF $\alpha$  dolazi do njegove redukcije. On utječe na stvaranje CRP-a u jetri i njihove vrijednosti dobro koreliraju (76,233).

Naši rezultati prikazani na slici 5 ukazuju na to da već nakon prve aplikacije lijeka, u 2. tjednu, dolazi do statistički značajnog pada razine IL-6 ( $p=0,000002$ ), dok ostale vrijednosti (4.-62. tjedan) zadržavaju međusobno neznačajnu razliku. Uspoređujući konačne vrijednosti IL-6 u 62. tjednu sa početnim, također je prisutno statistički značajno smanjenje ( $p=0,0004$ ).

U skupini od 17 bolesnika koji su prisutni tijekom svih 62 tjedna, također je prisutna statistički značajna promjena IL-6 ( $p =0,00016$ ).

Dakle, primjena infliksimaba dovodi do značajne, permanentne i dugotrajne redukcije IL-6.



Slika 5: Razina IL-6 u cijeloj ispitivanoj skupini tijekom terapije infliksimabom. Okomite crte predstavljaju 95% interval pouzdanosti oko srednje vrijednosti.

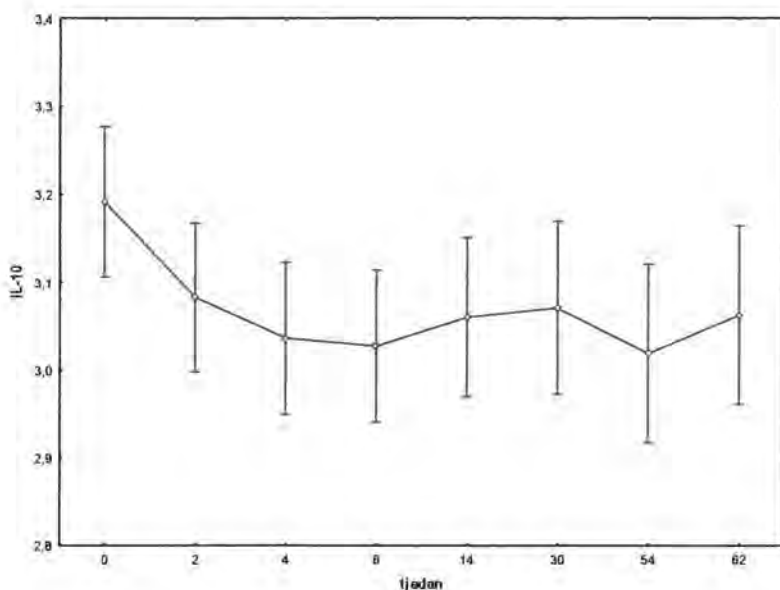


#### 4.1.1.4 IL-10

IL-10 je protupalni citokin. Dok su neka istraživanja pokazala da u bolesnika s RA koji su dobro odgovorili na terapiju infliksimabom dolazi do povećanja njegove vrijednosti (211), drugi autori (233) nisu dobili takve rezultate.

U cijeloj skupini naših bolesnika liječenih infliksimabom i MTX-om nismo zabilježili statistički značajne promjene vrijednosti razine IL-10 u promatranom razdoblju od 62 tjedna ( $p=0,16$ ) (slika 10). Dapače, vidljiv je trend smanjenja njegove vrijednosti tijekom liječenja koji doduše nije statistički značajan.

Takoder, niti u skupini od 17 bolesnika koji su prisutni tijekom svih 62 tjedna, analiza pokazuje da nema statistički značajne promjene ( $p=0,5$ ).



Slika 5: Razina IL-10 u cijeloj ispitivanoj skupini tijekom terapije infliksimabom.

Okomite crte predstavljaju 95% interval pouzdanosti oko srednje vrijednosti.

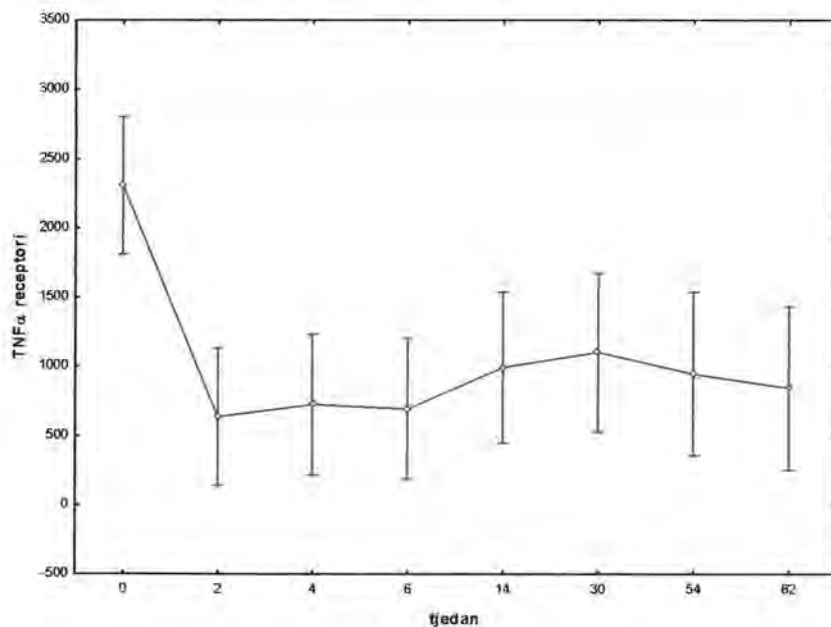
#### 4.1.1.5 Solubilni receptori TNF $\alpha$

U bolesnika sa aktivnim RA dolazi do pojačanog oslobađanja TNF $\alpha$  a posljedično tome i solubilnih receptora TNF $\alpha$  (sTNFR) koji su njegovi prirodni inhibitori. S obzirom da tijekom primjene infliksimaba dolazi do redukcije razine TNF $\alpha$  za očekivati je smanjeno stvaranje sTNFR (233). Time vrijednosti sTNFR odražavaju aktivnost TNF $\alpha$ . Imajući u vidu da je osjetljivosti dostupnih nam ELISA testova za mjerenje sTNFR veća nego onih za TNF $\alpha$ , određivali smo njegovu razinu prije i tijekom liječenja infliksimabom.

Na slici 6 i tablici 4 uočavamo da su početne vrijednosti sTNFR bile vrlo visoke, a već nakon prve aplikacije lijeka dolazi do značajne redukcije razine sTNFR ( $p=0,00003$ ). Među vrijednostima u sljedećim tjednima nema statistički značajne razlike te one ostaju snižene tijekom cijelog razdoblja primanja lijeka.

Statistički značajan pad vrijednosti sTNFR dobili smo i u skupini od 17 bolesnika koji su prisutni tijekom svih 62 tjedna ( $p=0,0003$ ).

Dakle, redukcija sTNFR tijekom primjene infliksimaba je značajna i dugotrajna.



Slika 6: Solubilni receptori TNF $\alpha$  (sTNFR) u cijeloj ispitivanoj skupini. Okomite crte predstavljaju 95% interval pouzdanosti oko srednje vrijednosti.

U tablici 4 prikazane su srednje vrijednosti i medijani laboratorijskih pokazatelja koje smo pratili tijekom 62 tjedna.

Tablica 4: Vrijednosti navedenih pokazatelja kroz promatrano razdoblje

Tjedan	0 (N=24)	2 (N=24)	6 (N=23)	14 (N=21)	22 (N=20)	30 (N=18)	38 (N=17)	46 (N=17)	54 (N=17)	62 (N=17)
SE (s.v.±SD)	52±24	33±21	33±19	39±28	45±28	45±26	41±23	43±25	41±23	41±23
SE (medijan)	46	29	34	35	41,5	41,5	41,5	40	46	46,5
CRP (s.v.±SD)	26,9±22,4	7,9±9,8	10,7±14,1	22,4±32,3	23,2±24	22,9±30	13,6±14	16,3±20	10,2±13	11,5±13
CRP (medijan)	19,6	5,45	4,9	7	14,7	9,5	8,25	10,9	9	6,75
IL-6 (s.v.±SD)	20±16	4,4±4,5	5,4±12,3	8,3±6,8		9,9±13,4			7,7±11,8	6,7±9,6
IL-6 (medijan)	17,5	2,76	1,98	3,22		4,52			4,02	4,84
IL-10 (s.v.±SD)	3,19±0,29	3,08±0,24	3,03±0,21	3,06±0,18		3,07±0,15			3,02±0,17	3,06±0,15
IL-10 (medijan)	3,15	3,05	3,0	3,0		3,1			3,0	3,0
sTNFR (s.v.±SD)	2308±1670	638±610	694±783	994±1446		1103±1332			946±1399	846±1255
sTNFR (medijan)	2080	645	600	705		775			360	780

#### 4.1.2 Klinički pokazatelji

Imajući u vidu snažno djelovanje infliksimaba na blokadu TNF $\alpha$  i posljedično smanjeno oslobađanje proupalnih citokina, za očekivati je da njegova primjena dovodi do kliničkog poboljšanja u tih bolesnika. Klinički pokazatelji često su subjektivni ali unatoč tome su najznačajniji u praćenju aktivnosti bolesti i kvalitete života tih bolesnika.

Tijekom 62 tjedna pratili smo slijedeće kliničke pokazatelje učinkovitosti terapije: jutranju zakočenost, broj bolnih zglobova, broj otečenih zglobova, bolesnikovu procjenu boli i općeg stanja na vizualnoj analognoj skali, zatim liječnikovu procjenu boli te bolesnikove funkcionalne sposobnosti na

temelju HAQ upitnika. Rezultati svih kliničkih mjerenja pokazani su skupno u tablici 5, a promjene i kretanje pojedinih pokazatelja tijekom 62 tjedna liječenja, pojedinačno smo analizirali.

Tablica 5: Vrijednosti kliničkih pokazatelja kroz promatrano razdoblje

pokazatelj	0 (N=24)	2 (N=24)	6 (N=23)	30 (N=18)	46 (N=17)	62 (N=17)
JZ / min (s.v.±SD)	102,3±80	30,2±28	31,7±48	31,4±24	27,9±32	20,8±24
JZ / min (medijan)	80	30	0	22,5	25	15
BOZ (s.v.±SD)	18±9	10±5	7±6	10±7	8±6	5±2
BOZ (medijan)	17	8	6	8	7	5
BBZ (s.v.±SD)	28±12	16±12	10±11	16±9	17±11	14±8
BBZ (medijan)	25	16	5	16	17	12
VAS boli (s.v.±SD)	70±16	40±19	39±22	45±26	34±21	35±14
VAS boli (medijan)	72,5	40	32	38	34	36
VAS težina bolesti (s.v.±SD)	66±16	41±18	37±20	46±24	34±17	33±14
VAS težina bolesti (medijan)	68,5	39,5	37	34,5	34	34
VAS liječnik (s.v.±SD)	70±14	44±13	36±19	39±21	35±20	28±14
VAS liječnik (medijan)	70	44	29	34,5	33	30
HAQ (s.v.±SD)	9,8 ±3,3	6±3	5,6±3,5	5,4±4,6	4,0±3,2	4,2±3,1
HAQ (medijan)	11	5,5	6	4	4	3

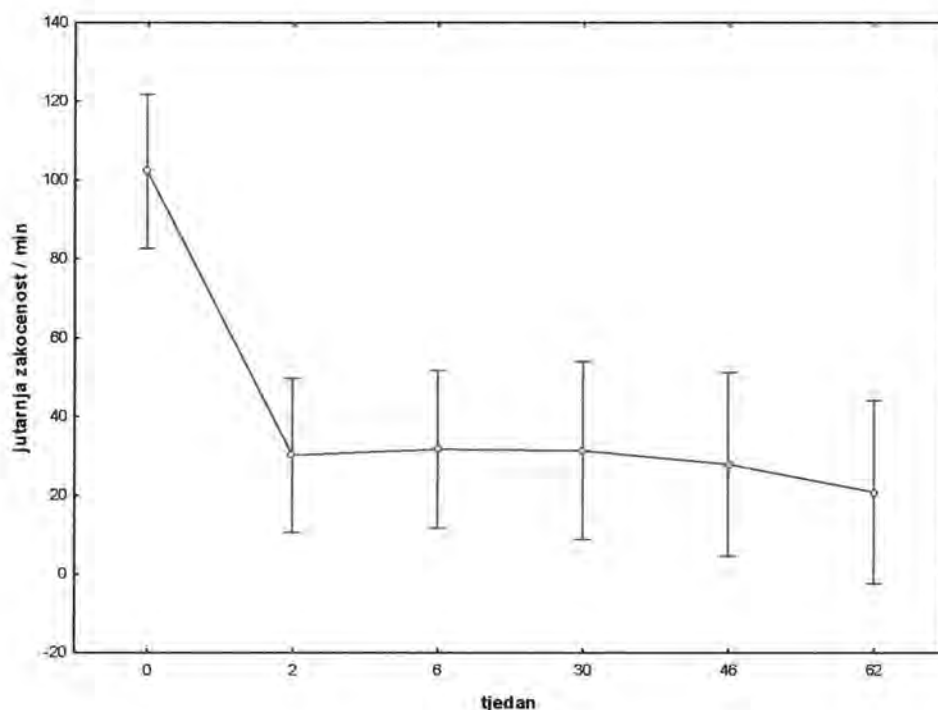
Legenda: JZ-jutarnja zakočenost, BOZ-broj otečenih zglobova, BBZ-broj bolnih zglobova, VAS-vizualna analogna skala, HAQ-upitnik funkcionalnih sposobnosti (od engl. health assessment questionnaire)

#### 4.1.2.1 Jutarnja zakočenost

Određivanje dužine trajanja jutarnje zakočenosti malih zglobova šaka, iako vrlo nespecifično, standardna je klinička metoda kojom se procjenjuje uspješnost liječenja reumatskih bolesnika.

Slika 7 nam pokazuje da je već nakon prve aplikacije lijeka došlo do značajne promjene u trajanju jutarnje zakočenosti. Vrijednosti postignute u 2. tjednu zadržane su do kraja liječenja pri čemu trajanje jutarnje zakočenosti u 0. tjednu ima najveću vrijednost koja statistički značajno odstupa od ostalih podataka ( $p=0,00001$ ).

Dakle, liječenje infliksimabom i MTX-om značajno i trajno reducira trajanje jutarnje zakočenosti.



Slika 7: Trajanje jutarnje zakočenosti (u minutama) u ispitivanoj skupini kroz promatrano razdoblje. Okomite crte predstavljaju 95% granice pouzdanosti oko srednje vrijednosti.

#### 4.1.2.2 Broj otečenih zglobova

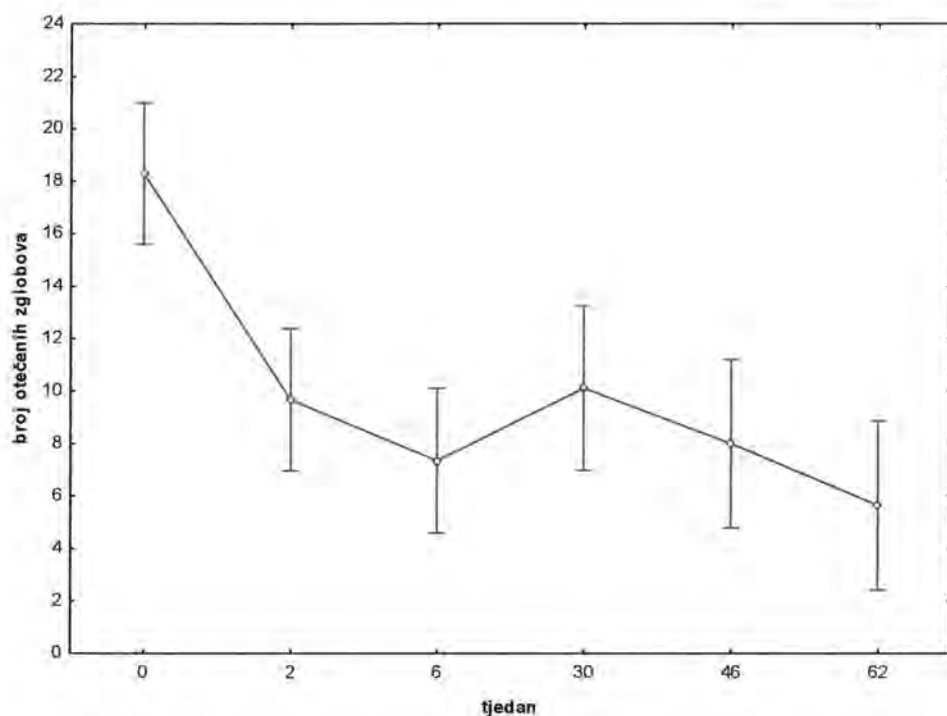
Određivanje broja otečenih zglobova standardna je klinička metoda procjene uspješnosti liječenja bolesnika s RA, kako u kliničkoj praksi tako i u kliničkim istraživanjima.



Na slici 8 prikazano je kretanje srednje vrijednosti broja otečenih zglobova tijekom liječenja infliksimabom i MTX-om. U cijeloj skupini, promjene broja bolnih zglobova su statistički značajne tijekom cijelog promatranog razdoblja ( $p=0,00001$ ), pri čemu broj otečenih zglobova u 0. tjednu ima najveću vrijednost koja statistički značajno odstupa od ostalih podataka ( $p=0,00001$ ). U razdoblju od 6. do 30. tjedna kad vremenski period između dvije aplikacije lijeka postaje duži, uočljiv je porast broja otečenih zglobova, no nije statistički značajan ( $p=0,18$ ).

I kod 17 bolesnika koji su pristutni tijekom cijelog promatranog razdoblja analiza ponavljanih mjerenja ukazuje na statistički značajno smanjenje broja otečenih zglobova ( $p=0,00001$ ).

Dakle, liječenje infliksimabom i MTX-om značajno reducira broj otečenih zglobova.



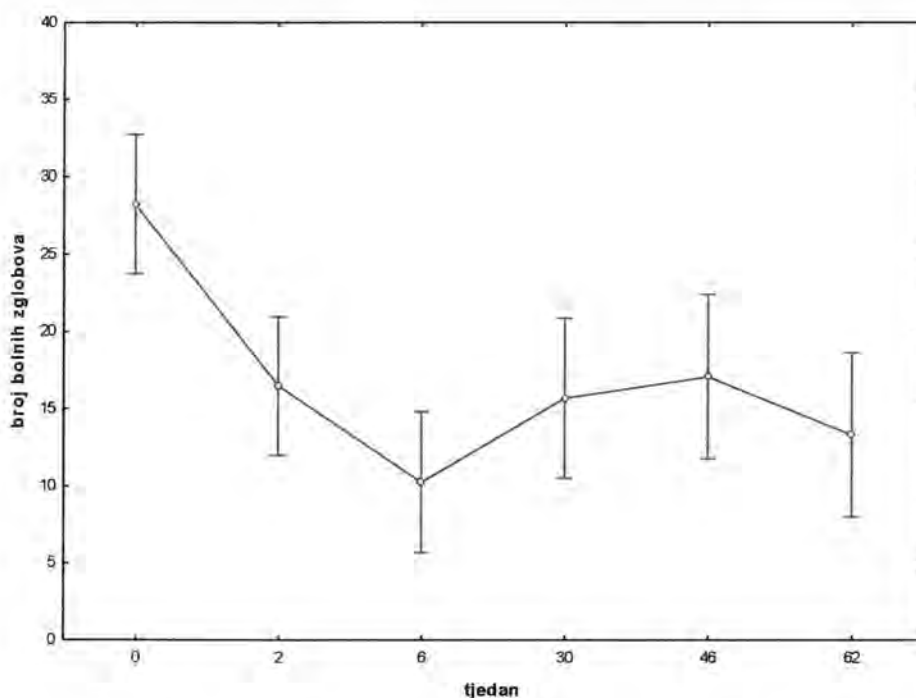
Slika 8: Broj otečenih zglobova u ispitivanoj skupini kroz promatrano razdoblje. Okomite crte predstavljaju 95% granice pouzdanosti oko srednje vrijednosti.

#### 4.1.2.3 Broj bolnih zglobova

Brojanje bolnih zglobova također je klinička metoda koja se redovito primjenjuje u kliničkoj praksi te procjeni uspješnosti liječenja bolesnika s RA.

Kretanje broja bolnih zglobova tijekom liječenja prikazano je na slici 9. U cijeloj skupini bolesnika, promjene broja bolnih zglobova su statistički značajne tijekom cijelog promatranog razdoblja ( $p=0,000009$ ), pri čemu je smanjenje u 2. tjednu statistički značajno ( $p=0,002$ ). Također je broj bolnih zglobova značajno manji na kraju (62. tjedan) u odnosu na početak ( $p=0,00007$ ). Isti rezultat dobiva se u obradi podataka 17 bolesnika koji su prisutni u terapiji cijelo promatrano razdoblje ( $p=0,0000001$ ).

Dakle, liječenje infliksimabom i MTX-om značajno reducira broj bolnih zglobova.



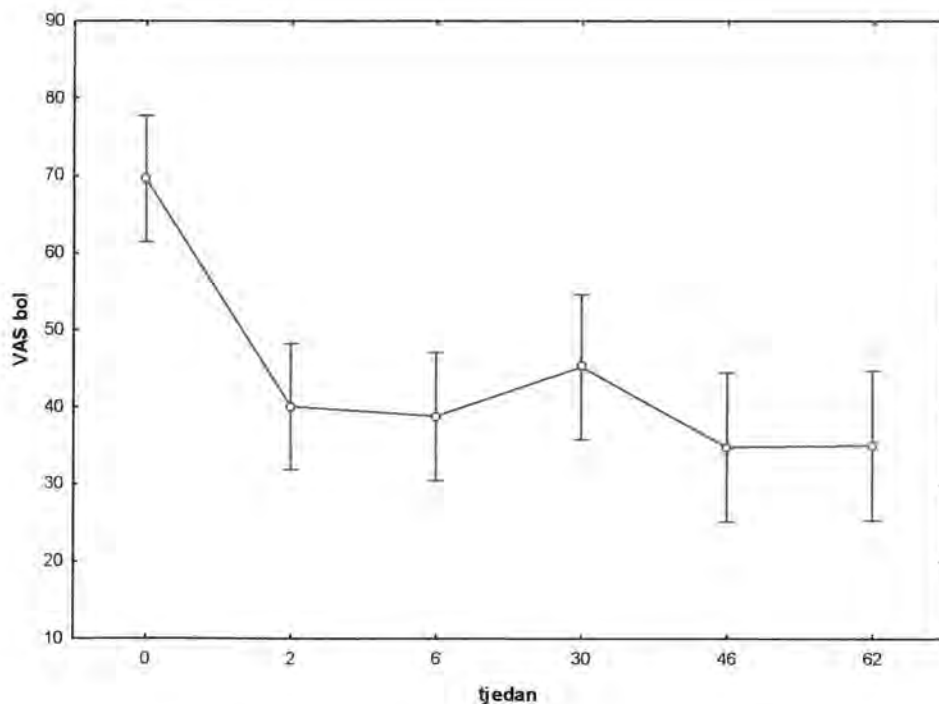
Slika 9: Broj bolnih zglobova u ispitivanoj skupini kroz promatrano razdoblje. Okomite crte predstavljaju 95% granice pouzdanosti oko srednje vrijednosti.

#### 4.1.2.4 Bolesnikova procjena boli metodom VAS

Iako subjektivna, procjena boli redovito se primjenjuje u kliničkim istraživanjima uspješnosti liječenja reumatskih bolesnika. Najčešće se primjenjuje metoda određivanja stupnja boli na vizualnoj analognoj skali (VAS).

Prije pojedinih terapija bolesnici su procjenjivali prisutnu bol na VAS. Podaci za cijelu skupinu pokazuju da su promjene procijenjene jačine boli statistički značajne tijekom cijelog promatranog razdoblja ( $p=0,00001$ ), pri čemu je najznačajnije smanjenje postignuto u 2. i 46. tjednu ( $p=0,00001$  odnosno  $p=0,04$ ) (slika 10).

Iste, statistički značajne promjene vrijednosti dobili smo kod 17 bolesnika prisutnih svih 62 tjedna ( $p=0,00004$ ).



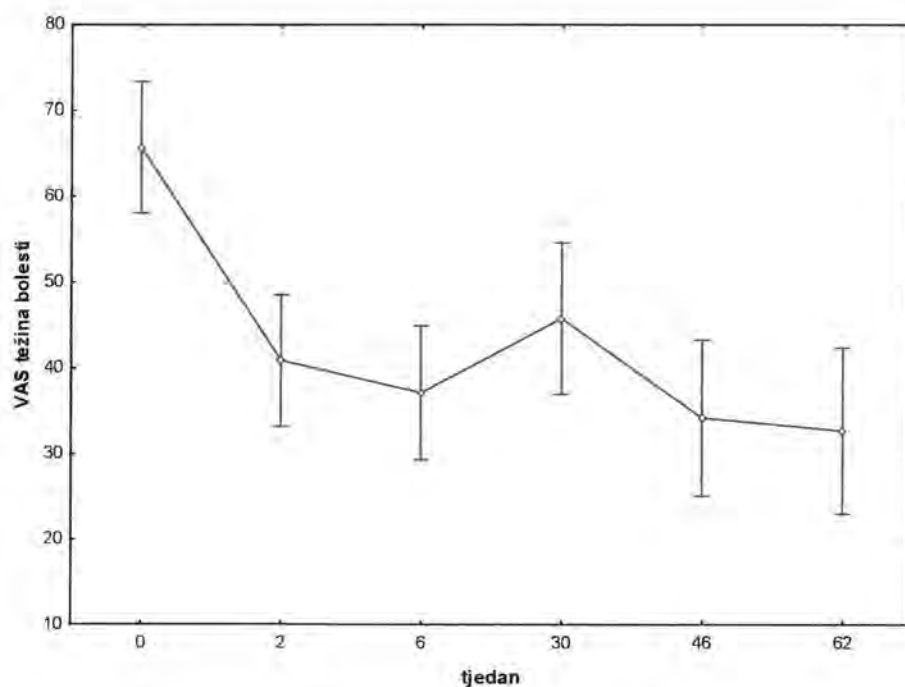
Slika 10: Subjektivna procjena boli na VAS u ispitivanoj skupini bolesnika tijekom 62 tjedna.

#### 4.1.2.5 Bolesnikova procjena težine bolesti metodom VAS

Procjena težine bolesti koja uzima u obzir cjelokupno stanje bolesnika čini se još subjektivnijom. Međutim, u kliničkim istraživanjima redovito se primjenjuje, također, metodom vizualne analogne skale.

Prije pojedinih terapija bolesnici su procjenjivali težinu svoje bolesti na VAS. Podaci za cijelu skupinu pokazuju da su promjene u procijenjenoj težini bolesti statistički značajne tijekom cijelog promatranog razdoblja ( $p=0,00001$ ), a najznačajnije smanjenje postignuto je u 2. i 46. tjednu ( $p=0,00001$  odnosno  $p=0,04$ ) (slika 11).

Kod 17 bolesnika pristutnih tijekom cijelog promatranog razdoblja također je prisutno statistički značajno smanjenje u procjeni težine bolesti ( $p= 0,00002$ ).



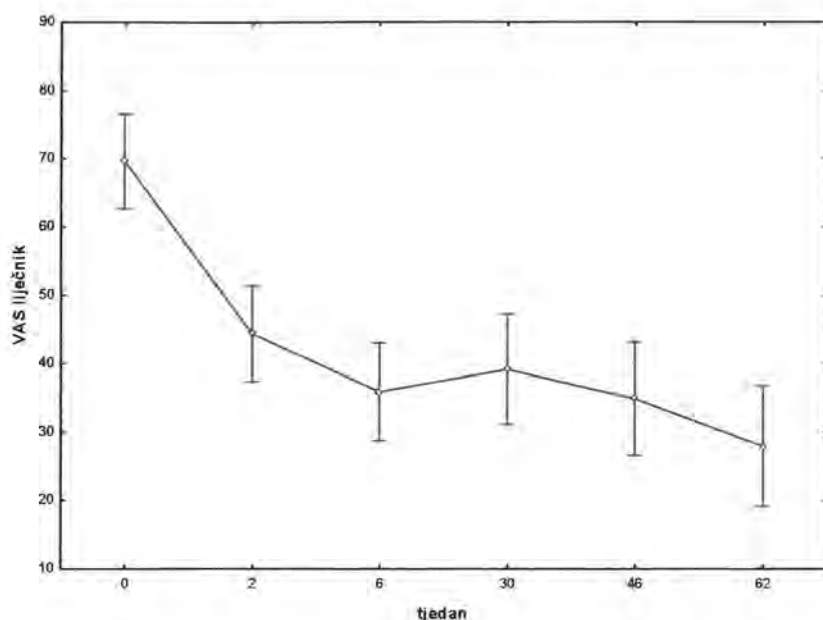
Slika 11: Subjektivna procjena težine bolesti od strane bolesnika na VAS u ispitivanoj skupini bolesnika tijekom 62 tjedna.

#### 4.1.2.6 Liječnikova procjena težine bolesti metodom VAS

Da bi rezultati bili što objektivniji uobičajeno je da i liječnik procjenjuje težinu bolesti.

Liječnikova procjena težine bolesti određivana je također na VAS-i, te su i tu u cijeloj skupini promjene u procijenjenoj težini bolesti statistički značajne tijekom cijelog promatranog razdoblja (ANOVA,  $p=0,00001$ ), pri čemu je najznačajnije smanjenje postignuto u 2. tjednu ( $p=0,00001$ ) (slika 12).

I kod 17 bolesnika prisutnih kroz cijelo promatrano razdoblje, postoji statistički značajno smanjenje u procjeni težine bolesti od strane liječnika tijekom terapije ( $p=0,00001$ ).



Slika 12: Procjena težine bolesti od strane liječnika na VAS-i u ispitivanoj skupini bolesnika tijekom 62 tjedna.

#### 4.1.2.7 Procjena funkcionalnih sposobnosti bolesnika temeljem HAQ-a

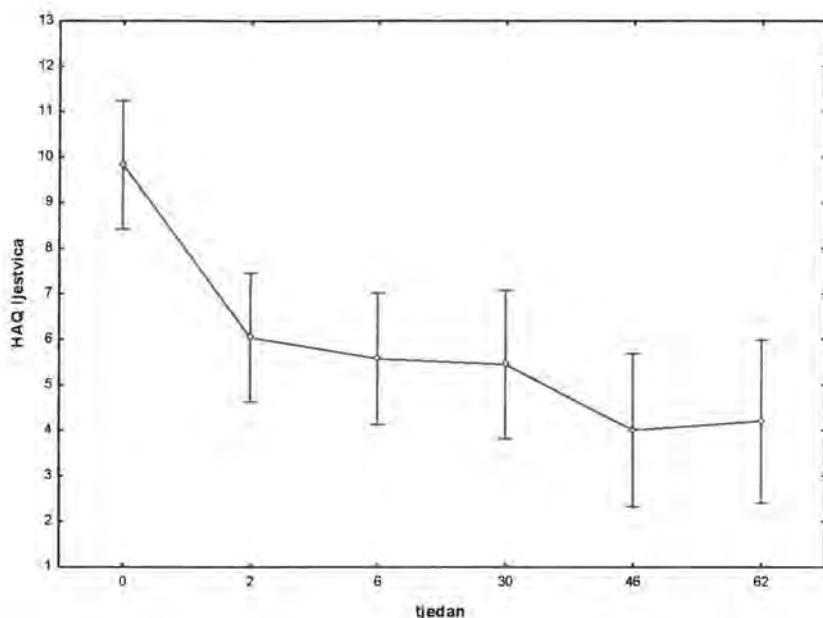
Postoje različiti upitnici i bodovni sustavi namjenjeni procjeni funkcionalnih sposobnosti bolesnika s RA. Mi smo koristili modificirani HAQ upitnik Pincusa i suradnika (230).

U cijeloj skupini rezultati ukazuju da su promjene u procijenjenoj funkcionalnoj sposobnosti statistički značajne tijekom cijelog promatranog razdoblja ( $p=0,00002$ ), pri čemu je najznačajnije



smanjenje postignuto u 2. tjednu ( $p=0,00015$ ). Također, vrijednosti HAQ-a na kraju ispitivanja (62.tjedan) su statistički značajno manje u odnosu na početak ( $p=0,00003$ ) (slika 13).

U skupini od 17 bolesnika koji su pristutni kroz cijelo promatrano razdoblje također postoji statistički značajna razlika u rezultatima HAQ-a ( $p=0,00001$ ).



Slika 13: Procjena funkcionalne sposobnosti bolesnika temeljem HAQ-a u ispitivanoj skupini tijekom 62 tjedna. Okomite crte predstavljaju 95% interval pouzdanosti.

#### 4.1.2.8 Indeks ACR

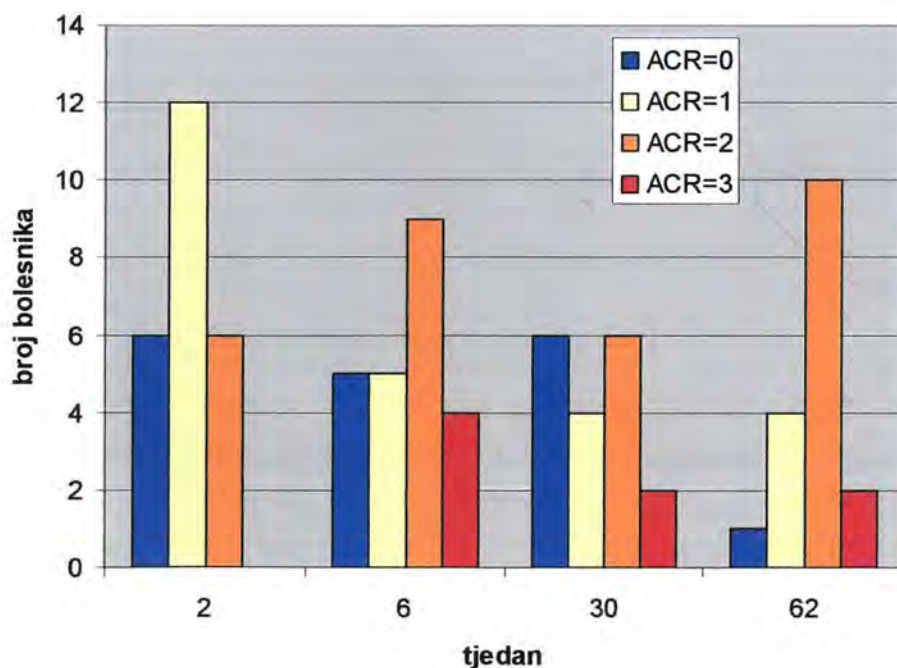
Indeks ACR je mjera za određivanje postignutog kliničkog učinka koja se izračunava na temelju kliničkih i laboratorijskih pokazatelja (vidi Metode). Bolesnike s  $ACR < 20$  (skupina 0) smatramo bolesnicima koji nisu odgovorili na liječenje ili tzv. *non responderima*, one s  $ACR 20$  (skupina 1) bolesnicima koji su odgovorili na terapiju ili tzv. *responderima*, one koji su ostvarili  $ACR 50$  (skupina 2) bolesnicima koji su dobro odgovorili ili tzv. *dobrim responderima*, a one sa  $ACR 70$  (skupina 3) bolesnicima koji su izvrsno odgovorili odnosno *izvrsnim responderima*. Indeks ACR izračunavali smo u tjednima 2, 6, 30 i 62, a rezultati su prikazani na tablici 6 i slici 14. Vidljivo je

da broj *non respondera* s dužinom trajanja terapije opada, a raste broj *dobrih* i *izvršnih respondera* (Pearson  $\chi^2$  p=0,0003).

Tablica 6: Raspodjela frekvencija javljanja indeksa ACR tijekom terapije infliksimabom.

Indeks ACR	tjedan			
	2	6	30	62
0 (<20%)	6 (25%)	5 (21,73%)	6 (33,3%)	1 (5,89%)
1 (20-50%)	12 (50%)	5 (2,73%)	4 (22,2%)	4 (23,53%)
2 (>50%)	6 (25%)	9 (39,13%)	6 (33,3%)	10 (58,82%)
3 (>70%)	0	4 (17,4%)	2 (11,2%)	2 (11,76%)
ukupno	24	23	18	17

S dužom primjenom infliksimaba raste broj bolesnika koji su ostvarili ACR50 i ACR70 te je njihov broj statistički značajno viši u 62. tjednu u odnosu na 2. tjedan ( $\chi^2$  test, p=0,01). Također se uočava bitni porast onih s ACR50 i ACR70 u 6. tjednu, ponovni pad u 30. tjednu (kad vremensko razdoblje između terapija postaje duže), te ponovni porast u 62. tjednu. Broj bolesnika koji su u 6. tjednu postigli ACR50 ili ACR70 i ostali na tim vrijednostima u 62. tjednu, iznosi 10 od 17 tj. 58,8%.



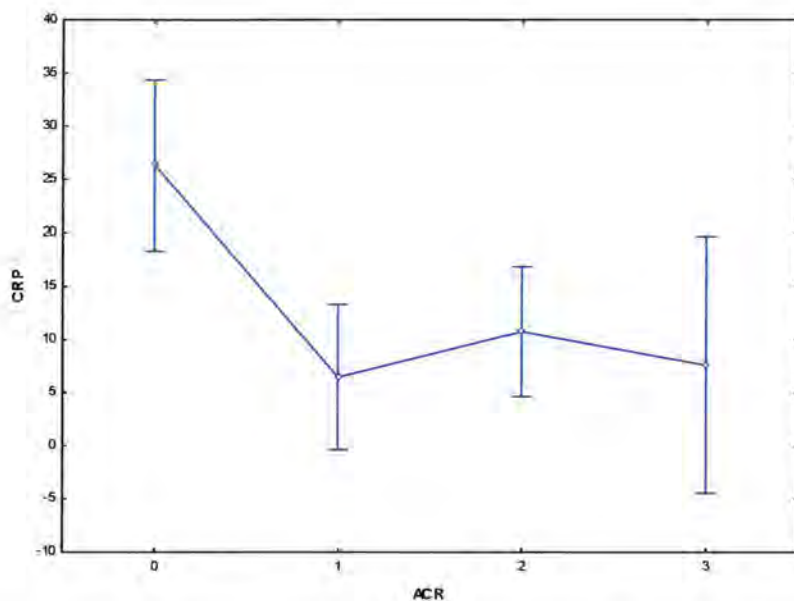
**Legenda:** 0-non-responderi ,1-responderi, 2-dobri reponderi, 3-izvršni-responderi

Slika 14: Raspodjela broja respondera, dobrih respondera, izvršnih repondera i non-respondera tijekom terapije.

#### 4.1.3 Usporedba laboratorijskih i kliničkih pokazatelja

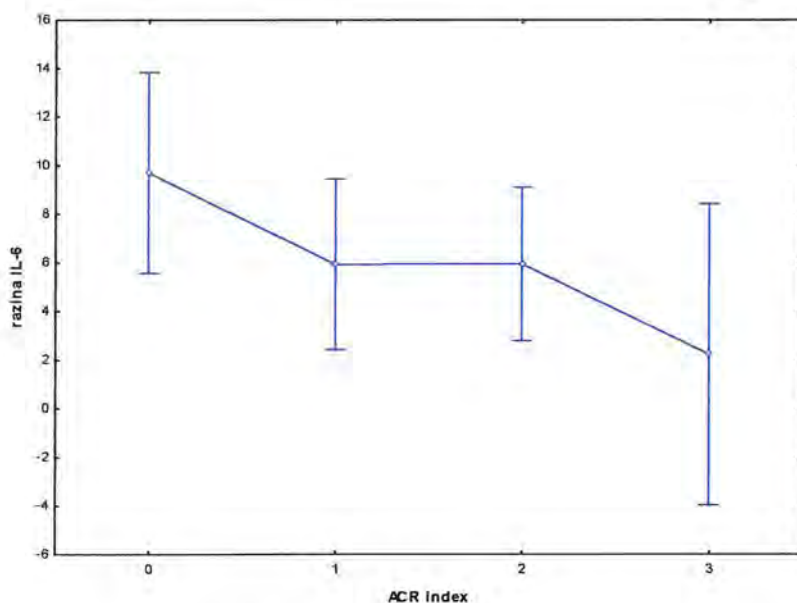
S obzirom da je indeks ACR klinička mjera koja se izračunva na temelju različitih, ranije prikazanih kliničkih pokazatelja i CRP-a, a vrijednosti CRP-a, za razliku od razine IL-6 i sTNFR, su izrazito oscilirale u skupini naših bolesnika liječenih infliksimabom, činilo nam se zanimljivo usporediti pojedine laboratorijske pokazatelje upale (CRP, sTNFR, IL-6) s indeksom ACR. Uspoređivali smo ih u svim tjednima u kojima su izračunavani odnosno mjereni.

Usporedbom CRP-a i indeksa ACR ustanovili smo da *non-responderi*, dakle oni bolesnici koji nisu odgovorili na terapiju imaju statistički značajno ( $p=0,0028$ ) više vrijednosti CRP-a od *respondera* (slika 15).



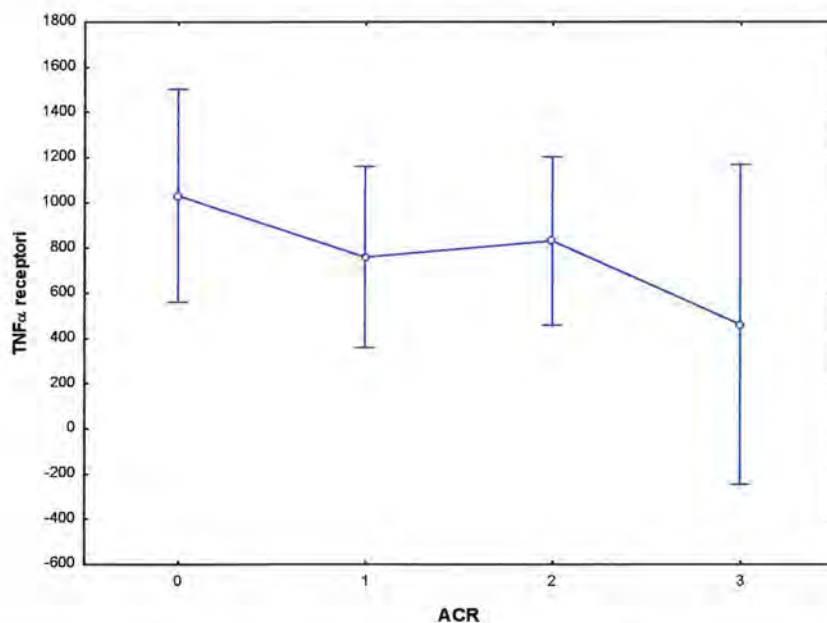
Slika 15: Usporedba vrijednosti CRP sa ACR-indeksom bolesnika. (Legenda: 0-*non-responderi*, 1-*responderi*, 2-*dobri responderi*, 3-*izvršni-responderi*)

Slične rezultate dobili smo i usporedbom IL-6 i indeksa ACR s obzirom da *non-responderi* tj. oni bolesnici koji nisu odgovorili na terapiju imaju statistički značajno viši IL-6 ( $p=0,037$ ) od *respondera* (slika 16).



Slika 16: Usporedba vrijednosti IL-6 s ACR-indeksom. (Legenda: 0-non-responderi ,1- responderi, 2-dobri reponderi, 3-izvrnsni-responderi )

S druge strane usporedba vrijednosti sTNFR i indeksa ACR ne pokazuje statistički značajnu razliku ( $p=0,12$ ) čak niti onda kada uspoređujemo *non-respondera* i *izvrnsne respondere* (slika 17).



Slika 17: Usporedba vrijednosti sTNFR sa ACR-indeksom. (Legenda: 0-non-responderi ,1- responderi, 2-dobri reponderi, 3-izvrnsni-responderi )

Dakle, iz iznesenog se nameće zaključak da vrijednosti CRP-a i IL-6 dobro koreliraju sa kliničkim odgovorom na liječenje, za razliku od vrijednosti sTNFR koje se nisu značajno razlikovale kod onih koji su odgovorili i onih koji nisu odgovorili na liječenje infliksimabom.



## 4.2 Procjena pojave protutijela tijekom liječenja infliksimabom i metotreksatom

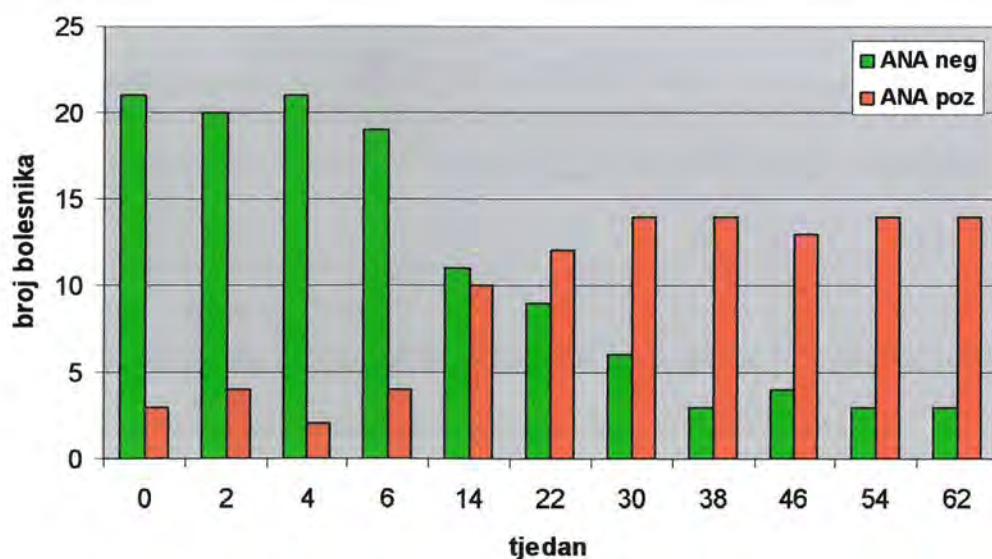
### 4.2.1 ANA

#### 4.2.1.1 Učestalost javljanja i obilježja ANA u bolesnika liječenih infliksimabom i MTX-om

Prije započinjanja liječenja infliksimabom 3 od 24 bolesnika (12,5%) imalo je pozitivna ANA. U daljnjem tijeku kod svih bolesnika liječenih infliksimabom i MTX-om, dakle i onih koji su primili svih 9 terapija i onih koji su iz različitih razloga prestali uzimati lijek, dolazi do značajno različitih promjena broja ANA-pozitivnih u odnosu na broj ANA-negativnih bolesnika. To naročito dolazi do izražaja u 22. tjednu kada se omjer mijenja u korist ANA-pozitivnih. U tom tjednu od ukupno 21 bolesnika 12 ih je ANA pozitivno (51,14%) dok taj postotak u 62. tjednu iznosi 82,35% (tablica 7, slika 18).

Tablica 7: Učestalost pozitivnih i negativnih nalaza ANA po tjednima.

Tjedan	0	2	4	6	14	22	30	38	46	54	62
ANA neg.	21	20	21	19	11	9	6	3	4	3	3
ANA poz.	3	4	2	4	10	12	14	14	13	14	14
ukupno	24	24	23	23	21	21	20	17	17	17	17



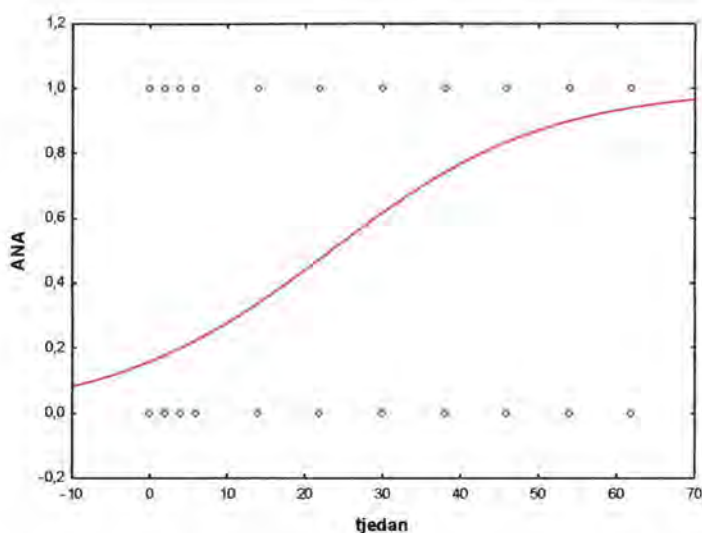
Slika 18: Broj bolesnika sa ANA pozitivnim i negativnim nalazom tijekom terapije.



Srednje vrijednosti titra ANA-e su tijekom vremena rasle, a maksimalni zabilježeni titar iznosio je 1:5120.

Krivulja predviđanja nalaza ANA dobivena modelom logističke regresije dobro opisuje opažene promjene (statistička značajnost prilagođenosti modela podacima  $p=0,000001$ ), koje govore da s duljom primjenom terapije vjerojatnost pozitivnog nalaza ANA raste (slika 19).

Takoder smo ustanovili da se učestalost ANA pozitivnih nalaza kod onih koji su ranije prestali s terapijom infliksimabom ne razlikuje (Pearson  $\chi^2$  test,  $p=0,12$ ) od nalaza onih koji su uzimali lijek tijekom svih 62 tjedna.



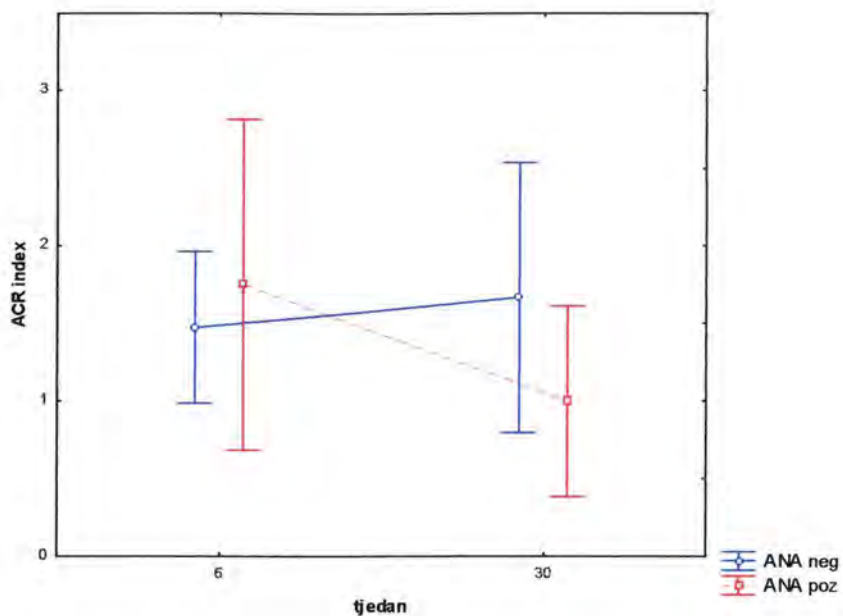
Slika 19: Predviđanje nalaza ANA modelom logističke regresije. Na ordinatnoj osi vrijednost 0 označava ANA negativni, a vrijednost 1 pozitivni nalaz. Točke predstavljaju prikupljene podatke ANA nalaza u grupi ispitanika.

#### 4.2.1.2 ANA i klinička slika

S obzirom na učestalost javljanja ANA zanimalo nas je postoji li povezanost između njihovog pojavljivanja i kliničkog stanja bolesnika u smislu pogoršanja osnovne bolesti.

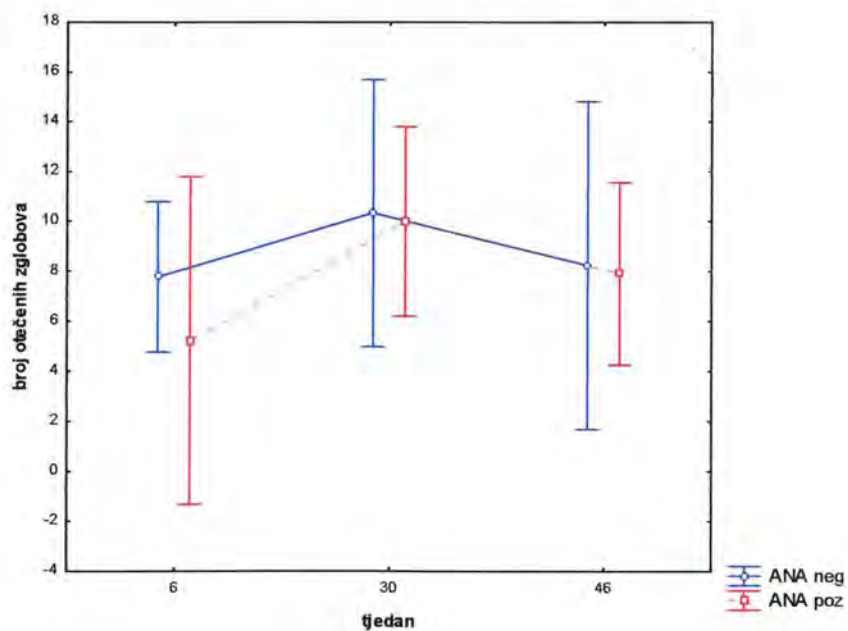
Uzimajući u obzir ACR-indeks nismo našli statistički značajnu razliku ( $p=0,09$ ) u postizanju ACR-indeksa između bolesnika s pozitivnim i negativnim ANA (slika 20). S obzirom na izrazitu

razliku u broju bolesnika s pozitivnim i negativnim ANA nalazom u 2. i 62. tjednu najvjerodostojniji su podaci u 30 tjednu kada je broj bolesnika s pozitivnim i negativnim ANA najbliži.



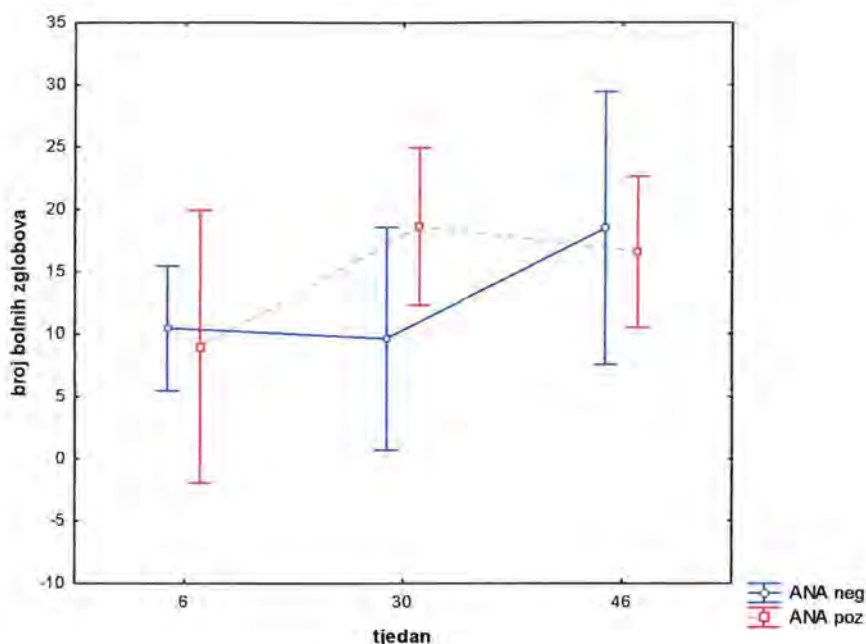
Slika 20. Indeks ACR u odnosu na ANA nalaz

Uspoređujući broj otečenih zglobova u ANA-pozitivnih i ANA-negativnih bolesnika također nismo dobili statistički značajnu razliku ( $F=0,29$   $p=0,91$ )(slika 21).



Slika 21. Broj otečenih zglobova kod različitih ANA nalaza.

Također smo usporedili i broj bolnih zglobova u grupi RA bolesnika kod kojih su se javila ANA te onih kod kojih liječenje infliksimabom nije dovelo do njihove indukcije (slika 22) ali niti tom usporedbom nismo dobili statistički značajnu razliku ( $F=1,8$   $p=0,11$ ).



Slika 22. Broj bolnih zglobova kod različitih ANA nalaza.

Dakle, u našoj skupini bolesnika nismo našli povezanost pozitivnih ANA s kliničkim odgovorom na liječenje infliksimabom.

#### 4.2.1.3 Usporedba ANA nalaza u ispitivanoj i usporednim skupinama

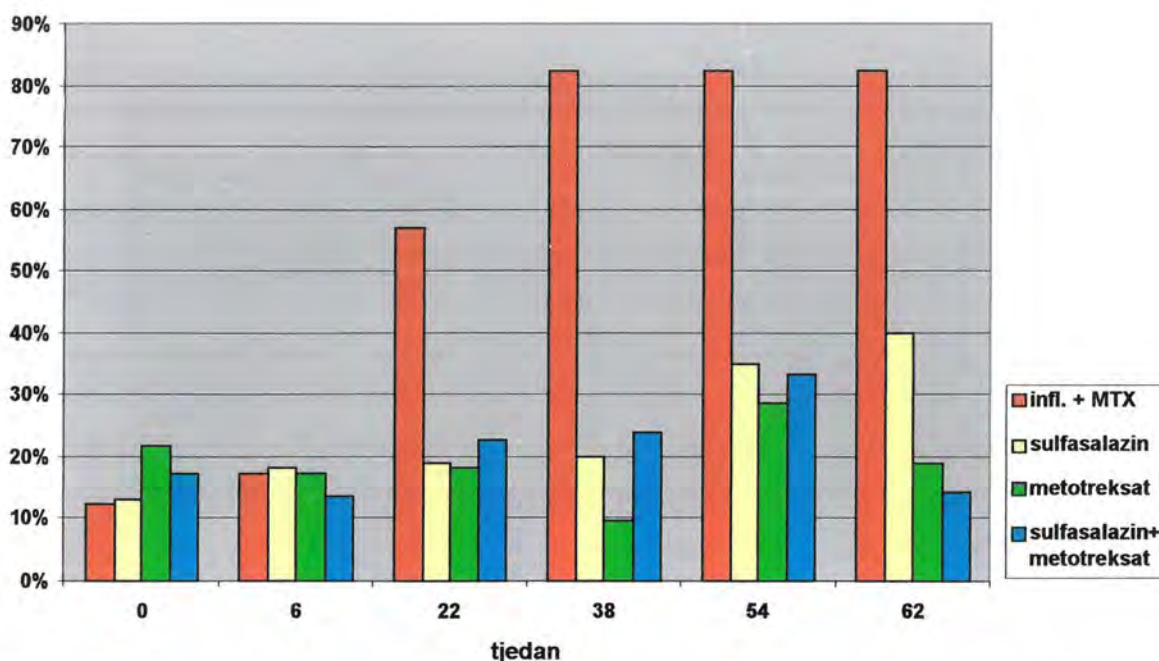
U sve četiri skupine (skupina 1: liječeni infliksimabom + MTX; 2 - liječeni s SZP-om, 3- liječeni MTX-om, 4-liječeni kombinacijom MTX + SZP) promatrali smo titar ANA u tjednima 0, 6, 22, 38, 54 i 62. Frekvencije pozitivnih i negativnih ANA nalaza ne razlikuju se među skupinama u tjednima 0 i 6, ali od 22. tjedna nadalje razlike su statistički značajne (tablica 8, slika 23). Gledajući ukupni broj bolesnika i postotak javljanja pozitivnog nalaza ANA uočava se da je u skupini koja je primala infliksimab udio ANA- pozitivnih bolesnika 87,5 % što je statistički značajno veće

( $p=0,0055$ ) nego u svim drugim skupinama, dok se skupine 2 (47,8%), 3 (39,1%) i 4 (34,7%) ne razlikuju statistički značajno.

Tablica 8: Kontingencijska tablica za vrijednosti ANA nalaza prema tjednima terapije u ispitivanoj i usporednim skupinama.

Tjedan	ANA	INFL+ MTX	SZP	MTX	SZP+MTX	zbroj	p (Pearson $\chi^2$ - test)
0	Neg	21	20	18	19	78	0,81
	Poz	3	3	5	4	15	
	zbroj	24	23	23	23	93	
6	Neg	19	18	19	19	75	0,97
	Poz	4	4	4	3	15	
	zbroj	23	22	23	22	90	
22	Neg	9	17	18	17	61	0,013
	Poz	12	4	4	5	25	
	zbroj	21	21	22	22	86	
38	Neg	3	16	19	16	54	0,000006
	Poz	14	4	2	5	25	
	zbroj	17	20	21	21	79	
54	Neg	3	13	15	14	45	0,0031
	Poz	14	7	6	7	34	
	zbroj	17	20	21	21	79	
62	Neg	3	12	17	18	50	0,000047
	Poz	14	8	4	3	29	
	zbroj	17	20	21	21	79	





Slika 23: Postotak pozitivnih nalaza ANA u pojedinim skupinama tijekom promatranog razdoblja. Od 22. tjedna pa do kraja terapije udio pozitivnih nalaza ANA u skupini liječenoj infliksimabom i MTX-om statistički je značajno veća nego u svim ostalim skupinama.

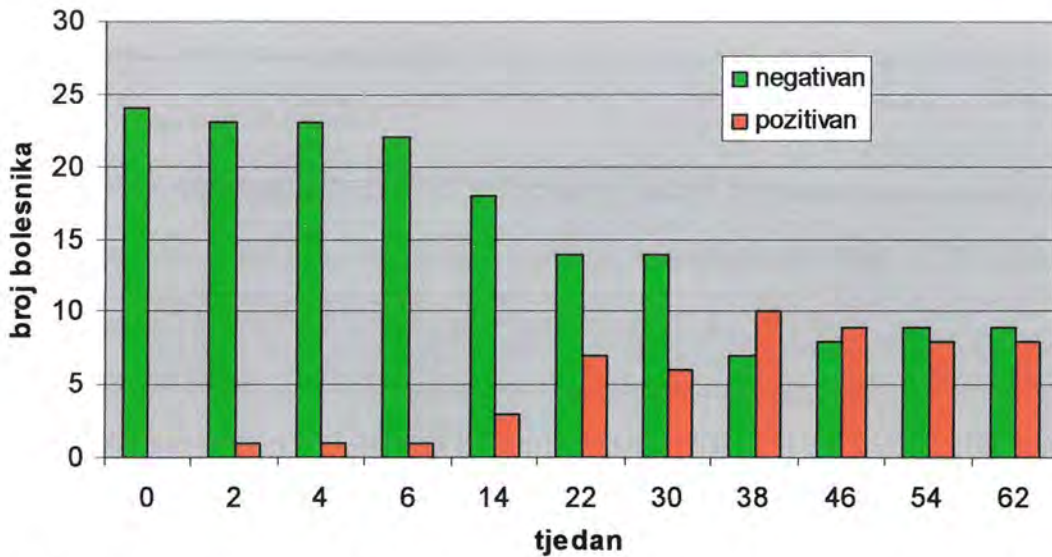
#### 4.2.2 Anti-ds-DNA

##### 4.2.2.1 Učestalost javljanja i obilježja anti-ds-DNA tijekom liječenja infliksimabom i MTX-om

Kod svih bolesnika liječenih infliksimabom i MTX-om promjene broja pozitivnih nalaza anti-ds-DNA su značajno različite u odnosu na broj negativnih. Najveći udio pozitivnih nalaza bilježi se u 38. tjednu, a učestalost pozitivnog nalaza anti-ds-DNA raste s vremenom (Pearson  $\chi^2$  test,  $p=0,000000$ ) (tablica 9 i slika 24).

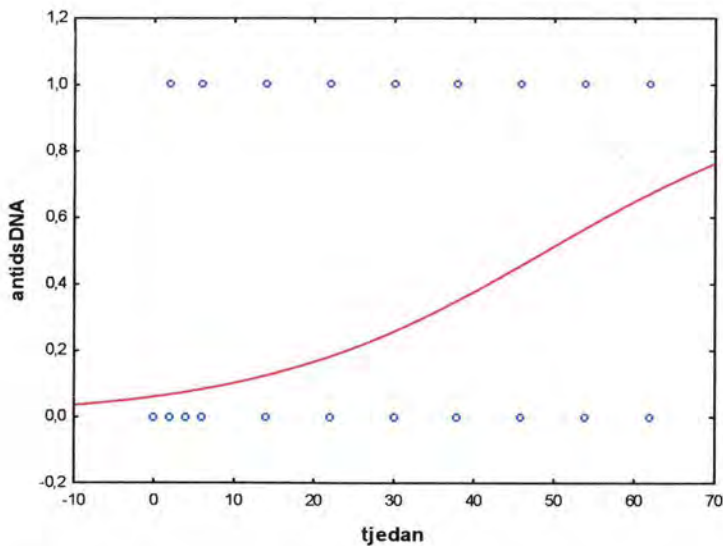
Tablica 9: Učestalost pozitivnih i negativnih nalaza anti-ds-DNA po tjednima.

tjedan	0	2	4	6	14	22	30	38	46	54	62
anti-ds-DNA neg	24	23	23	22	18	14	14	7	8	9	9
anti-ds-DNA poz	0	1	1	1	3	7	6	10	9	8	8
ukupno	24	24	24	23	21	21	20	17	17	17	17



Slika 24: Broj bolesnika s pozitivnim i negativnim nalazom anti-ds-DNA tijekom terapije

Krivulja predviđanja pojavljivanja protutijela anti-ds-DNA dobivena modelom logističke regresije (slika 25) dobro opisuje opažene promjene (statistička značajnost prilagodnosti modela podacima  $p=0,000001$ ) te nam govori da s duljom primjenom terapije vjerojatnost pozitivnog nalaza anti-ds-DNA raste.

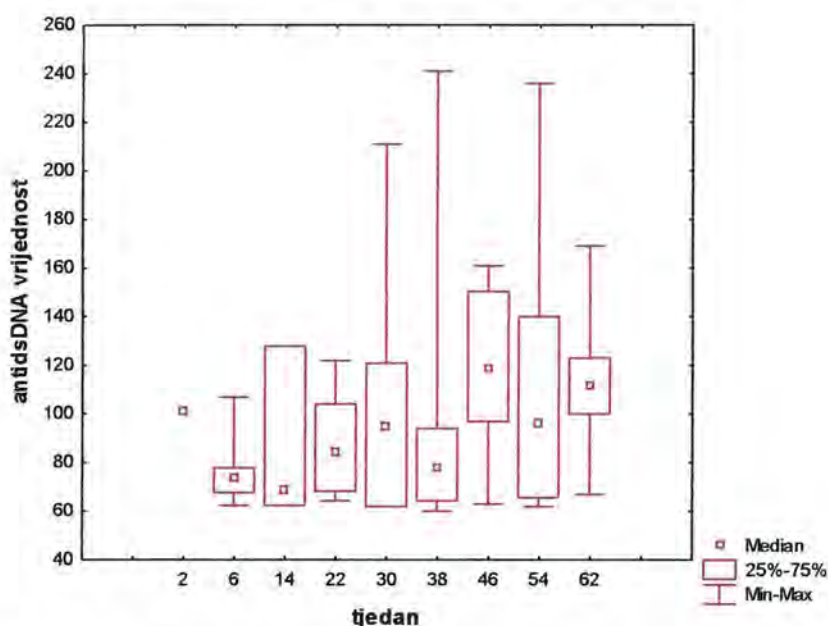


Slika 25: Predviđanje nalaza anti-ds-DNA modelom logističke regresije. Na ordinatnoj osi vrijednost 0 označava anti-ds-DNA negativni, a vrijednost 1 pozitivni nalaz. Točke predstavljaju prikupljene podatke anti-ds-DNA nalaza u grupi ispitanika.



Takoder smo ustanovili da nema statistički značajne razlike (Pearson  $\chi^2$  test,  $p=0,29$ ) između učestalosti pozitivnih nalaza anti-ds-DNA kod onih koji su ranije prestali uzimati infliksimab i onih koji su ga uzimali svih 54 tjedana.

Srednje vrijednosti anti-ds-DNA u ispitivanoj skupini tijekom vremena su rasle, a raspon je bio izuzetno velik (slika 26). Maksimalna vrijednost iznosila je 261 U/ml. U 54. tjednu liječenja srednja vrijednost anti-ds-DNA iznosila je  $137,54 \pm 53,90$  U/ml..

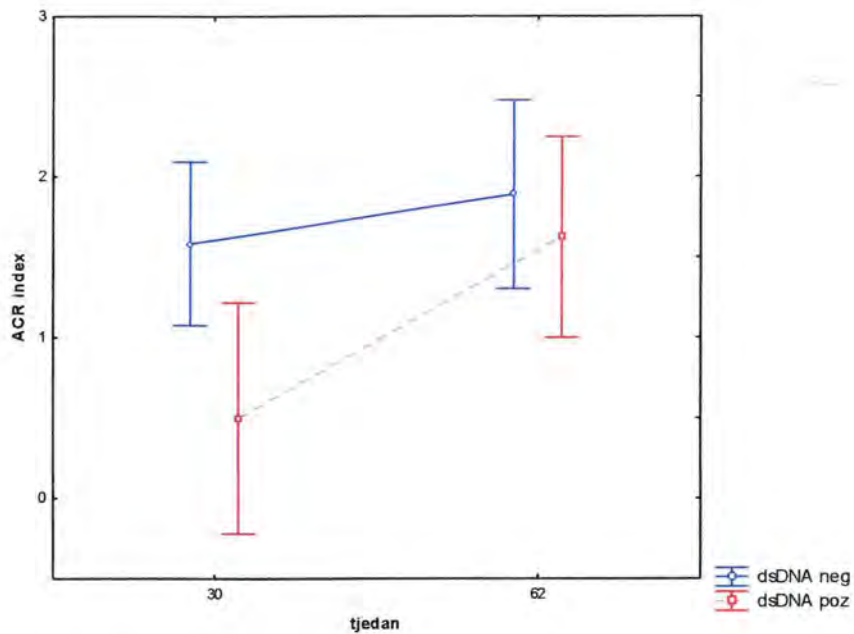


Slika 26: Vrijednosti anti-ds-DNA (medijan, kvartilni interval, raspon)

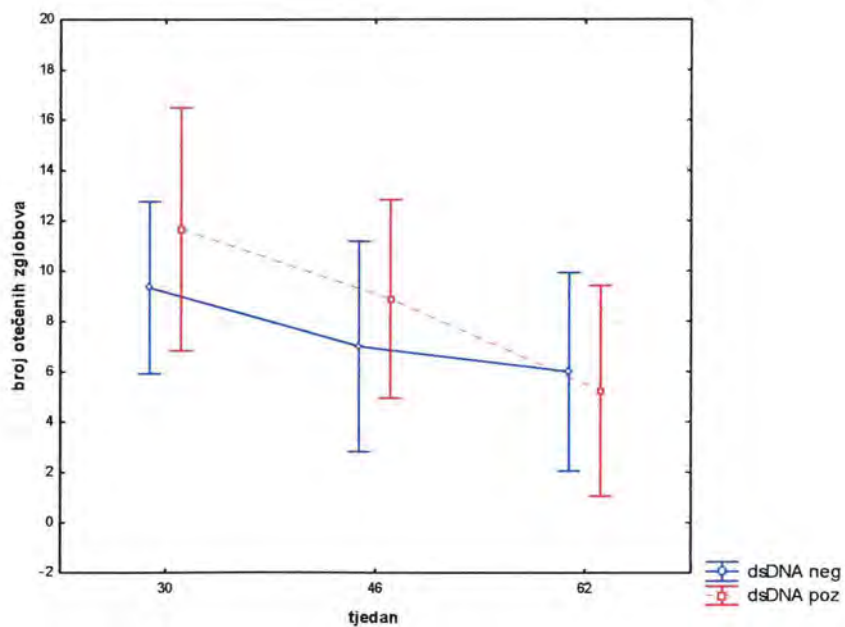
#### 4.2.2.2 Anti-ds-DNA i klinički pokazatelji

Zanimalo nas je postoji li povezanost između pojavljivanja protutijela anti-ds-DNA i kliničkog odgovora na terapiju (indeks ACR). U prvim tjednima liječenja prisutan je nesrazmjer u broju bolesnika s pozitivnim i negativnim anti-ds-DNA nalazima, međutim u 62 tjednu kada imamo približno jednak broj bolesnika u obje grupe vidimo da nema statistički značajne razlike između indeksa ACR za dvije grupe nalaza anti-ds-DNA (slika 27).

Faktorska analiza varijanci pokazuje da nema statistički značajne razlike niti u broju otečenih zglobova ( $p=0,77$ ) (slika 28), za dvije grupe nalaza anti-ds-DNA tijekom promatranog vremena.



Slika 27: Indeksi ACR u odnosu na anti-ds-DNA



Slika 28: Broj otečenih zglobova u odnosu prema anti-ds-DNA tijekom promatranog vremena.

Iz navedenog se može zaključiti da pojava protutijela anti-ds-DNA tijekom liječenja infliksimabom ne implicira pogoršanje kliničke slike osnovne bolesti.

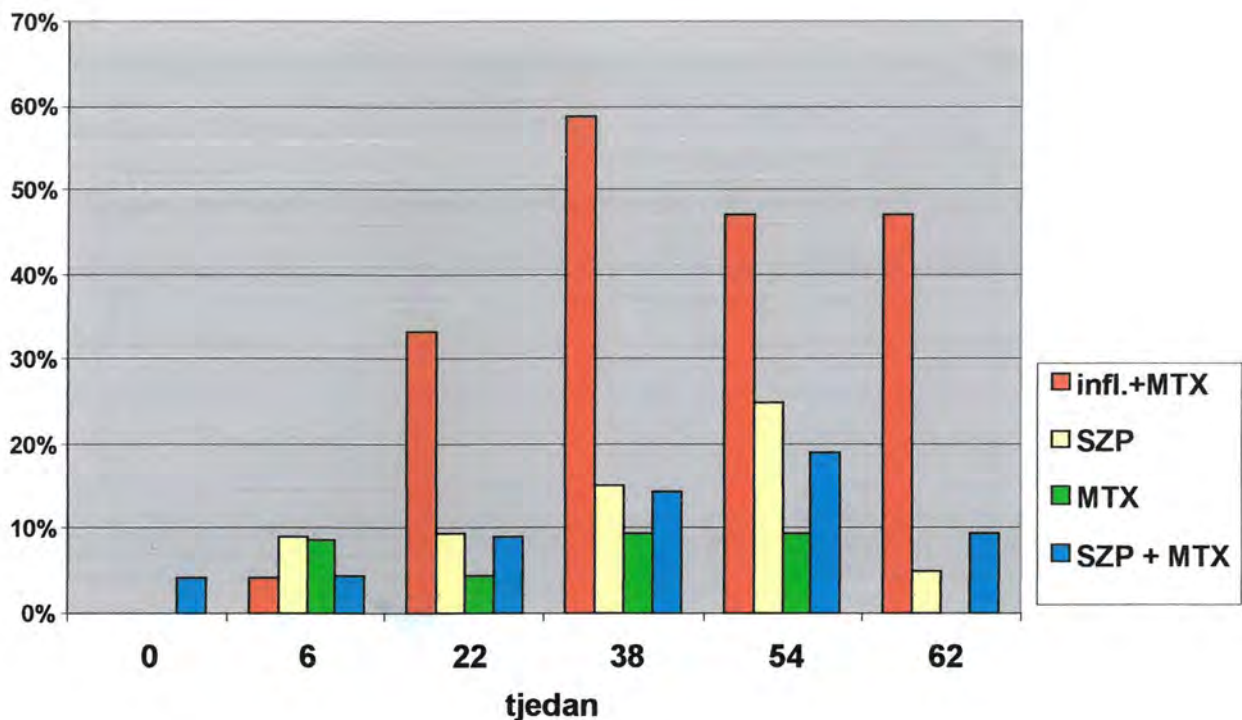
#### 4.2.2.3 Usporedba nalaza anti-ds-DNA u ispitivanoj i usporednim skupinama

U svim skupinama određivali smo vrijednost anti-ds-DNA protutijela u tjednima 0, 6, 22, 38, 54 i 62. Učestalost javljanja anti-ds-DNA ne razlikuju se među skupinama u tjednima 0 i 6, ali od 22. tjedna nadalje razlike su statistički značajne (Pearson  $\chi^2$ -test, p vrijednost dana je u tablici 10). Između skupina 2, 3 i 4 nema statistički značajne razlike u učestalosti pozitivnih nalaza anti-ds-DNA.

Kod bolesnika koji su liječeni infliksimabom i MTX-om anti-ds-DNA se javio u ukupno 66,7% što je statistički značajno više nego u svim drugim skupinama ( $p=0,033$ ), dok se skupine 2 (34,8%), 3 (21,7%) i 4 (30,4%) ne razlikuju statistički značajno (tablica 10, slika 29).

Tablica 10: Kontingencijska tablica za nalaz anti-ds-DNA u ispitivanoj i usporednim skupinama.

Tjedan	anti-ds-DNA	INFL.+MTX	SZP	MTX	SZP+MTX	zbroj	p (Pearson $\chi^2$ -test)
0	Neg	24	23	23	22	92	0,38
	Poz	0	0	0	1	1	
	zbroj	24	23	23	23	93	
6	Neg	22	20	21	21	84	0,87
	Poz	1	2	2	1	6	
	zbroj	23	22	23	22	90	
22	Neg	14	19	21	20	74	0,029
	Poz	7	2	1	2	12	
	zbroj	21	21	22	22	86	
38	Neg	7	17	19	18	61	0,001
	Poz	10	3	2	3	18	
	zbroj	17	20	21	21	79	
54	Neg	9	15	19	17	60	0,054
	Poz	8	5	2	4	19	
	zbroj	17	20	21	21	79	
62	Neg	9	19	21	19	68	0,00012
	Poz	8	1	0	2	11	
	zbroj	17	20	21	21	79	



Slika 29: Postotak pozitivnih nalaza anti-ds-DNA u pojedinim skupinama tijekom promatranog razdoblja. Od 22. tjedna pa do kraja terapije udio pozitivnih nalaza anti-ds-DNA u skupini liječenoj infliksimabom statistički je značajno veća nego u svim ostalim skupinama.

#### 4.2.3 ENA

##### 4.2.3.1 Učestalost pozitivnih nalaza ENA kod bolesnika liječenih infliksimabom i MTX-om

Kod bolesnika liječenih infliksimabom i MTX-om pratili smo i učestalost javljanja protutijela ENA (tablica 11).

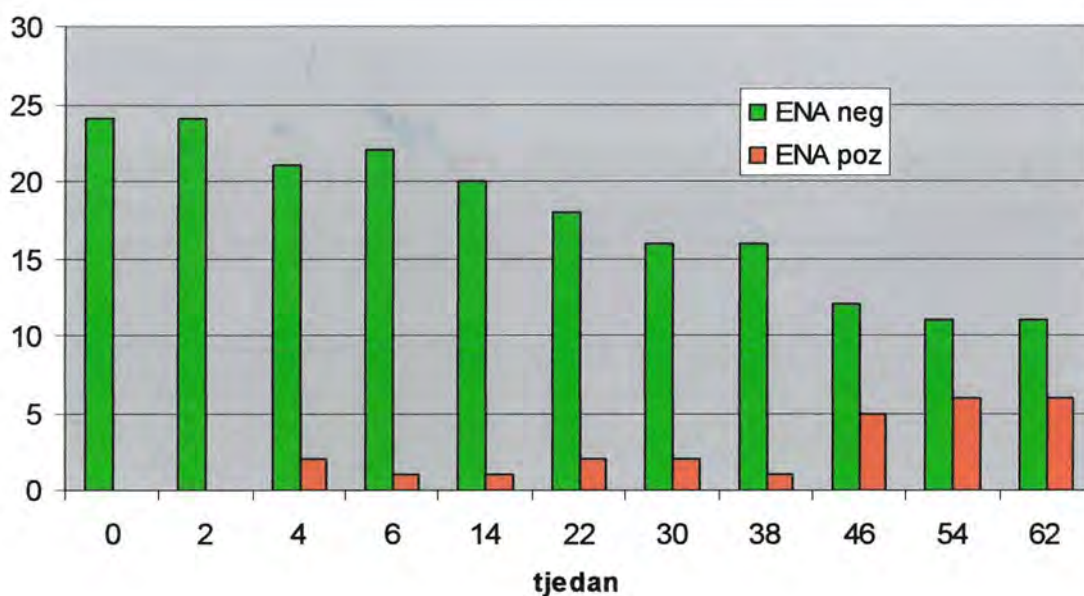
Tablica 11: Učestalost pozitivnih i negativnih ENA u ispitivanoj skupini po tjednima.

tjedan	0	2	4	6	14	22	30	38	46	54	62
ENA neg	24	24	21	22	20	18	16	16	12	11	11
ENA poz	0	0	2	1	1	2	2	1	5	6	6
ukupno	24	24	23	23	21	20	18	17	17	17	17



Njihova učestalost s vremenom raste (Pearson  $\chi^2$  test,  $p=0,00031$ ). Razlika u frekvencijama postaje značajna u 46. tjednu (tablica 11, slika 30).

Također smo ustanovili da nema statistički značajne razlike (Pearson  $\chi^2$  test,  $p=0,33$ ) između učestalosti pozitivnih ENA kod onih koji su ranije prestali uzimati infliksimab i onih koji su ga uzimali svih 54 tjedana.



Slika 30: Broj bolesnika s pozitivnim i negativnim ENA nalazom tijekom terapije

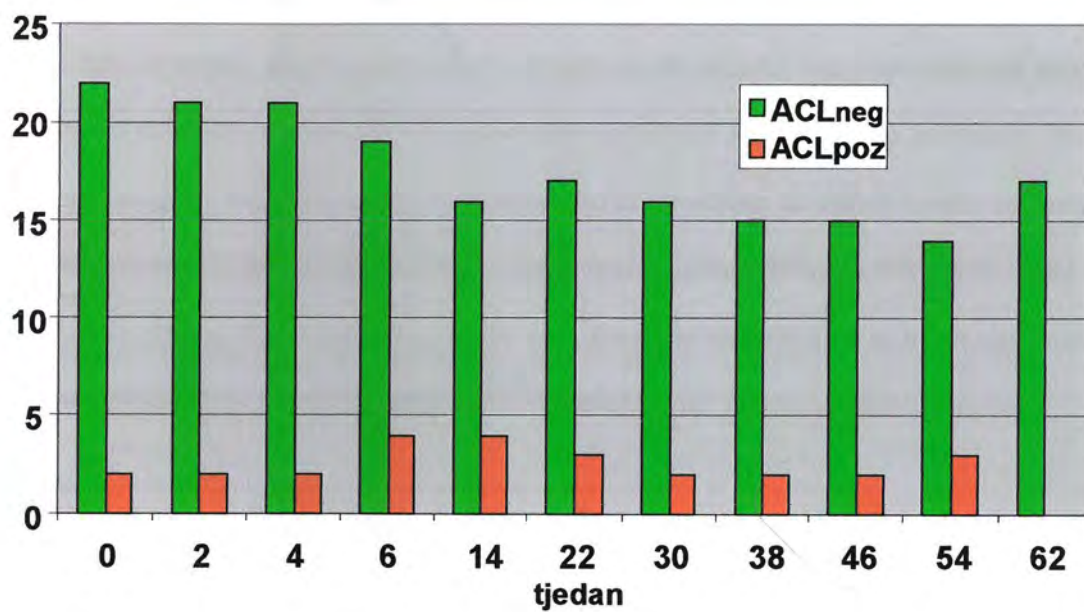
#### 4.2.4 ACL

##### 4.2.4.1 Učestalost pozitivnih nalaza ACL tijekom terapije infliksimabom i MTX-om

Proučavajući učestalost javljanja pozitivnih antikardiolipinskih protutijela (ACL) nismo ustanovili statistički značajnu razliku u frekvenciji tijekom 62 tjedna (Pearson  $\chi^2$  test,  $p=0,84$ ) (tablica 12, slika 31).

Tablica 12: Učestalost pozitivnih i negativnih nalaza ACL u ispitivanoj skupini po tjednima.

Tjedan	0	2	4	6	14	22	30	38	46	54	62
ACL neg	22	22	21	19	16	17	16	15	15	14	17
ACL poz	2	2	2	4	4	3	2	2	2	3	0
ukupno	24	24	23	23	20	20	18	17	17	17	17



Slika 31: Broj bolesnika s pozitivnim i negativnim nalazom ACL tijekom terapije



#### 4.3 Nuspojave i razlozi ranije obustave liječenja infliksimabom

##### 4.3.1 Infuzijske reakcije u ispitivanoj skupini

Kod bolesnika koje smo liječili infliksimabom zabilježene su sve infuzijske reakcije (svaka nuspojava koja se razvila tijekom ili u razdoblju do 2 sata nakon infuzije) koje su navedene u tablici 13. Ukupno ih je bilo 42 u 180 davanja lijeka (23,3%). Od 180 primjena lijeka povišeni tlak zabilježen je 7 puta (3,9%), sniženi tlak 1 put (0,5%), ubrzan puls 6 puta (3,3%), povišena temperatura 15 puta (8,3%), glavobolja 5 puta (2,8%).

Jedan bolesnik imao je pri kraju 9. infuzije nastup zimice i tresavice uz porast temperature i dispneju što smo okarakterizirali infuzijskom reakcijom koja nije zahtjevala promptno obustavljanje lijeka, dok su dvije bolesnice imale nespecifične kožne promjene uz svrbež u roku od manje od dva sata nakon infuzije. Obje su nakon idućih infuzija razvile burniju kliničku sliku (vidi dalje) te su bile isključene iz terapije. Kod 4 bolesnice javile su se alergijske reakcije koje su u dva slučaja zahtijevale promptni prekid infuzije i adekvantnu opskrbu bolesnika (vidi: razlozi obustave terapije).

Tablica 13: Opis učestalosti pojedinih infuzijskih reakcija tijekom terapije infliksimabom

Infuzijske reakcije	tjedan									zbroj
	0	2	6	14	22	30	38	46	54	
Porast temperature	4	1	3	2	2	1	0	0	2	15
Ubrzanje pulsa	0	0	2	1	2	0	0	0	1	6
Porast krvnog tlaka	1	1	0	0	2	1	0	1	1	7
Pad krvnog tlaka	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
Glavobolja	0	1	1	2	1	0	0	0	0	5
Alergijske reakcije koje su zahtijevale obustavu terapije	0	0	2	0	1	1	0	0	0	4
Ostale infuzijske reakcije koje su zahtijevale obustavu terapiju	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Infuzijske reakcije koje nisu zahtijevale obustavu terapiju	0	0	0	1	1	0	0	0	1	3
ukupno	5	4	9	6	9	3	0	1	5	42

#### 4.3.2 Ostale nuspojave u ispitivanoj skupini

Kod troje bolesnika (1,66%) zabilježene su lakše infekcije (u dva navrata dišnih puteva, u jednom navratu mokraćnog sustava) koje su zahtijevale antibiotsku terapiju. Jedna bolesnica razvila je kliničku sliku sindroma *lupus like* koja je zahtijevala prekid terapije infliksimabom (vidi dalje). Niti kod jednog bolesnika nije zabilježen porast transaminaza i gastrointestinalna nepodnošljivost lijeka

#### 4.3.3 Razlozi obustave liječenja infliksimabom

U 5 (20,83%) bolesnika razlog obustavljanja liječenja bile su infuzijske reakcije; od toga u četvero (16,6%) alergijske reakcije. Jedna naša bolesnica (4,2%) isključena je radi sindroma *lupus like*, a jedna (4,2%) radi neučinkovitosti terapije.

Infekcije nisu bile razlog prestanku uzimanja lijeka.

Kod dvije bolesnice alergijske reakcije su bile teže i zahtijevale su promptno liječenje. Bolesnica IS je 30 minuta nakon 3. aplikacije lijeka (tjedan 6) imala alergijsku reakciju u vidu eritema i urtikarijalnog osipa po cijelom tijelu te otoka glave i vrata. Bolesnica VV je 25 minuta po započinjanju 2. terapije, dakle nakon cca  $\frac{1}{4}$  doze (tjedan 6) imala alergijsku reakciju u vidu generaliziranog eritema lica, vrata i nogu uz otok lica, vjeda i usna te otežano disanje i parestezije uz uredan krvni tlak. Kod obje bolesnice je nakon liječenja adrenalinom, metilprednizolonom i kloropiraminom došlo je do povlačenja tegoba

Bolesnica SJ je tijekom primanja 5. doze lijeka (tjedan 22) imala svrbež i crvenilo na mjestu bolnih zglobova. Infuzija je tada prekinuta i ponovno nastavljena nakon 10-ak minuta, da bi se 90 minuta po isteku cijele doze lijeka javio makulo-eritematozan osip po šakama i podlakticama. Događaj je shvaćen kao infuzijska reakcija. Između 5. i 6. terapije imala je i dalje aktivni RA, a nije imala kožnih promjena. Nakon 6. terapije ponovno se javio difuzni eritem uz svrbež te je liječena



metilprednizolonom iv. Smatrali smo da se i kod nje radilo o alergijskoj reakciji uz dodatan izostanak učinka terapije, te smo je isključili iz daljnjeg liječenja.

Bolesnica SR je nakon 4. infuzije imala blaži osip uz svrbež koji je spontano prošao (infuzijska reakcija) da bi se nakon 5. infuzije osip ponovno javio u jačem obliku te je tada bolesnica i isključena iz studije pod sumnjom na alergijsku reakciju.

Bolesnica GB je tijekom druge infuzije imala tresavicu i osjećaj teškog disanja te je željela odustati od terapije. Dogadaj smo okarakterizirali infuzijskom reakcijom koja je zahtjevala obustavljanje lijeka.

Bolesnica AB je prestala uzimati infliksimab nakon 5. tjedna zbog izostanka učinka.

Tijek bolesti MH koja je između 4. i 5. aplikacije infliksimaba razvila kliničku sliku sindroma *lupus like*, detaljnije ćemo opisati. Radi se o 54-godišnjoj bolesnici koja je s 39 godina oboljela od seropozitivnog RA (dijagnosticiranog po kriterijima ACR). Njen HLA- haplotip je A1/2, B8/44, Cw3/w5, DR3/4, DQw3/w4. Tijekom niza godina liječena je s NSAR, klorokinom, solima zlata, kortikosteridima, SZP-om i MTX-om. Sinovijektomiju lijevog koljena učinila je kada je imala 41 godinu. Testovi na ANA, anti-ds-DNA i ENA uvijek su bili negativni izuzev u jednom navratu dok je uzimala SZP, kada je zabilježena pozitivna ANA u titru 1:80. S obzirom da je imala aktivan RA usprkos liječenju s 12,5 mg MTX tjedno i 12 mg metilprednizolona dnevno, u svibnju 2001. započeli smo s liječenjem infliksimabom. Već nakon prve doze infliksimaba kod bolesnice je zabilježeno značajno kliničko i laboratorijsko poboljšanje. Prije 4. doze infliksimaba (tjedan 22) CRP je pao s 63 mg/ml na 5,1 mg/ml, jutarnja zaočćenost s 420 na 0 minuta, broj otečenih zglobova s 26 na 8, bolnih zglobova s 16 na 5, VAS za bol od 75 na 43. Četiri tjedna nakon 4. doze infliksimaba bolesnica je zaprimljena u bolnicu radi akutnog poliartritisa, fotosenzitivnog osipa na licu, nogama i rukama, povišene temperature 37,8 °C i kašlja. Rendgenska snimka srca i pluća ukazivala je na desnostrani pleuralni izljev. SE je bila 92 mm/h, CRP 111 mg/ml. Hemokulture na bakterije bile su negativne, a empirijsko liječenje gentamicinom i amoksicilinom s klavulonskom kiselinom neučinkovito. Učinjeni su i laboratorijski testovi koji su ukazivali na pozitivna ANA (1:320), anti-ds-DNA (64,6), te snižene C3 i C4 komponente komplementa. Bubrežni i jetreni testovi bili su normalni. Smatrali smo da se kod

bolesnice radi o sindromu *lupus like* i prekinuli liječenje infliksimabom, a povišili dozu metilprednizolona. Međutim, i nakon više od godinu dana, usprkos terapiji MTX-om 17,5 mg tjedno i metilprednizolonom 12 mg dnevno, bolesnica je imala aktivni poliartritis, fotosenzitivan osip te pozitivna protutijela ANA i anti-ds-DNA.

Gledajući ukupan broj bolesnika kod kojih su se javile nuspojave, uzimajući u obzir da su se kod nekih bolesnika javile više puta, 11 (45,83 %) ih je imalo neku nuspojavu.

#### 4.3.4 Nuspojave u usporednim skupinama

U skupini liječenih salazopirinom najčešće je zabilježen porast vrijednosti transaminaza. Učestalost javljanja pojedinih nuspojava pokazuje tablica 14.

Tablica 14: Učestalost pojedinih nuspojava tijekom terapije salazopirinom (učestalost se ne razlikuje statistički značajno, Pearson  $\chi^2$  test,  $p=0,37$ )

Nuspojava	Tjedan					
	0	6	22	38	54	62
Nema	23	22	21	18	18	20
Alergijska reakcija	0	1	0	0	0	0
Infekcija	0	0	0	1	1	0
Porast transaminaza	0	0	0	2	1	0
Mučnina	0	0	1	0	0	0
zbroj	23	23	22	21	20	20

U skupini bolesnika s RA liječenih MTX-om također je najčešće zabilježen porast transaminaza, a dvije infekcije (od kojih je jedna bila upala pluća, a druga infekcija mokraćnog trakta) zahtijevale su antibiotsku terapiju (tablica 15).

Tablica 15: Učestalost pojedinih nuspojava tijekom terapije metotreksatom (učestalost se ne razlikuje statistički značajno, Pearson  $\chi^2$  test,  $p=0,38$ ).

Nuspojava	Tjedan					
	0	6	22	38	54	62
Nema	23	22	21	19	21	21
Infekcija	0	0	1	1	0	0
Porast transaminaza	0	0	1	2	0	0
Mučnina	0	1	0	0	0	0
zbroj	23	23	23	22	21	21

U skupini koja je primala MTX I SZP također je najčešće zabilježen porast transaminaza (tablica 16).

Tablica 16: Učestalost pojedinih nuspojava tijekom terapije salazopirinom i metotreksatom (učestalost se ne razlikuje statistički značajno, Pearson  $\chi^2$  test,  $p=0,45$ ).

Nuspojava	Tjedan					
	0	6	22	38	54	62
Nema	23	21	21	20	21	21
Glavobolja	0	1	0	0	0	0
Porast transaminaza	0	1	1	2	0	0
zbroj	23	23	22	22	21	21



#### 4.3.5 Usporedba javljanja nuspojava u ispitivanoj i usporednim skupinama

Da bi lakše usporedili nuspojave kod skupine bolesnika liječenih infliksimabom s usporednim skupinama, grupirali smo bolesnike s nuspojavama u kategorije, pa tako kategorija A obuhvaća bolesnike kod kojih su se javile alergijske i infuzijske reakcije, skupina B: infekcije, a skupina C: porast transaminaza i gastrointestinalnu nepodnošljivost. Sindrom *lupus like* nismo uzeli u obzir.

Tablica 17: Kontingencijska tablica javljanja pojedinih nuspojava u svim skupinama. Nuspojave su grupirane: A=alergijska i infuzijska reakcija, B=infekcije, C= povišene transaminaze i GIT nepodnošljivost

Skupina	Nuspojava			zbroj
	A	B	C	
Infliksimab	8	2	0	10
SZP	1	2	4	7
MTX	0	2	4	6
SZP+MTX	1	0	4	5
ukupno	10	6	12	28

Iz tablice 17 možemo vidjeti da je statistički značajno veći udio bolesnika s nuspojavama A (alergijskih reakcija) u odnosu na bolesnike s nuspojavama C (GIT smetnje, porast transaminaza) u skupini koja je primala infliksimab u odnosu na ostale skupine, odnosno da je značajno veći udio bolesnika s gastrointestinalnim nuspojavama (C) u odnosu na one s alergijskim nuspojavama (A) u skupinama koje su primale SZP, MTX ili SZP+MTX u odnosu na skupinu koja je primala infliksimab ( $\chi^2$  test,  $p=0,0001$ ).

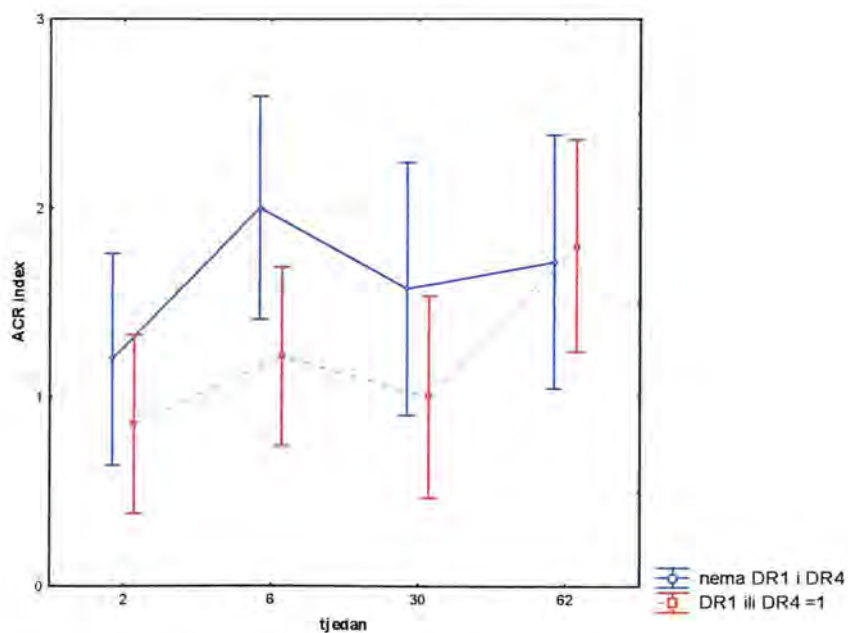


#### 4.4 Uspjeh liječenja i učestalost javljanja protutijela u odnosu na HLA

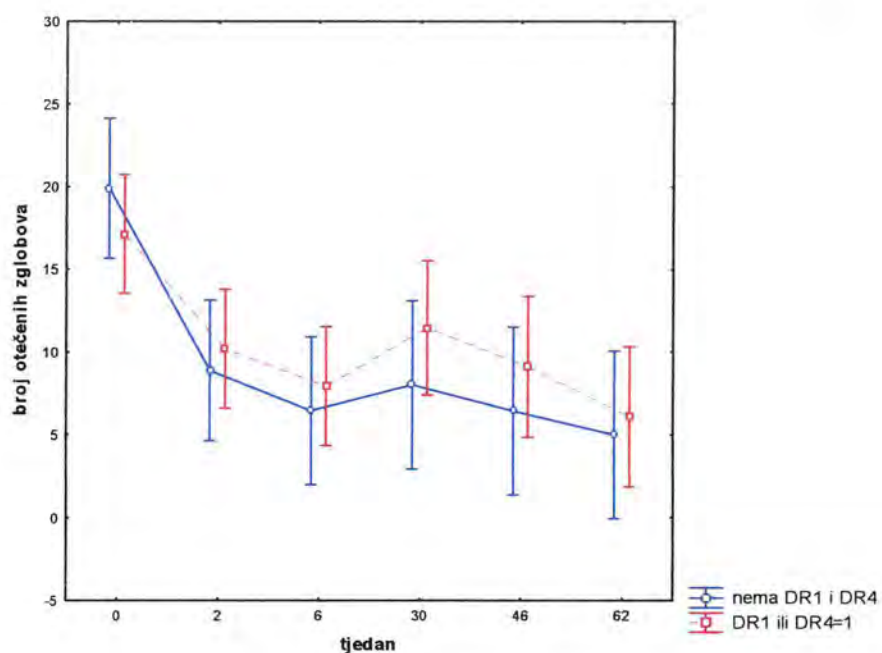
##### 4.4.1 Bolesnici s DR1 i/ili DR4

S obzirom na povezanost alela DR1 i DR4 s težom klinčkom slikom RA zanimalo nas je da li postoji razlika u učinkovitosti liječenja između bolesnika koji imaju i onih koji nemaju ta genska obilježja (DR1 i/ili DR4). 13 bolesnika ima gensko obilježje DR1 i/ili DR4, a 11 ih nema. Faktorska analiza varijanci pokazuje da nema statistički značajne razlike ( $p=0,49$ ) u ACR indeksu (slika 32) bolesnika sa označenim genskim obilježjima tijekom promatranog vremena.

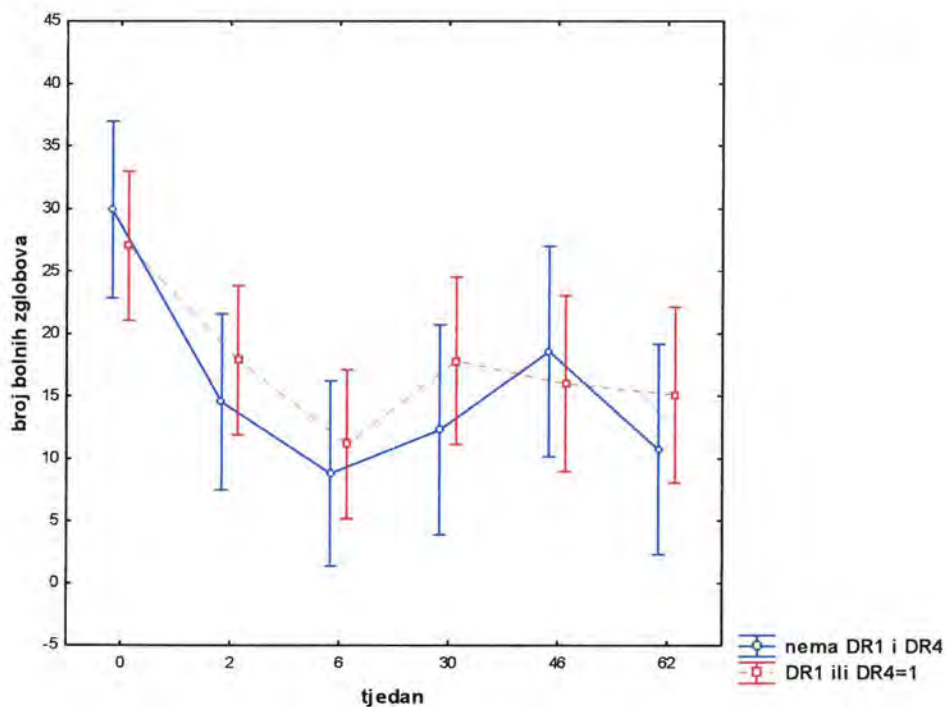
Isto tako, bolesnici sa DR1 i/ili DR4 nisu imali statistički značajno veći broj niti otečenih ( $p=0,75$ ) (slika 33), niti bolnih ( $p=0,78$ ) (slika 34) zglobova tijekom promatranog vremena.



Slika 32: Indeksi ACR bolesnika s obzirom na DR1 i DR4 u promatranim razdobljima.



Slika 33: Broj otečenih zglobova s obzirom na DR1 i DR4 u promatranim razdobljima.



Slika 34: Broj bolnih zglobova s obzirom na DR1 i DR4 u promatranim razdobljima

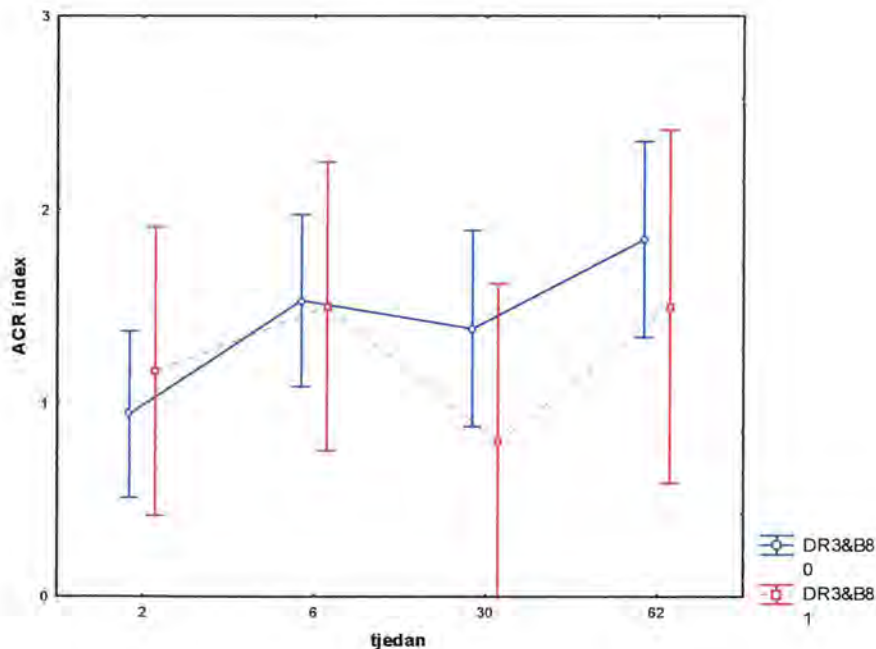
Učestalost javljanja ANA s obzirom na gensko obilježje DR1i/ili DR4 ne pokazuje statistički značajnu razliku (u svim tjednima mjerenja) kao niti učestalost javljanja protutijela anti-ds-DNA.

Također, nema razlike u prijevremenom prekidu terapije između bolesnika s DR1 i/ili DR4 i onih bez tih genskih obilježja.

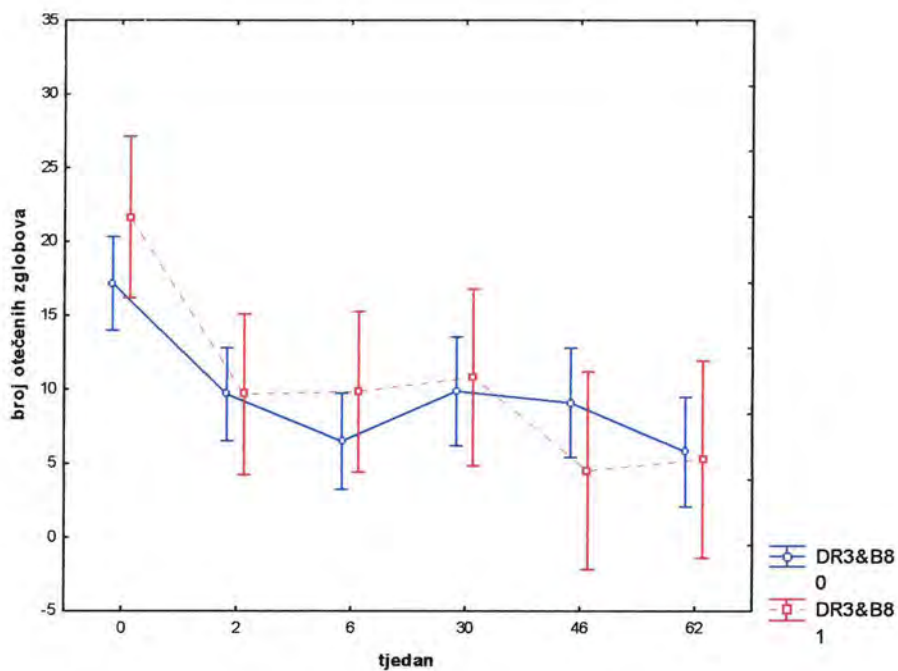
#### 4.4.2 Bolesnici s B8DR3

S obzirom na sklonost oboljevanju od sistemskog eritemskog lupusa, posebno smo izdvojili i bolesnike s genskim obilježjem B8DR3. Takvih bolesnika je šest. Faktorska analiza varijanci pokazuje da nema statistički značajne razlike u ACR-indeksu između bolesnika s navedenim genima i bez njih tijekom promatranog vremena ( $p=0,622$ ) (slika 35).

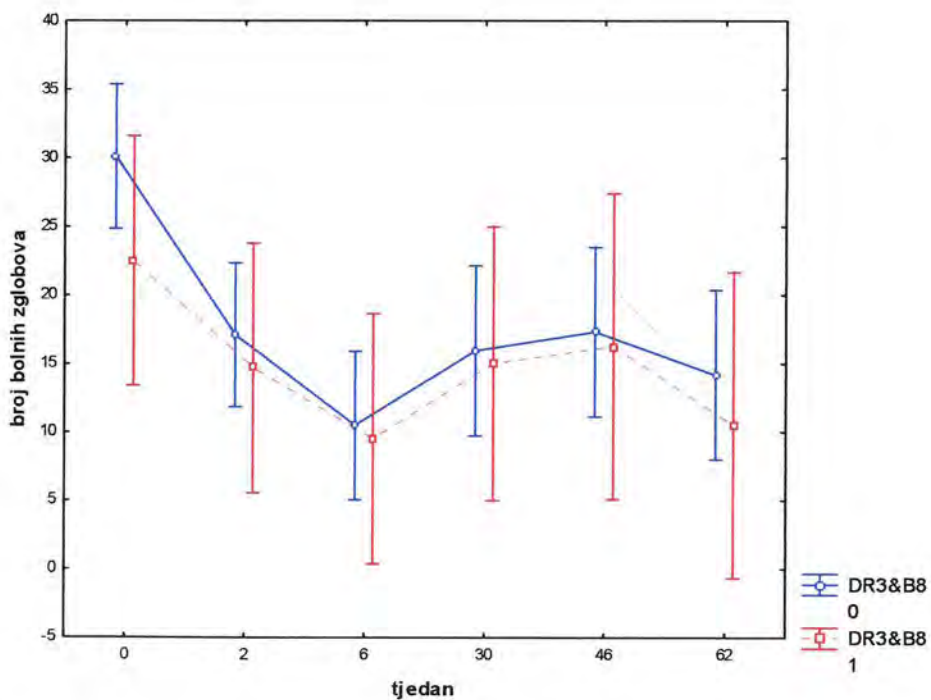
Također, nema statistički značajne razlike niti u broju otečenih zglobova ( $p=0,54$ ) (slika 36), niti u broju bolnih zglobova ( $p=0,95$ ) (slika 37) između bolesnika s tim genskim obilježjima i bez njih tijekom cijelog promatranog razdoblja od 62 tjedna.



Slika 35. ACR-indeksi bolesnika s obzirom na B8DR3 u promatranim razdobljima



Slika 36: Broj otečenih zglobova s obzirom na B8DR3 u promatranim razdobljima.



Slika 37: Broj bolnih zglobova s obzirom na B8DR3 u promatranim razdobljima

Učestalost pozitivnih nalaza ANA s obzirom na gensko obilježje B8DR3 ne pokazuje statistički značajnu razliku u svim tjednima mjerenja (tablica 18), jednako kao niti učestalost javljanja protutijela anti-ds-DNA (tablica 19).

Tablica 18: Učestalost ANA pozitivnih nalaza s obzirom na gensko obilježje B8DR3

	ANA									
	Tjedan 2		Tjedan 6		Tjedan 22		Tjedan 38		Tjedan 62	
B8DR3	neg	poz	neg	poz	neg	poz	neg	poz	neg	poz
nema	15	3	13	4	6	9	3	10	2	11
ima	5	1	6	0	3	3	0	4	1	3
zbroj	20	4	19	4	9	12	3	14	3	14
p (Fisher)	0,71		0,27		0,52		0,42		0,58	

Tablica 19: Učestalost pozitivnih nalaza anti-ds-DNA s obzirom B8DR3

	Anti-ds-DNA									
	Tjedan 2		Tjedan 6		Tjedan 22		Tjedan 38		Tjedan 62	
B8DR3	neg	poz	neg	poz	neg	poz	neg	poz	neg	poz
nema	17	1	16	1	10	5	6	7	7	6
ima	6	0	6	0	4	2	1	3	2	2
zbroj	23	1	22	1	14	7	7	10	9	8
p (Fisher)	0,75		0,74		0,69		0,44		0,66	

Takoder, nema razlike u prijevremenom prekidu terapije između onih s B8DR3 i onih bez tih genskih obilježja.



## 5 RASPRAVA

Iako se u zglobovima bolesnika s RA mogu naći mnogi citokini, najznačajniju ulogu u pokretanju složene citokinske mreže odgovorne za patogenezu RA ima TNF $\alpha$  (68-70, 196-203). Isto tako, TNF $\alpha$  se smatra jednim od ključnih citokina u patogenezi Crohnove bolesti (196, 201). S obzirom na tu spoznaju, moderna farmaceutska industrija proizvela je nove, biološke lijekove s ciljem neutraliziranja aktivnosti TNF $\alpha$ . U laboratorijima Kennedy Instituta u Londonu, Ravinder Maini i Marc Feldmann su 90-ih godina XX. stoljeća konstruirali infliksimab - kimeričko (humano/mišje) protutijelo koje se s velikom specifičnošću veže za ljudski TNF $\alpha$ . Budući da je on dobiven iz murinih protutijela koja su odgovorna za njegovu imunogeničnost i nepredvidivu farmakokinetiku, trebalo je razviti molekulu koja je dominantno izgrađena od ljudskih aminokiselina (234). Tako je 75% infliksimaba humani protein IgG1 koji je odgovoran za njegove učinke, dok je preostalih 25 % mišji protein. Infliksimab formira vrlo stabilne komplekse sa solubilnim i površinskim TNF $\alpha$ -receptorima i to ga razlikuje od etanercepta (235).

Infliksimab je prvi put primijenjen u liječenju RA 1993., a ubrzo zatim i u liječenju Crohnove bolesti gdje se najčešće primjenjuje kod fistulirajućih oblika. Nakon brojnih kliničkih istraživanja, FDA (od engl. Food and Drug Administration) odobrila ga je za primjenu kod Crohnove bolesti u listopadu 1998, a za RA u studenom 1999. Etanercept, za razliku od infliksimaba, nema učinak na Crohnovu bolest, a to se tumači sposobnošću infliksimaba da pokrene liziranje stanica koje ekspimiraju TNF $\alpha$  putem citotoksičnog mehanizma ovisnog o komplementu (235). Nova saznanja o ulozi infliksimaba u Crohnovoj bolesti govore da upravo on inducira apoptozu cirkulirajućih monocita i limfocita T u lamini propriji tih bolesnika (236).

Zbog svog odličnog protuupalnog učinka danas se infliksimab sve više primjenjuje i u drugim upalnim artropatijama, tako da je u Europi danas odobren i za liječenje ankilozantnog spondilitisa (237,238). Postoje i klinička istraživanja koja su dokazala njegov učinak u liječenju psorijatičnog artritisa (239), Behcetove bolesti (240) i Sjogrenova sindroma (241), a objavljeni su i radovi (uglavnom prikazi slučajeva) u kojima se uspješno primjenjivao u liječenju Takayasujeva arteritisa,

temporalnog arteritisa (242), polimiozitisa (243), polihondritisa (244), sarkoidoze (245), sistemske skleroze, sekundarne amiloidoze, Kawasakijske bolesti (246), sindroma SAPHO (247) i Stillove bolesti odrasle dobi (248).

Trenutačne preporuke za primjenu u RA, odnose se na bolesnike s RA koji imaju aktivnu bolest usprkos MTX-u (207-210,237). Postoje i klinička istraživanja u kojima se infliksimab uspješno primjenjivao u oboljelih od RA koji nikad nisu uzimali MTX (206). Iako se u konsenzusu o biološkim lijekovima u liječenju RA iz svibnja 2003. (237) navodi da je liječenje ranog RA s lijekovima koji su usmjereni prema TNF $\alpha$ , kao prvim DMARDs u razmatranju i ograničeno nedovoljnim saznanjima o njegovoj dugoročnoj učinkovitosti, neškodljivosti i ekonomskim faktorima (204), nedavno objavljeni rad Breedvela i suradnika donosi vrlo zanimljive podatke o odličnoj učinkovitosti i sprečavanju radiološkim metodama vidljivih oštećenja kosti u bolesnika s ranim RA liječenih infliksimabom i MTX-om tijekom dvije godine (249).

Naši rezultati pokazuju prva iskustva s primjenom infliksimaba u hrvatskih bolesnika s RA. S obzirom da su bolesnici praćeni tijekom 62 tjedna, oni pridonose boljem razumijevanju učinka pojedinih citokina i drugih laboratorijskih pokazatelja na klinički tijek RA, te ukazuju na moguće neželjene učinke te terapije i opasnost od stvaranja protutijela. Kako je već ranije napomenuto, u naših smo bolesnika pratili promjenu razine SE, CRP-a, IL-6, sTNF $\alpha$  i IL-10, te različite kliničke pokazatelje. Također smo pratili učestalost pojave različitih protutijela i to: ANA, protutijela anti-ds-DNA, ENA i ACLA.

Iako brojčano malena, vjerujemo da naša kohorta bolesnika predstavlja reprezentativnu skupinu iz svakodnevne kliničke prakse. Prosječna dužina trajanja bolesti u naših bolesnika bila je  $5,9 \pm 3,8$  godina što je uglavnom slično kao i u istraživanjima drugih autora (201,208,210), iako postoje i radovi koji obuhvaćaju bolesnike kod kojih bolest traje znatno duže (250). Naši bolesnici imali su vrlo izraženu aktivnost bolesti, što potvrđuje i podatak o prosječnoj dnevnoj dozi prednizona od  $10,47 \pm 5,26$  mg, što je više od prihvatljive doze za dugotrajno liječenje RA i više nego kod drugih autora (201,208,250). Svi naši bolesnici uzimali su MTX u tjednoj dozi, prosječno:  $10,37 \pm 3,25$  mg. To je obvezatna praksa zbog saznanja da MTX značajno smanjuje stvaranje antikimeričkih protutijela

na mišju komponentu infliksimaba (201,251). Dodatno, MTX omogućuje bolju imunološku toleranciju infliksimaba te doprinosi njegovoj stabilnijoj serumskoj koncentraciji (208). Poznato je da je MTX najdjelotvorniji "klasični" DMARD pa doprinosi boljem kliničkom odgovoru i zbog svog dodatnog imunosupresivnog djelovanja (189).

Za procjenu kliničkog učinka liječenja infliksimabom upotrebljavali smo niz kliničkih i laboratorijskih pokazatelja (vidi Bolesnici i metode). Te pokazatelje koristili smo za izračunavanje indeksa ACR (208, 212, 231). S obzirom da postojeći konsenzus o biološkoj terapiji u RA (237) preporučuje korištenje ACR-indeksa u kliničkim istraživanjima, dok u kliničkoj praksi sugerira druge vrste mjerenja aktivnosti bolesti, naše rezultate smo izražavali na oba načina.

Tijekom primjene infliksimaba vrlo dobar klinički odgovor bilježi se već nakon 1. infuzije i to naročito dolazi do izražaja u skraćenju jutarnje zakočenosti te smanjenju broja bolnih i otečenih zglobova. Subjektivne procjene bolesnika koje su obuhvaćale bol i težinu bolesti također pokazuju odličan učinak prve doze lijeka. Kod većine bolesnika taj dobar učinak prve terapije je zadržan tijekom cijelog razdoblja, iako se u razdoblju nakon 6. tjedna, kad razmak između aplikacija lijeka postaje veći, uočava ponovni porast broja bolnih zglobova. Slične rezultate i dobar učinak prve terapije opisuju i drugi autori (198, 200, 201, 210).

S dužom primjenom infliksimaba raste broj bolesnika koji su ostvarili ACR50 i ACR70 te je njihov broj statistički značajno viši u 62. tjednu u odnosu na 2. tjedan. Gledajući postotak bolesnika koji su ostvarili ACR50 i ACR70 bitno je uočiti da se on ne razlikuje statistički značajno između 6. tjedna i 62. tjedna, što govori da bolesnici koji rano postignu odličan učinak zadržavaju isti kroz duže vrijeme. Nadalje, i broj onih koji su ostvarili ACR20 s vremenom raste, tako da je u 62. tjednu samo jedan naš bolesnik označen kao *non responder*. Naši rezultati uglavnom su sukladni rezultatima bolesnika koji su primali istu dozu lijeka (3mg/kg) u istim vremenskim razdobljima, a obuhvaćeni su velikom studijom ATTRACT (od engl. Anti-Tumor necrosis factor Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy) (208). Razlika postoji u dosegu ACR50 na 54. odnosno 62. tjednu s obzirom da je u ATTRACT-u on ostvaren u znatno manjem postotku. Uzrok toj razlici vjerojatno treba tražiti u znatno većem broju bolesnika koji su bili obuhvaćeni ATTRACT-om (208).

S obzirom na činjenicu da infliksimab neutralizira biološko djelovanje  $TNF\alpha$ , ključnog citokina u RA, zanimalo nas je kako ta blokada utječe na kretanje ostalih cirkulirajućih citokina i CRP-a. Takva istraživanja daju nove podatke i omogućavaju bolje razumijevanje kompleksne citokinske mreže *in vivo*. Kako se i očekivalo, primjena infliksimaba rezultira normalizacijom mnogih proupalnih citokina.

To se najbolje uočava naglim padom IL-6 već nakon prve doze lijeka. S obzirom na dobru bioaktivnost IL6 i njegovu sposobnost djelovanja na udaljene organe, ta nagla supresija IL-6 čini se najodgovornija za značajno poboljšanje općeg stanja bolesnika i značajno smanjenje umora. Serumska razina IL-6 bila je značajno povišena kod naših bolesnika prije liječenja, a nakon naglog pada u 2. tjednu imala je vrlo blagu tendenciju porasta do kraja liječenja, što je u skladu s dobrim kliničkim odgovorom u našoj skupini bolesnika. Slične rezultate potvrdili su i drugi autori (198,199,211,251, 252).

S obzirom da oni ELISA testovi koji su nama bili dostupni mjere i neaktivan  $TNF\alpha$  vezan za infliksimab (211), mi smo se odlučili za proučavanje koncentracije solubilnih receptora za  $TNF\alpha$  (sTNFR) tijekom primjene infliksimaba. Srednja vrijednost sTNFR kod naših bolesnika prije početka terapije bila je vrlo visoka, a naglo je pala već u drugom tjednu i zadržala taj trend tijekom cijelog razdoblja liječenja. Istraživanja drugih autora uglavnom su uzimala u obzir znatno kraće razdoblje liječenja (233), a naši rezultati ukazuju da i IL-6 i sTNFR zadržavaju značajno niže vrijednosti u odnosu na one prije terapije, tijekom cijelog razdoblja liječenja (u našem slučaju 62 tjedna).

S obzirom na spoznaju da citokini Th 2, a naročito IL-10, imaju važnu imunomodulatornu ulogu, jer mogu inhibirati protupalne citokine, a eksperimentalni modeli ukazuju da određeni klonovi stimuliranih T-stanica u prisustvu anti- $TNF\alpha$  mogu producirati IL-10, naročito nas je zanimala dinamika kretanja tog citokina tijekom liječenja infliksimabom. U rezultatima Oshime i suradnika (211) serumska koncentracija IL-10 je u svih bolesnika prije početka terapije infliksimabom bila povišena, da bi u 4 bolesnika s dobrim i produženim kliničkim odgovorom došlo do dodatnog povećanja koncentracije tog citokina. Ti rezultati ukazuju na moguću povezanost povišenih vrijednosti IL-10 s dugotrajnim djelovanjem infliksimaba. Drugi autori (233), doduše, nisu našli značajne



promjene u vrijednostima IL-10 tijekom liječenja infliksimabom. U naših bolesnika nismo zabilježili statistički značajno povećanje koncentracije IL-10.

Recentni podaci ukazuju da u bolesnika s RA liječenih infliksimabom dolazi do značajnog smanjenja IL-18 (253) što ukazuje da je i lučenje tog citokina pod kontrolom TNF $\alpha$ . Međutim IL-18 je i vrlo značajan u imunopatogenezi SLE te je poznato da on najbolje od svih citokina korelira sa aktivnošću te bolesti, naročito s bubrežnim oštećenjem (254). To može izgledati u suprotnosti s činjenicom da infliksimab može inducirati *lupus like* sindrom ali i u skladu sa spoznajom da kod takvih slučajeva nikad nisu opisana oštećenja CNS-a i bubrega (213, 216, 217).

S druge strane, infliksimab ne utječe na razinu nekih citokina, kao što je npr. TGF $\beta$ . To je začuđujuće s obzirom da se i IL-1 i IL-6 opisuju kao pokretači oslobađanja TGF $\beta$ , a na njihovu razinu anti-TNF $\alpha$  terapija itekako utječe (255). To otvara nove dileme ali zahtijeva i nove terapijske mogućnosti za bolesnike kod kojih se primjena anti-TNF $\alpha$  pokazala neučinkovita te naglašava važnost ovakvih istraživanja.

Rezultati korelacija CRP, IL-6 i sTNFR s kliničkim odgovorom, odnosno ACR-indeksom i brojem otečenih i bolnih zglobova, ukazuju na to da oni bolesnici koje smo okarakterizirali kao *non-respondere* imaju značajno viši CRP i značajno viši IL-6 tijekom čitavog promatranog razdoblja od *respondera*, dok se, začuđujuće, vrijednosti sTNFR ne razlikuju kod jednih i drugih.

Imajući u vidu da liječenje infliksimabom ne dovodi uvijek do dugotrajne remisije, postoji nekoliko radova u kojima se pokušavalo utvrditi koji laboratorijski nalazi mogu predskazati bolji, odnosno lošiji klinički odgovor. St Clair i suradnici ukazuju da će oni s visokom serumskom razinom infliksimaba imati bolji klinički odgovor (234,256). Međutim, nema mnogo podatka o tome kako bazični citokinski profil bolesnika s RA utječe na uspjeh liječenja. Marotte i suradnici navode da visoke vrijednosti CRP-a prije liječenja utječu na bolji ishod liječenja u bolesnika s RA (257), dok je u recentnoj studiji praćenja razine pojedinih citokina kod bolesnika s ankilozantnim spondilitisom (AS) liječenih infliksimabom ustanovljeno da bolji klinički odgovor na terapiju imaju bolesnici s bazično visokom razinom CRP-a i TNF $\alpha$ , a slabiji oni s niskim bazičnim CRP-om, te visokim vrijednostima IL-1 i IL-10 (258).



Već je rečeno da su St Clair i suradnici (256), uzimajući u obzir veliki broj bolesnika uključen u ATTRACT, ukazali na činjenicu da će bolesnici s visokom serumskom razinom infliksimaba imati bolji klinički odgovor. Ti bolesnici često su trebali dozu infliksimaba veću od 3 mg/kg za postizanje supresije proupalnih citokina i dobrog kliničkog odgovora. Međutim, još češće je kod njih zabilježena potreba za primjenom infliksimaba učestalije nego što je uobičajeno, dakle češće od svakih 8 tjedana.

Sidiropoulos i suradnici (250) ukazuju na potrebu za titracijom doze infliksimaba kako bi se postigao bolji klinički učinak, a kao metodu procjene aktivnosti bolesti preporučuju DAS (od engl. disease activity score). Do sličnog zaključka došli su Den Boder i suradnici primjenjujući adalimumab (259). Čini se, dakle, da je ipak najbitnija individualna procjena.

S obzirom da je poznato da bolesnici s alelima DR1 i DR4 imaju teži oblik RA (17-19), zanimalo nas je postoji li utjecaj tih gena na klinički odgovor u naših bolesnika liječenih infliksimabom. U literaturi nema takvih podataka, a naše istraživanje nije pokazalo različit odgovor (ACR-indeks) na terapiju infliksimabom s obzirom na prisutnost navedenih gena.

Različite studije primjene infliksimaba u liječenju RA ukazuju na različitu incidenciju pojavljivanja protutijela tijekom liječenja (201, 213-215, 235, 260).

S obzirom da su kod bolesnika s RA pozitivna ANA prisutna u 20-40 % slučajeva neovisno o terapiji koju primaju (144,164), prije početka liječenja potrebno je odrediti status ANA. U velikoj studiji u kojoj su Charles i suradnici ispitivali učestalost pojavljivanja ANA i protutijela anti-ds-DNA tijekom liječenja infliksimabom u 159 bolesnika s RA, 29% bolesnika s RA imalo je pozitivna ANA prije terapije, dok je u placebo skupini bilo 30% ANA-pozitivnih bolesnika (213). Nakon liječenja 53% bolesnika imalo je pozitivna ANA. Međutim, to istraživanje nije usporedivo s našim, ne samo zbog broja uključenih bolesnika, već i zato što su doze infliksimaba ovdje bile različite (od 1-10 mg/kg), lijek primjenjivan u kraćim vremenskim razmacima, a razdoblje praćenja bilo je znatno kraće (najviše 14 tjedana). U kombiniranim rezultatima tri studije (235), uključujući i istraživanje De Ryckea (260) i suradnika koji su pratili pojavu ANA kod bolesnika sa spondiloartropatijama liječenih infliksimabom, učestalost pojavljivanja ANA bila je od 23,7% - 51,6% prije početka liječenja, do 53% - 82,2% nakon liječenja infliksimabom. Tijekom 62-tjednog praćenja, uzimajući u obzir sve naše

bolesnike, u 87,5% pojavila su se ANA. Pojava ANA najčešće je zabilježena u 14. tjednu liječenja, kao i kod većine drugih autora. U naših bolesnika koji nisu liječeni infliksimabom, već drugim DMARD, promjena učestalosti javljanja ANA nije bila statistički značajna. Tu je uočena promjenjivost ANA- statusa (iz negativnog u pozitivno, iz pozitivnog u negativni) što je opisano i u literaturi (261).

S obzirom na specifičnost protutijela anti-ds-DNA i njegovu moguću povezanost s *lupus like* - sindromom tj. lijekom iduciranim lupusom (DIL, od engl. drug-induced lupus), od posebnog je interesa praćenje njegove indukcije infliksimabom.

U (NZBxNZW)F1 mišjem modelu SLE dokazana je niska produkcija TNF $\alpha$ . U pokusima u kojima su ti miševi tretirani s TNF $\alpha$  dolazilo je do poboljšanja nefritisa, ali nije bilo promjena razine anti-ds-DNA (262). Smatra se da mehanizam indukcije anti-ds-DNA ne ovisi samo o niskoj razini TNF $\alpha$ , kako su sugerirali neki raniji pokusi na mišjem modelu SLE, nego upravo o prisutnosti protutijela na TNF $\alpha$ . Vezanjem infliksimaba na stanice s receptorima TNF $\alpha$  inducira se apoptoza i oslobađanje nuklernog antigena. S obzirom da blokada TNF $\alpha$  snizuje razinu CRP-a koji sudjeluje u čišćenju apoptotičkog materijala, upravo će kod bolesnika koji su tretirani infliksimabom biti prisutno obilje imunogenetičkog materijala (213, 262).

Međutim, ta protutijela su različitih izotipova i imunokemijskih osobitosti, a većina njih nisu patogena. Poznato je da i kod idiopatskog SLE prisutnost anti-ds-DNA ne predskazuje uvijek tijek bolesti s obzirom da mnoga anti-ds-DNA-protutijela nemaju nefrotoksična niti patogenetska obilježja (263). Važno je naglasiti da detekcija anti-ds-DNA-protutijela izuzetno ovisi o testu koji se koristi. Od otkrića protutijela anti-ds-DNA prošlo je više od 40 godina, međutim još nema standardizirane rutinske metode za njegovo određivanje. Svaki od dostupnih testova za anti-ds-DNA (kao npr. Farr radioimunoesej-RIA, *Crithidia luciliae* imunofluorescentni test-CLIFT, ELISA) otkriva samo dijelove spektruma anti-ds-DNA tako da anti-ds-DNA može biti jednim testom identificiran, a drugim ne. CLIFT se smatra najspecifičnijim testom za otkrivanje anti-ds-DNA kod aktivnog lupusa (213,263) ELISA testovi imaju najmanju specifičnost, a najveću senzitivnost.

Različite studije bilježe različitu incidenciju anti-ds-DNA tijekom liječenja infliksimabom (213,235,237,260). Niti u jedno istraživanje nisu bili uključeni bolesnici s pozitivnim anti-ds-DNA-protutijelima. U studiji Charlesa i suradnika kod 22 od 156 (14%) bolesnika s RA liječenih infliksimabom detektirana su protutijela anti-ds-DNA koristeći CLIFT, dok je RIA ukazao na pozitivna anti-ds-DNA-protutijela u svega 7 bolesnika. Sva anti-ds-DNA-protutijela, osim kod jednog bolesnika, bila su klase IgM (213). U istraživanju De Ryckea i suradnika (260) koje je obuhvaćalo i bolesnike sa spondiloartopatijama ta učestalost iznosila je 20,9% nakon 44 tjedna. U naših bolesnika učestalost javljanja anti-ds-DNA protutijela je bila znatno veća. Uzimajući u obzir ukupan broj naših bolesnika, anti-ds-DNA protutijelo registrirali smo u 66,7% slučajeva. Vjerojatni razlog tome je znatno duže razdoblje liječenja naših bolesnika s obzirom da je najveći porast anti-ds-DNA protutijela zabilježen u 38. tjednu. Drugi je razlog možda i taj što smo mi upotrebljavali manje specifične, ELISA testove.

Također, incidencija anti-ds-DNA-protutijela kod naših bolesnika liječenih infliksimabom bila je statistički značajno veća nego u našim usporednim skupinama koje su primale druge DMARD. Indukcija protutijela, pogotovo anti-DNA, opisana je i kod liječenja različitim drugim lijekovima. Od DMARD koji do nje dovode najčešće se spominje sulfasalazin odnosno salazopirin (264). U naših bolesnika liječenih SZP-om bilježimo blagi porast anti-ds-DNA koji nije statistički značajan.

Indukcija anti-ds-DNA tijekom liječenja infliksimabom i etanerceptom od posebnog je interesa zbog mogućih kliničkih posljedica, u prvom redu *lupus like*-sindroma. Od 2000. do danas nekoliko takvih slučajeva je opisano (213-219). U Charlesovoj studiji jedna je bolesnica razvila kliničku sliku *lupus like*-sindroma (perikarditis, pogoršanje artritisa, osip) i to upravo ona kod koje su anti-ds-DNA -protutijela bila klase IgG, IgM i IgA. Bitno je napomenuti da je ta bolesnica imala negativna ANA prije započinjanja terapije. U nekoliko slučajeva u kojima je opisan DIL induciran infliksimabom ANA su bila pozitivna prije početka liječenja (215,216), a u nekima nepoznata (214,218). Iako se u najnovijem konsenzusu o biološkoj terapiji u liječenju RA iz svibnja 2003. (237) navodi da usprkos sporadičnim slučajevima DIL-a, bolesnici kod kojih se jave ANA i anti-ds-DNA nemaju statistički značajno veći rizik za oboljevanje od DIL-a, taj problem ostaje kontroverzan. Neki autori predlažu da kod bolesnika s najmanje dva, bilo klinička, bilo laboratorijska, kriterija za SLE, anti-TNF $\alpha$  terapiju ne treba ni počinjati (216).

Međutim, i sama definicija DIL-a također je podložna raspravi, pogotovo kad je riječ o antireumatskim lijekovima kao njegovim potencijalnim uzročnicima. Iako je DIL poznat više od 50 godina, formalni dijagnostički kriteriji za taj sindrom ne postoje (265). Četrdesetak lijekova koji su trenutno u upotrebi mogu uzrokovati sistemske reumatske simptome koji se mogu okarakterizirati kao DIL. Simptomi (artralgiya, mialgiya, umor, povišena tjelesna temperatura, serozitis) se javljaju nakon nekoliko mjeseci ili godina uzimanja lijeka. U laboratorijskim nalazima može se javljati leukopenija, trombocitopenija, anemija, a snižena razina komplementa je vrlo rijetka. Bolesnici s DIL-om često ne ispunjavaju kriterije ACR za SLE. Diskoidni osip, alopecija te bubrežna i neurološka oštećenja su u DIL-u vrlo rijetka. ANA su često prisutna ali ne i obvezatna i, kako je već ranije rečeno, mnogi lijekovi mogu inducirati ANA bez znakova DIL-a. Anti-histonska protutijela, pogotovo IgG anti-(H3A-H2B)-DNA, su često, ali ne obvezatno prisutna kod bolesnika sa DIL-om (265). Najznačajnim dijagnostičkim kriterijem za DIL smatra se povlačenje simptoma i laboratorijskih abnormalnosti nakon prestanka uzimanja lijeka.

Naša bolesnica imala je RA s erozivnim promjenama 20 godina prije uvođenja liječenja infliksimabom. U tom razdoblju nikad nije imala kliničke i laboratorijske simptome karakteristične za SLE, iako je u razdoblju kada je primala SZP imala blago pozitivna ANA. Tridesetak dana nakon četvrte infuzije infliksimaba ona je razvila kliničku sliku akutnog lupusa. Ako artritisa i ne uzmemo u obzir, ona je tada ispunjavala kriterije ACR za SLE (fotosenzitivan osip, pleuralni izljev te pozitivna ANA i anti-ds-DNA). U tom trenutku bili smo sigurni da je ona razvila DIL. Međutim, daljnje praćenje bolesnice ukazalo je da ukidanje infliksimaba nije dovelo, ni nakon više od godinu dana, niti do potpunog povlačenja kliničke slike, niti do povlačenja anti-ds-DNA protutijela. Stoga je dijagnoza DIL-a upitna. Smatramo da je kod naše bolesnice infliksimab inducirao sindrom preklapanja (RA+SLE) koji do tada nije bio klinički vidljiv (266). Tome u prilog govori i B8DR3 haplotip ove bolesnice, s obzirom da je on često prisutan kod SLE. Doduše, u našem istraživanju nismo našli statistički značajnu razliku u pojavi ANA i anti-ds-DNA protutijela kod bolesnika s B8 i DR3 u odnosu na one koji nemaju te gene.

U literaturi nismo našli opisan slučaj sličan našem. Moguće je da dio slučajeva DIL-a induciranih infliksimabom opisanih u literaturi također pripada ovoj kategoriji bolesnika ali da nisu



prepoznati. Svi DIL inducirani infliksimabom opisani u literaturi bili su liječeni na taj način da se osim ukidanja infliksimaba povećala doza glukokortikoida (kod nekih je tek tada uvedena), pa je vjerojatno i to maskiralo daljnju kliničku sliku. Iz toga proizlazi potreba za znatno dužim praćenjem bolesnika prije nego što se razjasni o kojem sindromu je zapravo riječ.

Kod naših bolesnika javio se i statistički značajno veći broj ENA-protutijela koji se povećavao s duljinom primjene infliksimaba, dok se u literaturi njihova pojava opisuje vrlo rijetko (260, 267). Najčešće se radilo o podfrakcijama SS-A, SS-B i Sm/RNP, ali s obzirom da ih nismo bili uvijek u mogućnosti odrediti, ne možemo sa sigurnošću odrediti njihovo kliničko značenje. Ipak, dojam je da ono nije veliko. Međutim, imajući u vidu bolesnicu kod koje mislimo da je infliksimab demaskirao sindrom preklapanja, neophodno je pažljivo praćenje tih bolesnika s ENA protutijelima, pogotovo onih sa specifičnim podfrakcijama kao što su Sm i RNP.

Neka istraživanja, međutim, ustanovila su češće javljanje protutijela ACL. Kod Jondsdottira i suradnika (268) učestalost ACL je od 13,5% prije liječenja, dosegla 28% nakon 6 mjeseci liječenja infliksimabom. U naših bolesnika nismo ustanovili značajniji porast tih protutijela. Postoje pretpostavke da su ACL povezana s bakterijskim infekcijama kod bolesnika liječenih anti-TNF $\alpha$  lijekovima i lošijim kliničkim odgovorom na tu terapiju (269).

Utjecaj ANA i anti-ds-DNA-protutijela na klinički odgovor (ACR-indeks) kod bolesnika liječenih infliksimabom nije utvrđen u velikim istraživanjima. U našem uzorku bolesnika također smo uočili da porast učestalosti ANA i anti-ds-DNA protutijela ne utječe na lošiji klinički odgovor. Samo smo u 30. tjednu liječenja ustanovili povezanost učestalosti anti-ds-DNA-protutijela i lošijeg kliničkog odgovora, ali razumno je pretpostaviti da su i drugi čimbenici tome pridonijeli.

Iz svega navedenog, može se zaključiti da usprkos velikoj učestalosti pojavljivanja protutijela, prije svega ANA i anti-ds-DNA, tijekom liječenja infliksimabom njihovo kliničko značenje nije veliko. Međutim, pažljivo praćenje bolesnika kod kojih su se ona pojavila je neophodno.

Otkako se infliksimab počeo primjenjivati u kliničkoj praksi, puno se pažnje pridaje njegovoj neškodljivosti. Općenito gledajući, iskustva s infliksimabom sugeriraju da se on dobro podnosi za vrijeme i neposredno nakon infuzije (205,209,237). Međutim, ponavljana primjena infliksimaba u dozi



od 1 mg/kg ili 3 mg/kg, ipak može dovesti do infuzijskih reakcija od kojih su najčešće crvenilo lica, osip i glavobolja. Različite studije navode vrlo različitu učestalost infuzijskih reakcija. Tako npr. Seymour iznosi podatak da je do 20% bolesnika koji su primali infliksimab imalo infuzijske reakcije (212), dok se u Hanaurovoj sveukupnoj analizi neškodljivosti infliksimaba koja je obuhvatila više istraživanja, navodi da je 343 od 453 bolesnika (76%) imalo nuspojave, dok je infuzijske reakcije imalo 30% bolesnika (220). Od ukupnog broja aplikacija lijeka u naših bolesnika u 23% slučajeva javile su se infuzijske reakcije, a gledajući ukupan broj naših bolesnika 50% ih je imalo neku nuspojavu. Hanaurovo istraživanje, koje je obuhvatilo i bolesnike s Crohnovom bolešću, ustanovilo je infuzijsku reakciju u 16% od ukupno analiziranih 1207 primjena lijeka. I u naših, i u bolesnika opisanih u literaturi, najčešće se radilo o porastu tjelesne temperature (8,3% : 5%) koji nikad nije zahtijevao prekid terapije. Glavobolja se javila u svega 2,8% naših bolesnika, dok je u drugim istraživanjima njena učestalost bila 5%, a učestalost svrbeža i urtikarijalnog osipa bila je slična: 2,2 % kod naših i 1% kod bolesnika u literaturi (220).

Burna alergijska reakcija, uključujući i anafilaktički šok, koja zahtijeva promptnu obustavu lijeka i adekvatno zbrinjavanje bolesnika, u literaturi je rijetko (0,2%) opisana (220). Čak dvije naše bolesnice koje su imale kliničku sliku anafilaksije zapravo su iznenađenje, iako se niti kod jedne nije radilo o anafilaktičkom šoku. Međutim, one upozoravaju na to da medicinsko osoblje, osposobljeno za kardiopulmonalnu reanimaciju, uvijek mora biti u neposrednoj blizini bolesnika kod kojeg se primjenjuje infliksimab. Najteže alergijske reakcije obično se javljaju prilikom druge aplikacije lijeka (220), dok su naše bolesnice prezentirale anafilaksiju prilikom treće infuzije.

Incidencija infuzijskih reakcija pozitivno korelira s prisutnošću HACA (od engl. human anti-chimeric antibody) protutijela (200, 220). HACA se mogu verificirati kod 10-20% bolesnika (212) te s ozirom da su posljedica imunološkog odgovora na infliksimab, odgovorna su za njegovu neučinkovitost kod nekih bolesnika. Konkomitantna terapija, prvenstveno MTX, smanjuje učestalost infuzijskih reakcija.

Budući da životinjski modeli primjene anti-TNF $\alpha$  ukazuju na opasnost od infekcije, od samog početka primjene infliksimaba postoji veliki interes za to područje. Klinička istraživanja prije odobrenja lijeka nisu ukazivala na statistički značajnije veći rizik od infekcija, osim što se u nekim

istraživanjima opisuju učestalije infekcije gornjih dišnih puteva (220,270). Ostale infekcije, kao što su bronhitis, pneumonija, infekcije mokraćnih puteva, kožne infekcije, burzitis, podjednako učestalo su se javljale u bolesnika liječenih infliksimabom i onih liječenih drugim DMARD (najčešće samo MTX-om). To je u skladu sa saznanjem da bolesnici s RA imaju povećani rizik za infekcije.

Međutim, ta klinička istraživanja bila su ograničena malim brojem bolesnika, dužinom praćenja i, prije svega, strogim kriterijima uključivanja.

Infekcije koje su se javile u naših bolesnika bile su lakše, te sukladne podacima iz literature. U našim rezultatima također nema statistički značajne razlike između učestalosti i težine infekcija u skupini liječenoj infliksimabom i usporednim skupinama liječenih drugim DMARD.

U literaturi su opisane ozbiljne i oportunističke infekcije kod bolesnika koji su primali infliksimab, ali nije sasvim jasno je li njihova incidencija u toj skupini veća nego kod bolesnika koji su primali druge DMARD i/ili kortikosteroide. Kod bolesnika s teškom infekcijom, uključujući septički artritis, infekciju endoproteze, osteomijelitis, sepsu, sistemska gljivičnu infekciju i druge, terapiju s anti-TNF $\alpha$ -lijekovima treba odmah prekinuti (239,271).

Duže iskustvo primjene infliksimaba i pažljivo postmarketinško praćenje bolesnika ukazalo je, međutim, na neke specifične opasnosti. Tako se npr. ustanovilo da liječenje infliksimabom povećava predispoziciju za obolijevanje od primarne tuberkuloze i reaktivaciju ranije tuberkuloze. Animalni modeli su pokazali da TNF $\alpha$  ima važnu ulogu u obrani organizma od tuberkuloze, prije svega u formiranju granuloma (272). Značajna redukcija razine TNF $\alpha$ , do koje dolazi primjenom infliksimaba, može dovesti do poremećaja u stvaranju granuloma te do oslobađanja *Mycobacterium tuberculosis* i njegove reaktivacije. Na temelju izvještaja FDA i podataka proizvođača lijeka, Keane i suradnici (273) izračunali su da je relativna incidencija tuberkuloze kod bolesnika liječenih anti-TNF $\alpha$ -lijekovima 41 na 100 000 za SAD, odnosno 224 na 100 000 za bolesnike s RA koji nisu iz SAD. Iznenađuje podatak da je većina slučajeva registrirana u zemljama s niskom incidencijom tuberkuloze, a najviše ih je bilo u Njemačkoj (270). Potrebno je napomenuti da se u više od 50% slučajeva radilo o ekstrapulmonalnoj lokalizaciji tuberkuloze, a da do njene reaktivacije najčešće dolazi unutar 7 mjeseci od početka

liječenja infliksimabom (270). Slučajevi tuberkuloze inducirane etanerceptom su opisani rijetko, a vjerojatan razlog tome je razlika u načinu neutraliziranja TNF $\alpha$  između ta dva lijeka (271).

Smatra se da probir bolesnika na tuberkulozu (uključujući PPD kožni test i rtg pluća) prije započinjanja liječenja značajno smanjuje rizik od njene aktivacije (239).

Kod naših bolesnika nismo zabilježili niti jednu reaktivaciju TBC, a tome je vjerojatno pridonijela i činjenica da su svi naši bolesnici imunizirani avirulentim sojem *M.tuberculosis* (BCG cjepivo).

Od ostalih oportunističkih infekcija prilikom liječenja infliksimabom opisani su rijetki slučajevi listerioze (infekcija s *Listeriom monocytogenes*) te nekoliko fatalnih sepsi uzrokovanih s *Streptococcus pneumoniae*, dok su različite sistemske gljivične infekcije opisane jednako učestalo kao i kod bolesnika liječenih drugim imunosupresivnim lijekovima (220,239,271).

Incidencija solidnih tumora nije veća kod bolesnika liječenih anti-TNF $\alpha$  lijekovima u odnosu na opću populaciju, dok je pitanje rizika za obolijevanje od Non-Hodgkin limfoma kompleksnije.

Poznato je, da je incidencija limfoma povećana u bolesnika s RA, a rizik obolijevanja korelira s težinom bolesti i izloženošću imunosupresivnim lijekovima (274). U kliničkim istraživanjima s lijekovima usmjerenim prema TNF $\alpha$ , a naročito etanerceptom, zabilježena je pojava Non-Hodgkin limfoma, a vrijeme pojavljivanja bilo je između 10. i 21. mjeseca od početka liječenja. Međutim, svi limfomi su se javili kod bolesnika koji su ranije liječeni drugim imunosupresivnim lijekovima (220). Dakle, još uvijek ostaje nejasno, je li rizik za obolijevanje od Non-Hodgkin limfoma povećan kod bolesnika liječenih anti-TNF $\alpha$ -lijekovima u odnosu na bolesnike liječene tradicionalnim DMARD (270).

U bolesnika koji su primali infliksimab i etanercept opisana je pojava demijelinizirajućih bolesti CNS-a i optičkog neuritisa (275) iako se zasada ne zna je li incidencija takvih događaja kod tih bolesnika veća nego kod bolesnika s RA koji nisu primali anti-TNF $\alpha$  lijekove (239).

U našoj kohorti bolesnika nismo imali zabilježenu malignu bolest, niti simptome demijelinizirajućih bolesti CNS-a, međutim, s obzirom na mogućnost njihovog odgođenog pojavljivanja, potreban je nadzor bolesnika u tom smislu.

Iako su predklinička ispitivanja ukazivala da inhibicija TNF $\alpha$  može poboljšati kongestivno srčano zatajenje, klinička ispitivanja to su opovrgnula. Dapače, bolesnici s kongestivnim srčanim zatajenjem koji su liječeni infliksimabom u dozi od 10 mg/kg imali su veći mortalitet (269). Dosada nema podataka da li uobičajena doza infliksimaba koja se primjenjuje u RA povećava incidenciju kongestivnog srčanog zatajenja (239).

Predviđenu terapiju infliksimabom u trajanju od 54 tjedna završilo je 70,8 % naših bolesnika. Ti su rezultati sukladni istraživanjima u drugim zemljama. Flendrie i suradnici navode da 70% nizozemskih bolesnika nastavlja s terapijom lijekovima usmjerenim prema TNF $\alpha$  nakon godinu dana (276). Švedska grupa autora navodi podatak da 75% bolesnika liječenih infliksimabom nastavlja uzimati tu terapiju i nakon 20 mjeseci (277), dok je u registru španjolskih bolesnika koji primaju infliksimab zabilježeno 86% bolesnika koji nastavljaju liječenje infliksimabom nakon godinu dana (278).

U naših bolesnika najčešći razlog obustavljanja liječenja bile su infuzijske reakcije, i to u 5 (20,83%) bolesnika. DIL (4,2%) i neuspjeh liječenja (4,2%) bili su razlozi preostala dva odustajanja. Slični razlozi ranijeg obustavljanja liječenja navedeni su i u literaturi iako se oni, općenito uzevši, teško mogu statistički uspoređivati zbog različitih kriterija za primjenu lijeka i različite aktivnosti bolesti. U istraživanju Flendriea i suradnika 24% bolesnika odustalo je od liječenja infliksimabom zbog nuspojava, a 10% bolesnika zbog neučinkovitosti lijeka. Više od polovice nuspojava (60%) zbog kojih su odustajali ti bolesnici bile su infuzijske reakcije (276). To je u skladu s ostalim istraživanjima koja također navode infuzijske reakcije kao najčešći razlog odustajanja od liječenja infliksimabom (208,221,239). Nadalje, relativno česti razlog odustajanja od liječenja infliksimabom su infekcije. U istraživanju Flendriea i suradnika one su bile razlog obustavljanja liječenja infliksimabom u 6% slučajeva, dok u naših bolesnika one nikad nisu zahtijevale obustavu lijeka.

Iz svega iznesenog možemo zaključiti da je naša kohorta najtežih bolesnika s RA, kod kojih niti jedan od dostupnih DMARD, ili više njih, nije doveo do značajnijeg kliničkog učinka, liječenih infliksimabom reprezentativni uzorak u kojem je ta terapija dovela do značajnog kliničkog poboljšanja. Saznanja o dinamici citokina pomažu boljem razumijevanju učinka ove terapije i upozoravaju na potrebu za fleksibilnošću titiranja doze lijeka i razdoblja između dvije aplikacije.

Opisane nuspojave i infuzijske reakcije u skladu su s podacima iz literature, iako ipak začuđuje relativno velik broj težih alergijskih reakcija. Iznimno velik broj induciranih ANA i anti-ds-DNA-protutijela karakteristika je naših bolesnika, iako ona u većini slučajeva nisu imala kliničko značenje. Opisan slučaj lupusa induciranog infliksimabom, koji se tijekom vremena razotkrio kao sindrom preklapanja, upozorava na potrebu za pažljivim i dugotrajnim praćenjem takvih bolesnika.



## 6 ZAKLJUČCI

1. Monoklonsko protutijelo anti-TNF $\alpha$  (infliksimab) je vrlo djelotvorno u liječenju najtežih oblika RA na što ukazuju i rezultati naše kohorte u kojoj je većina bolesnika nakon 62. tjedna liječenja dosegla ACR20 i veći tj. dobro odgovorila na liječenje.
2. Najdjelotvornijom se pokazala prva doza lijeka nakon koje dolazi do značajnog poboljšanja svih kliničkih pokazatelja te značajne redukcije CRP-a.
3. S dužom primjenom lijeka poboljšanje svih kliničkih i laboratorijskih pokazatelja uglavnom se nastavlja, a broj bolesnika koji su ostvarili ACR20 i veći, raste. Većina bolesnika koji ostvaruju ACR50 i ACR70 u 6. tjednu zadržavaju odličan klinički odgovor i nakon 62 tjedna.
4. Liječenje infliksimabom dovodi do značajne redukcije IL-6 i sTNFR već nakon prve aplikacije lijeka, a njihove vrijednosti se ne mijenjaju značajno tijekom daljnjeg liječenja.
5. U naših bolesnika nisu zabilježene značajnije promjene u vrijednostima IL-10 tijekom liječenja infliksimabom.
6. Antinuklearna protutijela i protutijela anti-ds-DNA učestalo se javljaju tijekom liječenja infliksimabom i metotreksatom što je direktno ovisno o dužini liječenja. Karakteristika naše skupine je izrazito često javljanje protutijela anti-ds-DNA (66,7%), te znatno češće javljanje protutijela ENA nego u drugim istraživanjima.
7. Kliničko značenje pojave protutijela nije veliko, iako je potrebno pažljivo praćenje bolesnika u kojih su se ona javila. Postoji opasnost od pojave lupusa induciranog lijekom ali kod takvih slučajeva treba imati u vidu da je možda riječ o sindromu preklapanja kojeg

je demaskirala primjena infliksimaba.

8. Pojava protutijela (ANA, anti-ds-DNA) je značajno češća u bolesnika liječenih infliksimabom, nego u bolesnika liječenih konvencionalnim DMARD (SZP, MTX, SZP+MTX).
9. Biljezi sustava HLA (DR 1 i /ili DR4 te B8DR3) ne utječu niti na klinički tijek liječenja infliksimabom, niti na pojavu protutijela ANA i anti-ds-DNA.
10. U skupini bolesnika liječenih infliksimabom najčešće nuspojave su infuzijske reakcije, dok su kod bolesnika liječenih SZP-om, MTX-om te kombinacijom SZP i MTX to porast transaminaza i gastrointestinalna nepodnošljivost.
11. Najčešći razlog odustajanja od liječenja infliksimabom su infuzijske reakcije koje mogu obuhvatiti i teže alergijske reakcije.

## 7 LITERATURA

1. Gabriel SE. The epidemiology of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin N Am* 2001;27:269-81.
2. Gabriel SE, Crowson CSO, Fallon WM. The epidemiology of rheumatoid arthritis in Rochester, Minnesota, 1955-1985. *Arthritis Rheum* 1999;42:415-420.
3. Dugowson CE, Koepsell TD, Vooigt LF i sur. Rheumatoid arthritis in women- incidence rates in group health cooperative, Seattle, Washington, 1987-1989. *Arthritis Rheum* 1991; 34:1502-1507.
4. Weyland CM, Schmidt D, Wagner U i sur. The influence of sex on the phenotype of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1998;41: 811-819.
5. Pincus T, Brooks RH, Callahan LF. Predictors of long-term mortality in patients with rheumatoid arthritis according to simple questionnaire and joint count measures. *Ann Intern Med* 1994;120:26-34.
6. Young A, Dixey J, Cox N i sur. How does functional disability in early rheumatoid arthritis (RA) affect patients and their lives? Result of 5 years of follow up in 732 patients from the early RA Study (EARS). *Rheumatology* 2000; 39:603-11.
7. Barrett EM, Scott DGI, Wiles NJ i sur. The impact of rheumatoid arthritis on employment status in the early years of disease: a UK community-based study. *Rheumatology* 2000;39:1403-9.
8. Yelin E, Wanke LA. An assessment of the annual and long-term direct costs of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999;42:1209-1217.
9. Pincus T, Callahan LF, Sale WG i sur. Severe functional declines, work disability, and increased mortality in 75 rheumatoid arthritis patients studied over 9 years. *Arthritis Rheum* 1984;27:864-72.

10. Gregersen PK. Genetics of rheumatoid arthritis: confronting complexity. *Arthritis Rheum* 1999;1:37-44.
11. Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T, et al. HLA Vol 1 i 2. Oxford: Oxford University Press. 1992. str.121-140
12. Thomson G. HLA disease associations: models for the study of complex human genetics disorders. *Critical Rev in Clin Lab Sciences* 1995;32:183-219.
13. Jawaheer D, Gregersen PK. Rheumatoid arthritis. The genetics components. *RheumDis Clin North Am* 2002;28(1): 1-15.
14. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ: The shared epitope hypothesis: An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1987;30:1205-13.
15. Buckner JH, Nepom GT. Genetics of rheumatoid arthritis: is there a scientific explanation for the human leukocyte antigen association? *Curr Opin Rheumatol* 2002;14:254-259.
16. Nepom GT, Byers P, Seyfried C. HLA genes associated with rheumatoid arthritis: identification of susceptibility alleles using specific oligonucleotide probes. *Arthritis Rheum* 1989;32:15-21.
17. Jawaheer D, Sekdin MF, Amos CI, Chen WV i sur. Screening the genome for rheumatoid arthritis susceptibility genes: a replication study and combined analysis of 512 multicase families. *Arthritis Rheum* 2003; 48(8):906-16.
18. Mac Geor A, Ollier W, Thomson W, Jawaheer D, Silman A. HLA-DERB1\*0401/0404 genotype and rheumatoid arthritis: increased association in men, young age at onset, and disease severity. *J Rheumatol* 1995;22(6):1032-6.
19. Calin A, Elswood J, Klouda PT. Destructive arthritis, rheumatoid factor, and HLA-DR4; susceptibility versus severity, a case control study. *Arthritis Rheum* 1989; 32:1221-25.
20. Jawaheer D, Li W, Graham RR, Chen W i sur. Dissecting the genetic complexity of the association between human leukocyte antigens and rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet* 2002;71(3):585-94.

21. Firestein G., Panayi G, Wollheim F, ur. Rheumatoid arthritis: Frontiers in pathogenesis and treatment. Oxford: Oxford University Press, 2000, str 99-106.
22. Behar SM, Porcelli SA. Mechanisms of autoimmune disease induction: The role of the immune response to microbial pathogenesis. *Arthritis Rheum* 1995;38:458-476.
23. Phillips PE. Evidence implicating infectious agents in rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 1988;6:87-94.
24. Sciffenbauer J, Soos J, Johnson H. The possible role of bacterial superantigens in the pathogenesis of autoimmune disorders. *Immunol Today* 1998; 19:117-120.
25. Baum H, Davies H, Paekman M. Molecular mimicry in the MHC: hidden clues to autoimmunity? *Immunol Today* 1996;17:64-70.
26. Drake CG, Koetzin BL. Superantigens: biology, immunology, and potential role in disease. *J Clin Immunol* 1992;12:149-162.
27. Cohen BJ, Buckley MM, Clewley JP i sur. Human parovirus infection in early rheumatoid and inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis* 1986;45:832-838.
28. Simpson RW, McGinty L, Simon L i sur. Association of parovirus with rheumatoid arthritis of humans. *Science* 1984;223:1425-1428.
29. Balandraud N, Meynard JB, Auger I i sur. Epstein-Barr virus load in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis: accurate quantification using real-time polymerase chain reaction. *Arthritis Rheum* 2003;48(5):1223-8.
30. Toussirot E, Auger I, Roudier C i sur. HLA-DR polymorphism influences T-cell precursor frequencies to Epstein-Barr virus (EBV) gp 110: implications for the association of HLA-DR antigens with rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* 1999;54(2):146-52.
31. Toussirot E, Wendling D, Tiberghien P, Luka J, Roudier J. Decreased T cell precursor frequencies to Epstein-Barr virus glycoprotein Gp 110 in peripheral blood correlate with disease activity and severity in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2000; 59(7):533-8.



32. Saal JG, Krimmel M, Steidle M i sur. Synovial Epstein-Barr virus infection increases the risk of rheumatoid arthritis in individuals with the shared HLA-DR4 epitope. *Arthritis Rheum* 1999;42(7):1485-96.
33. van der Edén W, Thole JE, van der Zee R. Cloning of the mycobacterial epitope recognized by T lymphocytes in adjuvant arthritis. *Nature* 1988;331:171-173.
34. Schwartz BD. Infectious agents, immunity and rheumatic disease. *Arthritis Rheum* 1990;322:1277.
35. Isaacs JD, Moreland LW, ur. *Fast Facts-Rheumatoid Arthritis*. Oxford: Health Press Limited, 2002. str.17.
36. Tengstrand B, Carlstrom K, Fellander-Tsai L, Halfstrom I. Abnormal levels of serum dehydroepiandrosterone, estrone and estradiol in men with rhumatoid arthritis: high correlation between serum estradiol and current degree of inflammation. *J Rheumatol* 2003;30(11):2338-43.
37. Lahita RG. The connective tissue diseases and the overall influence of gender. *Int J Fertil Menopausal Stud* 1996;41(2):156-65.
38. Bosnić D. Reumatoidni artritis i trudnoća. *Reumatizam* 2003;50(2):28-33.
39. Symmons DP. Epidemiology of rheumatoid arthritis:determinants of onset, persistence and outcome. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2002;16(5):707-22.
40. Fife MS, Steer S, Fischer SA, Newton J i sur. Association of familial and sporadic rheumatoid arthritis with single corticotropin-releasing hormone genomic region (8q12.) haplotype. *Arthritis Rheum* 2002;46(1): 78-52.
41. Levine JD, Collier DH, Basbaum AI: Hypothesis: the nervous system may contribute to the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1985;12:406.
42. Lotz M, Carson DA, Vauhan JH. Substance P activation of rheumatoid synoviocytes: neural pathway in pathogenesis of arthritis. *Science* 1987; 235:893- 895.
43. Wilhelmi G. Potential effects of nutrition including additives on healthy and arthrotic joints. Basic dietary constituents. *Z Rheumatol* 1993;52(3):174-9.

44. Harrison RA, Harison BJ. Fish oils are beneficial to patients with established rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2001; 28(11):2563-5.
45. Cleland LG, James MJ, Proudman SM. The role of fish oils in the treatment of rheumatoid arthritis. *Drugs* 2003;63(9):845-53.
46. Skoldstam L, Hagfors L, Johansson G. An experimental study of a Mediterranean diet intervention for patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2003; 62(3): 208-14.
47. Albano SA, Santana-Sahagun E , Weisman MH. Cigarette smoking and rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 2001; 31(3): 146-59.
48. Harrison BJ. Influence of cigarette smoking on disease outcome in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2002;14(2):93-7.
49. Matthey DL, Dawes PT, Clarke S, Fisher J i sur. Relationship among the HLA-DRB1 shared epytope, smoking and rheumatoid factor production in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002; 47(4):403-7.
50. Hutchinson D, Shepstone L, Moots R, Lear JT, Lynch MP. Heavy cigarette smoking strongly associated with rheumatoid arthritis (RA), particularly in patients without a family history of RA. *AnnRheum Dis* 2001; 60(3):223-7.
51. Yamanishi Y, Firestein GS. Pathogenesis of rheumatoid arthritis: The role of synoviocytes. *Rheum Dis Clin N Am* 2001;27:355-71.
52. Harris ED. Rheumatoid arthritis: Pathophysiology and implications for therapy. *N Engl J Med* 1990;322:1277-1289.
53. Tak PP, Brsnihan B. The pathogenesis and prevention of joint damage in rheumatoid arthritis-Advances from synovial biopsy and tissue analysis. *Arthritis Rheum* 2000;43:2619-33.
54. Gravallesse EM, Goldring SR. Cellular mechanisms and the role of cytokines in bone erosions in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43:2143-51.
55. Edwards SW, Hallet M. Seeing the wood for the trees: the forgotten role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Immunol Today* 1997;18:320-323.

56. Feldmann M, Brennan, Maini RN i sur. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Ann Rev Immunol* 1996;14:397-440.
57. Thompson A, Foreword I, ur. *The cytokine handbook*. 3rd ed. San Diego; California: Academic Press Inc;1999:18-22.
58. Arend WP, Dayer JM. Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1990;33:3405-315.
59. Duff GW. Cytokines and anti-cytokines. *Brit J Rheum* 1993;32:15-20.
60. Economides AN, Ravetch JV, Yancopoulos GD, Stahl N. Designer cytokines: targeting actions to cell of choice. *Science* 1995;270:1351-1353.
61. Feldmann M, Brennan, Maini RN i sur. Rheumatoid arthritis. *Cell* 1996;85:307-310.
62. Arend WP, Dayer JM. Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor alphain rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995;38:151-160.
63. Arend WP. Interleukin-1 receptor antagonist. *Adv Immunol* 1993;54:167-227.
64. Ksontini R, MacKay SL, Moldawer LL. Revisiting the role of tumor necrosis factor alpha and the responce to surgical injury and inflammation. *Arch Surg* 1998;133:558-567.
65. Bazoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med* 1996;334:1717-1723.
66. Aggarwal BB, Aiyer RA, Pennica D, Gray PW, Goedded DV. Human tumour necrosis factors: structure and receptor interactions. *Ciba Found Symp* 1987;131:39-51.
67. Zhang M, Tracey KJ. Tumor necrosis factor. U: Thompson A, ur. *The cytokine handbook*. 3rd ed. San Diego; California: Academic Press Inc;1999: 517-548.
68. Di Giovine FS, Nuki G, Duff GW. Tumour necrosis factor in synovial exudates. *Ann Rheum Dis* 1988;47:768-772.
69. Maini RN, Elliot Mj, Brennan FM i sur. Monoclonal anti TNF $\alpha$  antibody as a probe of pathogenesis and therapy of rheumatoid disease. *Immunol Rev* 1995;144:195-223.

70. Tetta C, Camussi G, Modena V, Di Vittorio C, Baglioni C. Tumour necrosis factor in serum and synovial fluid of patients with active and severe rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1990;49:665-667.
71. Bodel PT, Hollingsworth JW. Pyrogen release from human synovial exudate cells. *Br J Exp Pathol* 1968;49:11-19.
72. Garra A. Interleukins and immune system. *Lancet* 1989;2:1003.
73. Hasty KA, Reife RA, Kang AH, Stuart JM. The role of stromelysin in cartilage destruction that accompanies inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 1990;33:388-397.
74. Goldring SR, Gravalles EM. Pathogenesis of bone erosions in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2000;12:195-199.
75. Gowen M, Nedwin GE, Mundy GR. Preferential inhibition of cytokine stimulated bone resorption by recombinant interferon gamma. *J Bone Miner Res* 1986;1:469-474.
76. Houssiau FA, Devogelaer JP, Van Damme J i sur. Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides. *Arthritis Rheum* 1988;31:784-788.
77. De Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Fridgor CG, de Vries JE. Interleukin-10 (IL-10) inhibit cytokine synthesis by human monocyte: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991;174:1209-1220.
78. De Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H. Interleukin-10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen –presenting capacity of monocytes via downregulation of class II histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 1991;174:915-924.
79. De Waal Malefyt R, Yssel H, de Vries JE. Direct effects of IL-10 on subset of human CD4+ T cell clones and resting T cell. *J Immunol* 1993;150:4754-4765.
80. Katsikis PD, Chu CQ, Brennan FM, Maini RN, Feldmann M. Immunoregulatory role of interleukin-10 in rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 1994;179:1517-1527.

81. Turkow EW, van der Heijden IM, Breedveld FC i sur. Increased expression of IL-15 in the synovium of patients with rheumatoid arthritis compared with patients with Yersinia-induced arthritis and osteoarthritis. *J Pathol* 1997;181:444-450.
82. McInnes IB, Liew FY. Interleukin 15: a proinflammatory role in rheumatoid arthritis synovitis. *Immunol Today* 1998;19:75-79.
83. Sebbag N, Parry SL, Brennan FM, Feldmann M. Cytokine stimulation of T lymphocytes regulates their capacity to induce monocyte production of tumor necrosis factor alpha, but not interleukin-10: possible relevance to pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 1997;27:624-632.
84. Gonzalez-Alvaro I, Ortiz AM, Garcia-Vicuna R i sur. Increased serum levels of interleukin-15 in rheumatoid arthritis with long-term disease. *Clin Exp Rheumatol* 2003;21(5): 639-42.
85. Lard LR, Roep BO, Toes RE, Huizinga TW. Enhanced concentrations of interleukin 16 are associated with joint destruction in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2004;31(1):35-9.
86. Endo H, Akahoshi T, Takagishi K i sur. Elevation of interleukin-8 (IL-8) levels in joint fluids of patients with rheumatoid arthritis and the induction by IL-8 of leukocyte infiltration and synovitis in rabbit joints. *Lymphokine Cytokine Res* 1991;10:245-252.
87. al-Mughales J, Blyth TH, Hunter JA, Wilkinson PC. The chemoattractant activity of rheumatoid synovial fluid for human lymphocytes is due to multiple cytokines. *Clin Exp Immunol* 1996;106:230-236.
88. Assenmacher M, Lohning M, Scheffold A i sur. Commitment of individual Th-1 like lymphocytes to expression of IFN-gamma versus IL-4 and IL-10: selective induction of IL-10 by sequential stimulation of naive Th cell with IL-12 and IL-4. *J Immunol* 1998;161:2825-2832.



89. Bucht A, Larsson P, Weisbrot L i sur. Expression of intrerferon gamma (IFN-gamma), IL-10, IL-12 and transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) mRNA in synovial fluid cells from patients in the early and late phases of rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol* 1996;103:357-367.
90. Udagawa N, Horwood NJ, Elliot J i sur. Interleukin-18 (interferon gamma-inducing factor) is produced by osteoblasts and acts via granulocyte/macrophage colony stimulating factor and not via interferon-gamma to inhibit osteoclast formation. *J Exp Med* 1997;185:1005-1012.
91. Yao Z, Painter SL, Fanslow WC i sur. Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *J Immunol* 155:5483-5486.
92. Kaushansky K, Miller JE, Morris DR, Willson CB, Hammond WP. The role of lymphocytes and monocytes in hematopoietic growth factor production by peripheral blood mononuclear cells. *Cell Immunol* 1989;122:62-70.
93. Haworth C, Brennan FM, Chantry D i sur. Expression of granulocyte-macrophage colony stimulating factor in rheumatoid arthritis: regulation by tumor necrosis factor alpha. *Eur J Immunol* 1991;21:2575.
94. Shiozawa S, Shiozawa K, Tanaka Y i sur. Human epidermal growth factor for the stratification of synovial lining layer and neovascularisation in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1989;48:820-828.
95. Pfeilschifter J, Wolf O, Naumann A. Chemotactic response of osteoblast-like cells to transforming growth factor  $\beta$ . *J Bone Miner Res* 1990;5:825-830.
96. Szekanecz Z, Koch AE. Chemokines and angiogenesis. *Curr Opin Rheumatol* 2001; 13:202-8.
97. Hadjigogos K. The role of free radicals in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Panimerva Med* 2003;45(1):7-13.
98. Liu H, Pope RM. The role of apoptosis in rheumaoid arthritis. *Curr Opin Pharmacol* 2003;3(3): 317-322.

99. Lee RG, Spielman J, Zhao DY, Olsen KJ, Podack ER. Perforin, Fas Ligand and tumor necrosis factor are the major cytotoxic molecules used by lymphokine-activated killer cells. *J Immunol* 1996;157:3317-22.
100. Cho TJ, Lehmann W, Edgar C i sur. Tumor necrosis factor alpha activation of the apoptotic cascade in murine articular chondrocytes is associated with the induction of metalloproteinases and specific pro-resorptive factors. *Arthritis Rheum* 2003;48(10):2845-54.
101. Baier, Meineckel I, Gay S, Pap T. Apoptosis in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2003; 15(3):274-9.
102. Kawakami A, Urayama S, Yamasaki S i sur. Anti-apoptogenic function of TGFbeta1 for human synovial cells: TGFbeta1 protects cultured synovial cells from mitochondrial perturbation induced by several apoptogenic stimuli. *Ann Rheum Dis* 2004;63(1):95-7.
103. Itoh K, Hase H, Kojima H i sur. Central role of mitochondria and p53 in FFas-mediated apoptosis of rheumatoid synovial fibroblasts. *Rheumatology (Oxford)*:2004;43(3):277-85.
104. Leech M, Lacey D, Xue JR i sur. Regulation of p53 by macrophage migration inhibitory factor in inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:1881-9.
105. Goetzl Ej, Banda MJ, Leppert D. Matrix metalloproteinases in immunity. *J Immunol* 1996;156:1-4.
106. Brennan FM, Gibbson DL, Mitchell T i sur. Enhanced expression of tumor necrosis factor receptor mRNA and protein in mononuclear cells isolated from rheumatoid arthritis synovial joints. *Eur J Immunol* 1992;22:1907-12.
107. Vincenti MP, Clark IM, Brinckerhoff CE. Using inhibitors of metalloproteinases to treat arthritis. Easier said than done? *Arthritis Rheum* 1994;37:1115-26.
108. Edwards DR, Murphy G, Reynolds JJ. Transforming growth factor  $\beta$  modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *EMBO J* 1987;6:1899-1904.

109. Shingu M, Nagai Y, Isayama T i sur. The effects of cytokines on metalloproteinase inhibitors (TIMP) and collagenase production by human chondrocytes and TIMP production by synovial cells and endothelial cells. *Clin Exp Immunol* 1993;94:145-9.
110. Maier R, Ganu V, Lotz M. Interleukin-11, an inducible cytokine in human articular chondrocytes and synoviocytes, stimulates the production of the tissue inhibitor of metalloproteinases. *J Biol Chem* 1993;268:21527-32.
111. Shigeyama Y, Pap T, Kunzler P i sur. Expression of osteoclast differentiation factor in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43(11):2523-30.
112. Gravallese EM, Manning C, Tsay A i sur. Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor. *Arthritis Rheum* 2000;43(2):250-8.
113. Nakashima T, Wada T, Penninger JM. RANKL and RANK as novel therapeutic targets for arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2003;15(3):280-7.
114. Takayanagi H, Iizuka H, Juji T i sur. Involvement of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43(2):259-69.
115. Kelsoe G., Zheng B: Sites of B-cell activation in vivo. *Curr Opin Immunol* 1993;5:418-422.
116. Janeway AC, Travers P. The humoral immune response. Janeway AC, ur. *Immunobiology:the immune system in health and disease*. Current Biology LTD. Garland Publishing Inc 1996; str. 8.1-8.52
117. Dechanet J, Merville P, Durand I, Banchereau J, Miossec P. The ability of synoviocytes to support terminal differentiation of activated B cells may explain plasma cell accumulation in rheumatoid synovium. *J Clin Invest* 1995;95:456-63.
118. Jonsson T, Steinsson K, Jonsson H i sur. Combined detection of IgM and IgA rheumatoid factor has high diagnostic specificity for rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 1998;18: 119-123.
119. Sutton B, Corper A, Bonagura V i sur. The structure and origin of rheumatoid factors. *Immunol Today* 2000;21:177-183.

120. Van Schaardenburg D, Hazels JM, de Boer A. Outcome of rheumatoid arthritis in relation to age and rheumatoid factor at diagnosis. *J Rheumatol* 1993; 20:45.
121. van Zeben D, Hazes JM, Zwinderman AH. Clinical significance of rheumatoid factor in early rheumatoid arthritis: results of a follow up study. *Ann Rheum Dis* 1992;51:1029.
122. Vittecoq O, Pouplin S, Krzanowska K i sur. Rheumatoid factor is the strongest predictor of radiological progression of rheumatoid arthritis in a three-year prospective study in community-recruited patients. *Rheumatology (Oxford)* 2003;42(8):939-46.
123. Lipsky PE. Rheumatoid arthritis U: Kavanaugh AF, Lipsky PE, ur. *Clinical immunology-principles and practice*. Mosby-Year Book, Inc. 1996; str. 1093.
124. Williams RC Jr, Malone CC, Kao KJ. IgM rheumatoid factors react with human class I HLA molecules. *J Immunol* 1996;156:1684-1694.
125. He X, Goronzy JJ, WEeyand CM. Selective induction of rheumatoid factors by superantigens and human helper T cells. *J Clin Invest* 1992;89:673-680.
126. Weyand CM, McCarthy TG, Goronzy JJ. Correlation between disease phenotype and genetic heterogenicity in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1995; 95:2120-2126.
127. Morović-Vergles J. Patofiziologija reumatoidnog artritisa. *Reumatizam* 2003; 50(2):15-17.
128. Zhou ZJ, Menard HA. Autoantigenic posttranslational modifications of proteins: does it apply to rheumatoid arthritis? *Curr Opin Rheumatol* 2002;14:250-253.
129. Girbal-Neuhauser E, Durieux JJ, Arnaud M i sur. The epytopes targeted by the rheumatoid arthritis associated antifilaggrin autoantibodies are post-translationally generated on various sites of pro(filaggrin) by deimination of arginine residues. *J Immunol* 1999;162:585-594.
130. Zeng X, Ai M, Tian X i sur. Diagnostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibody inpatients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2003;30(7):1451-5.
131. Schellekens GA, Visser H, de Jong BAW i sur. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognising a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum* 2000;43:1831-5.

132. Saraux A, Berthelot JM, Devauchelle V i sur. Value of antibodies to citrulline-containing peptides for diagnosing early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2003;30(12):2535-9.
133. Bas S, Genevay S, Meyer O, Gabay C. Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, IgM and IgA rheumatoid factors in the diagnosis and prognosis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2003;42(5):677-80.
134. Reparon-Schuijt CC, van Esch WJ, van Kooten i sur. Secretion of anti citrulline-containing peptide antibody by B lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2001;44(1):41-7.
135. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:315-24.
136. Saraux A, Berthelot JM, Chales G i sur. Ability of the American College of Rheumatology 1987 Criteria to predict rheumatoid arthritis and classification of these patients two years later. *Arthritis Rheum* 2001; 44:2485-91.
137. Edward D, Harris JR. Clinical features of rheumatoid arthritis. U: Klippel JH, Dieppe PA, ur. *Rheumatology*, London: Mosby. 1998.
138. Pincus T. Laboratory tests in rheumatic disorders. U: Klippel JH, Dieppe PA, ur. *Rheumatology*, London: Mosby. 1998.
139. Sokka T, Pincus T. A historical perspective concerning population-based and clinical studies of early arthritis and early rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2003;21(5 Suppl 31):SS-14.
140. Kim JM, Weisman MH. When does rheumatoid arthritis begin and why do we need to know? *Arthritis Rheum* 2000;43:473-84.
141. van Vugt RM, van Jaarsveld CH, Hofman DM, Helders PJ, Bijlsma J. Patterns of disease progression in the rheumatoid wrist: a long-term followup. *J Rheumatol* 1999;26(7):1467-73.
142. Bouysset M, Tebib J, Noel E i sur. Rheumatoid flat foot and deformity of the first ray. *J Rheumatol* 2002;29(5):903-5.



143. Riise T, Jacobsen BK, Gran JT. High mortality in patients with rheumatoid arthritis and atlantoaxial subluxation. *J Rheumatol* 2001;28(11):2425-9.
144. Neva MH, Isomaki P, Hannonen P i sur. Early and extensive erosiveness in peripheral joints predicts atlantoaxial subluxations in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48(7):1808-13.
145. Jacobsen EA, Riise T. MRI of cervical spine with flexion and extension used in patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol.* 2000; 29(4):249-54.
146. Rosenbaum R. Neuromuscular complications of connective tissue diseases. *Muscle Nerve* 2001;24(2):154-69.
147. Carmona L, Gonzalez-Alvaro I, Balsa A i sur. Rheumatoid arthritis in Spain: occurrence of extra-articular manifestations and estimates of disease severity. *Ann Rheum Dis* 2003;62(9):897-900.
148. Patatianian E, Thompson DF. A review of methotrexate-induced accelerated nodulosis. *Pharmacotherapy* 2002;22(9):1157-62.
149. Calguneri M, Oztuk MA, Ozbalkan Z i sur. Frequency of lymphadenopathy in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *J Int Med Res* 2003;31(4):345-9.
150. Gabriel SE, Crowson CS, Kremers HM i sur. Survival in rheumatoid arthritis: a population-based analysis in trends over 40 years. *Arthritis Rheum* 2003;48(1):54-8.
151. Walker NJ, Zurier RB. Liver abnormalities in rheumatic diseases. *Clin Liver Dis* 2002;64(9):933-46.
152. Chou CW, Chang SC. Pleuritis as a presenting manifestation of rheumatoid arthritis diagnostic clues in pleural fluid cytology. *Am J Med Sci* 2002;323(3):158-61.
153. Tarvaglio-Encinoza A, Anaya JM, Dupuy D'Angeac AD i sur. Rheumatoid pericarditis: new immunopathological aspects. *Clin Exp Rheumatol* 1994;12(3):313-6.
154. Brun JG, Madland TM, Jonnson R. A prospective study of sicca symptoms in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003. 49(2):187-92.

155. Afshari NA, Afshari MA, Foster CS. Inflammatory conditions of the eye associated with rheumatic disease. *Curr Rheumatol Rep* 2001;3(5):453-8.
156. Voskuyl AE, Hazes JM, Zwinderman AH i sur. Diagnostic strategy for the assessment of rheumatoid vasculitis. *Ann Rheum Dis* 2003;62(5):407-13.
157. Haugeberg G, Orstavik RE, Kvien TK. Effects of rheumatoid arthritis on bone. *Curr Opin Rheumatol* 2003;15(4):469-75.
158. Chanter IW, Davie MW, Evans SF, Rees JS. Oral corticosteroid prescribing in women over 50, use of fracture prevention therapy, and bone densitometry service. *Ann Rheum Dis* 2003;62(4):350-2
159. Forsblad D'Elia H, Larsen A, Waltbrand E i sur. Radiographic joint destruction in postmenopausal rheumatoid arthritis is strongly associated with generalised osteoporosis. *Ann Rheum Dis* 2003;62(7):617-23.
160. Donald F, Ward MM. Evaluative laboratory testing practices of United States rheumatologists. *Arthritis Rheum* 1998; 41:725-9.
161. Wolfe F, Michaud K. The clinical and research significance of the erythrocyte sedimentation rate. *J Rheumatol* 1994;21:1227-37.
162. Sokka T, Willoughby J, Yazici Y, Pincus T. Database of patients with early rheumatoid arthritis in the USA. *Clin Exp Rheumatol* 2003;21(5 Suppl 31):S146-53.
163. Turesson C, Jacobsson L, Bergstrom U, Trudesson L, Strufelt G. Predictors of extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2000;29(6):358-64.
164. Caspi D, Elkayam O, Eisinger M i sur. Clinical significance of low titer anti-nuclear antibodies in early rheumatoid arthritis: implications on the presentation and long term course of the disease. *Rheumatol Int* 2001;20(2):43-7.
165. Jansen LM, den Horst-Bruinsma IE, van Schaardenburg D i sur. Predictors of radiological joint damage in patients with early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum* 2001;60:924-7.
166. Combe B, Dougados M, Goupille P i sur. Prognostic factors for radiographic damage in early rheumatoid arthritis, a multiparameter prospective study. *Arthritis Rheum* 2001;44:1736-43.

167. Goldbach-Mansky R, Mahadevan V, Yao L, Lipsky PE. The evaluation of bone damage in rheumatoid arthritis with magnetic resonance imaging. *Clin Exp Rheumatol* 2003;21(5 Suppl 31):S50-3.
168. Wakefield RJ, Kong KO, Conaghan PG i sur. The role of ultrasonography and magnetic resonance imaging in early rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2003;21(5 Suppl 31):S42-9.
169. Freemont AJ, Denton J, Chuck A, Davies MJ, Holt PJJ. The diagnostic value of synovial fluid cyto-analysis; a reassessment. *Ann Rheum Dis* 1991;50:101-7.
170. Čikeš N. Kliničko značenje laboratorijskih pretraga u reumatologiji. *Reumatizam* 2001;48(2):7-13.
171. Breedveld F, Han C, Bala M i sur. Baseline joint damage is a significant predictor of improvement in physical function in RA patients after treatment. *Ann Rheum Dis* 2003;62(suppl1):173.
172. Anderson JJ, Wells G, Verhoeven AC i sur. Factor predicting response to treatment in rheumatoid arthritis. The importance of disease duration. *Arthritis Rheum* 2000;43:22-9
173. Galetka R, St Clair EW. Treatment of early rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2003;17:791-809.
174. Verstappen SM, Jacobs JW, Bijlsma JW, Heurkens AH, van Booma-Frankfort C, Borg EJ. Five year followup of rheumatoid arthritis patients after early treatment with disease-modifying drugs versus treatment according pyramid approach in the first year. *Arthritis Rheum* 2003; 48(7):1797-807.
175. Emery P, Breedveld FC, Dougados M i sur. Early referral recommendation for newly diagnosed rheumatoid arthritis : evidence based development of clinical guide. *Ann Rheum Dis* 2002;61:290-297.
176. Crofford, Lipsky PE, Brooks P i sur. Basic biology and clinical application of specific COX-2 inhibitors. *Arthritis Rheum* 2000;43:4-13.

177. Fitzgerald GA, Patrono C. The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *N Engl J Med* 2001;345: 433-442.
178. Kirwan JR, Byron M, Dieppe P i sur. The effect of glucocorticosteroids on joint destruction in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 1995;333:142-6.
179. Pincus T, Sokka T, Stein CM. Are long term very low doses of prednisone for patients with rheumatoid arthritis as helpful as high doses are harmful? *Ann Intern Med* 2002; 136:76-8.
180. van Everdingen AA, Jacobs JW, Siewertsz VR i sur. Low dose prednisone therapy for patient with early active rheumatoid arthritis: clinical efficacy, disease –modifyingproperties, and side effects: a randomized, double-blind, placebo controlled clinical trial. *Ann Intern Med* 2002;136(1):S-72.
181. Clowes JA, Peel N, Eastell R. Glucocorticosteroid-induced osteoporosis. *Curr Opin Rheumatol* 2001;13:326-32.
182. Lindroth Y, Brattstrom M, Bellman I i sur. A problem-based education program for patients with rheumatoid arthritis: evaluation after three and twelve months. *Arthritis Care Res* 1997;10:325-32.
183. Blumberg SN, Fox DA. Rheumatoid arthritis guidelines for emerging therapies. *AM J Manag Care* 2001; 7:617-26.
184. Weinblatt ME, Polisson R, Blotner SD i sur. The effects of drug therapy on radiographic progression of rheumatoid arthritis: results of a 36-week randomized trial comparing methotrexate and auranofin. *Arthritis Rheum* 1993;36:613-19.
185. Hoekstra M, van Ede AE, Haagsma i sur. Factors associated with toxicity, final dose, and efficacy of methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2003;62:423-26.
186. Boers M, Verhoeveen AC, Markusse HM i sur. Randomised comparison of step-down prednisolone, methotrexate and sulphasalazine with sulphasalazine alone in early rheumatoid arthritis. *Lancet* 1997;350:309-18.

187. Emery P, Breedveld FC, Lemmel EM i sur. A comparison of the efficacy and safety of leflunomide and methotrexate for the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2000;39:655-65
188. Tugwell P, Pincus T, Yocum D i sur. Combination therapy with methotrexate on severe rheumatoid arthritis. The methotrexate-cyclosporine combination study group. *N Engl J Med* 1995, 333:137-41.
189. Cannella AC, O'Dell JR. Is there still a role for traditional disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs) in rheumatoid arthritis? *Curr Opin Rheumatol* 2003;15:185-192.
190. O'Dell JR, Leff R, Paulsen G i sur. Treatment of rheumatoid arthritis with methotrexate and hydroxychloroquine, methotrexate and sulfasalazine or a combination of all three medications. *Arthritis Rheum* 2002;46:1164-70.
191. Landewe RBM, Boers M, Verhoeven AC i sur. COBRA combination therapy in patients with early rheumatoid arthritis: long-term structural benefits of a brief intervention. *Arthritis Rheum* 2002; 46:347-356.
192. Neva M, Dauppi M, Kautiainen H i sur. Combination drug therapy retards the development of atlanto-axial subluxations. *Arthritis Rheum* 2000;11:2397-01.
193. Čikeš N. Rani reumatoidni artritis. *Reumatizam* 2003;50(2): 18-21.
194. Puolakka K, Kautiainen H, Mottonen T i sur. Impact of initial aggressive drug treatment with a combination of disease modifying antirheumatic drugs on the development of work disability in early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50:55-62.
195. Brennan FM, Chantry D, Jackson A i sur. Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. *Lancet* 1989;2:244-247.
196. Keffer J, Probert L, Cazlaris H, Moser RB, Fehr J. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J* 1991;10:4025-31.
197. Elliot MJ, Maini RN, Feldmann M i sur. Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Arthritis Rheum* 1993;12:1681-90.



198. Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M i sur. Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor  $\alpha$  (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. *Lancet* 1994;344:1105-10.
199. Elliott MJ, Maini RN, Feldmann i sur. Repeated therapy with monoclonal antibody to tumour necrosis factor  $\alpha$  (cA2) in patients with rheumatoid arthritis. *Lancet* 1994;34:1125-27.
200. Kavanaugh A, St. Clair EW, McCune WJ, Braakman T, Lipsky P. Chimeric anti-tumor necrosis factor- $\alpha$  monoclonal antibody treatment of patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate therapy. *J Rheumatol* 2000;27:841-850
201. Maini RN, Breedveld FC, Kalden JR, i sur. Therapeutic efficacy of multiple intravenous infusions of anti-tumor necrosis factor  $\alpha$  monoclonal antibody combined with low-dose weekly methotrexate in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1998;41:1552-63.
202. Moreland LW, Schiff MH, Baumgartner SW i sur. Etanercept therapy in rheumatoid arthritis. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 1999;130:478-486.
203. Weinblatt ME, Kremer JM, Bankhurst AD i sur. A trial of etanercept, a recombinant tumor necrosis factor receptor:FC fusion protein, in patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate. *N Engl J Med* 199;340:253-259.
204. Bathon JM, Martin RW, Fleischmann RM i sur. A comparasion of etanercept and methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2000;43:1586-92.
205. Criscione LG, St. Clair EW. Tumor necrosis factor- $\alpha$  antagonist for the treatment of rheumatic diseases. *Curr Opin Rheumtol* 2002, 14:204-211.
206. Markham A, Lamb HM. Infliximab. A review of its use in the menagement of rheumatoid arthritis. *Drugs* 2000;59:1341-59.
207. Kavanaugh AF. Anti-tumor necrosis factor  $\alpha$  monoclonal antibody therapy for rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 1998;24:593-614.
208. Lipsky PE, van der Heijde DMFM, St Clair EW i sur. Infliximab and metotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. Anti Tumor Necrosis Factor Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy Study Group. *N Engl J Med* 2000,343:1594-602.

209. Furst DE, Keystone EC, Breedveld FC i sur. Updated Consensus statement on tumour necrosis factor blocking agents for the treatment of rheumatoid arthritis and other rheumatic diseases (April 2001). *Ann Rheum Dis* 2001;60:iii2-iii5.
210. Antoni C, Kalden JR. Combination therapy of the chimeric monoclonal anti tumor necrosis factor antibody (infliximab) with methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 1999;17(Suppl18):S73-S77.
211. Ohshima S, Saeki Y, Mima T i sur. Long-term follow-up of the changes in circulating cytokines, soluble cytokine receptors, and white blood cell subset counts in patients with rheumatoid arthritis (RA) after monoclonal anti TNF alfa antibody therapy. *J Clin Immunol* 1999;5:305-313.
212. Seymour HE, Worsley A, Smith JM, Thomas SHL. Anti-TNF agents for rheumatoid arthritis. *Br J Clin Pharmacol* 2001;51:201-208.
213. Charles PJ, Semenk RJ, De Jong J, Feldmann M, Naini RN. Assessment of antibodies to double-stranded DNA induced in rheumatoid arthritis patients following treatment with infliximab, a monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha: findings in open-label and randomised placebo-controlled trials. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 2383-90.
214. Ali Y, Shah S. Infliximab-induced systemic lupus erythematosus. *Ann Intern Med* 2002; 137(7): 625-6.
215. Shakoor N, Michalska M, Harris CA, Block JA. Drug induced systemic lupus erythematosus associated with etanercept therapy. *Lancet* 2002; 359: 579-80.
216. Debandt M, Vittecoq O, Decamps V, Le Loet X, Meyer O. Anti-TNF -alpha induced systemic lupus syndrome. *Clin Rheumatol* 2003; 22(1): 56-61.
217. Favalli EG, Sinigaglia L, Varenna M, Arnoldi C. Drug-induced lupus following treatment with infliximab in rheumatoid arthritis. *Lupus* 2002; 11(11): 753-5.
218. Carlson E, Rothfield N. Etanercept-induced lupus-like syndrome in a patient with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48:1165.

219. Cairns AP, Duncan MKJ, Hinder AE, Tagart AJ. New onset systemic lupus erythematosus in a patient receiving etanercept for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2002; 61: 1031-1032.
220. Hanauer SB. Review article: safety of infliximab in clinical trials. *Aliment Pharmacol Ther* 1999;13:16-22.
221. Weinblatt ME, Keystone EC, Furst DE i sur. Adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor  $\alpha$  monoclonal antibody, for the treatment of rheumatoid arthritis in patients taking concomitant methotrexate. *Arthritis Rheum* 2003;48:35-45.
222. Bresnihan B, Alvaro-Gracia JM, Cobby M i sur. Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Rheum* 1998;41:2196-204.
223. Fleischman RM, Schechtman J, Bennett R i sur. Anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist (r-metHuIL-1ra) in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:927-34.
224. Nuki G, Bresnihan B, Bear MB i sur. Long-term safety and maintenance of clinical improvement following treatment with anakinra (recombinant human interleukin-1 receptor antagonist) in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002;46:2838-46.
225. Shanahan JC, Moreland LW, Carter RH. Upcoming biologic agents for the treatment of rheumatic diseases. *Curr Opin Rheumatol* 2003;15:226-236.
226. Moreland LW, Gugliotti R, King K i sur. Results of a phase I/II randomized, masked, placebo-controlled trial of recombinant human interleukin-11 in the treatment of subjects with active rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2001;247-252.
227. Leandro MJ, Edwards JCW, Cambridge G. Clinical outcome in 22 patients with rheumatoid arthritis treated with B lymphocyte depletion. *Ann Rheum Dis* 2002;61:883-888.
228. Moreland LW, Alten R, Van den Bosch F i sur. Costimulatory blockade in patients with rheumatoid arthritis: a pilot, dose-finding, double-blind, placebo-controlled clinical trial evaluating CTLA-4Ig and LEA-29Y eighty-five days after the first infusion. *Arthritis Rheum* 2002;46:1470-1479.
229. Orlić D. Endoprotetski zahvati u reumatskih bolesnika. *Reumatizam* 2003;50(2):7-14.

230. Pincus T, Callahan LF, Brooks RH i sur. Self-report questionnaire scores in rheumatoid arthritis compared with traditional physical, radiographic, and laboratory measures. *Ann Intern Med* 1989;110:259-66.
231. Wernick R, Campbell SM. Update in rheumatology. *Ann Intern Med* 2000;132:125-133.
232. Aletaha D, Smolen JS. Laboratory testing in rheumatoid arthritis patients taking disease-modifying antirheumatic drugs: clinical evaluation and cost analysis. *Arthritis Rheum* 2002;47:181-8.
233. Charles P, Elliott MJ, Davis D i sur. Regulation of cytokines, cytokine inhibitors, and acute-phase proteins following anti-TNF- $\alpha$  therapy in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 1999;163:1521-1528.
234. St Clair EW. Infliximab treatment for rheumatic disease: clinical and radiological efficacy. *Ann Rheum Dis* 2002;61(Suppl II):ii67-ii69.
235. Ziolkowska M, Maslinski W. Laboratory changes on anti-tumor necrosis factor treatment in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2003;15:267-273.
236. ten Hove T, van Montfrans C, Peppelenbosch MP i sur. Infliximab treatment induces apoptosis of lamina propria T lymphocytes in Crohn's disease. *Gut* 2002;50:206-211.
237. Furst DE, Breedveld FC, Kalden JR i sur. Updated consensus statement on biological agents for the treatment of rheumatoid arthritis and other immune mediated inflammatory diseases (May 2003). *Ann Rheum Dis* 2003;62(Suppl III):ii2-ii9.
238. Braun J, Pham T, Sieper J i sur. International ASAS consensus statement for the use of anti-tumour necrosis factor agents in patients with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2003;62:817-24.
239. Feletar M, Brockbancj JE, Schentag CT, Lapp V, Gladman DD. Treatment of refractory psoriatic arthritis with infliximab: a 12 month observational study of 16 patients. *Ann Rheum Dis* 2004;63:156-161.
240. Rozenbraum M, Rosner I, Portnoy E. Remission of Behcet's syndrome with TNF $\alpha$  blocking treatment. *Ann Rheum Dis* 2002;61:283-284.

241. Steinfeld SD, Demols P, Salmon I, Kiss R, Appelboom T. Infliximab in patients with primary Sjogren's syndrome: a pilot study. *Arthritis Rheum* 2001;44:2371-5
242. Andonopoulos AP, Meimaris N, Daoussis D, Bounas A, Giannopoulos G. Experience with infliximab (anti-TNF $\alpha$  monoclonal antibody) as monotherapy for giant cell arteritis. *Ann Rheum Dis* 2003;62:1116.
243. Hengstman G, van den Hoogen F, van Engelsen B i sur. Anti-TNF blockade with infliximab (Remicade) in polymyositis and dermatomyositis (abstract). *Arthritis Rheum* 2000;43(suppl):S193.
244. Ehresman G. Infliximab in the treatment of polychondritis (abstract). *Arthritis Rheum* 2002;46(suppl):S160
245. Sweiss N, Ellman N, Cunan J i sur. TNF-inhibitor as novel treatment for refractory sarcoidosis (abstract). *Arthritis Rheum* 2002;46(suppl):S324.
246. Weiss J, Eberhard B, Gottlieb B i sur. Infliximab as a novel therapy for refractory Kawasaki's disease (abstract). *Arthritis Rheum* 2002;46(suppl):S310.
247. Olivieri I, Padula A, Ciancio G, Salvarani C, Niccoli L, Cantini F. Successful treatment of SAPHO syndrome with infliximab: report of two cases. *Ann Rheum Dis* 2002;61:375-6.
248. Kraetsch HG, Antoni C, Kalden JR, Manger B. Successful treatment of a small cohort of patients with adult onset of Still disease with infliximab (abstract). *Arthritis Rheum* 2001;44 (suppl):S118.
249. Breedveld FC, Emery P, Keystone E i sur. Infliximab in active early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2004;63:149-155.
250. Sidiropoulos P, Bertsias G, Kritikos HD, Kouroumali H, Voudouris K, Boumpas DT. Infliximab treatment for rheumatoid arthritis, with dose titration based on the Disease Activity Score: dose adjustments are common but not always sufficient to assure sustained benefit. *Ann Rheum Dis* 2004;63:144-148.



251. Lorenz HM, Antoni C, Valerius T i sur. In vivo blockade of TNF-alpha by intravenous infusion of a chimeric monoclonal TNF-alpha antibody in patients with rheumatoid arthritis. Short term cellular and molecular effects. *J Immunol* 1996;156:1646-1653.
252. Lorenz HM, Grunke M, Hieronymus T i sur. In vivo blockade of tumor necrosis factor-alpha in patients with rheumatoid arthritis: long-term effects after repeated infusion of chimeric monoclonal antibody cA2. *J Rheumatol* 2000;27:304-310.
253. Pittoni V, Bombardieri M, Spinelli FR i sur. Anti-tumor necrosis factor (TNF) alpha treatment of rheumatoid arthritis (infliximab) selectively down regulates the production of interleukin (IL) 18 but not of IL12 and IL13. *Ann Rheum Dis* 2002;61:723-725.
254. Amerio P, Frezzolini A, Abeni D. Increased IL-18 in patients with systemic lupus erythematosus: relations with Th-1, Th-2, pro-inflammatory cytokines and disease activity. IL-18 is a marker of disease activity but does not correlate with pro-inflammatory cytokines. *Clin Exp Rheumatol*. 2002; 20(4):535-8.
255. Drynda S, Kuhne C, Kekow J. Soluble tumor necrosis factor receptor treatment does not affect raised transforming growth factor  $\beta$  levels in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2002;61:254-256.
256. St Clair EW, Wagner CL, Fasanmade AA i sur. The relation of serum infliximab concentrations to clinical improvement in rheumatoid arthritis: results from ATTRACT, a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 2002;46:1451-1459.
257. Marotte H, Miossec P. Function of circulating TNF in rheumatoid arthritis patients with infliximab: link to clinical response. *Arthritis Rheum* 2002;46 (suppl):S254.
258. Stone MA, Payne U, Pacheco-Tena C, Inman RD. Cytokine correlates of clinical response patterns to infliximab treatment ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2004;63:84-87.
259. Den Broeder AA, Creemers MC, van Gestel AM, van Riel PL. Dose titration using the disease activity score (DAS28) in rheumatoid arthritis treated with anti-TNF alpha. *Rheumatology (Oxford)* 2002;41:638-42.

260. De Rycke L, Kruithof E, Van Damme N i sur. Antinuclear antibodies following infliximab treatment in patients with rheumatoid arthritis or spondylarthropathy. *Arthritis Rheum* 2003;48:1015-1023.
261. Paulus HE, Wiesner J, Bulpitt KJ i sur. Autoantibodies in early seropositive rheumatoid arthritis, before and during disease modifying antirheumatic drug treatment. *J Rheumatol* 2002; 29:2513-20.
262. Pisetsky DS. Tumor necrosis factor  $\alpha$  blockers and the induction of anti-DNA autoantibodies. *Arthritis Rheum* 2000;43:2381-2382.
263. Smeenk RJT, Berden JHM, Swaak AJG. dsDNA antibodies. U: Peter JB, Shoenfeld Y, ur. *Antibodies*. Amsterdam; Elsevier Scientific;1996;str.227-36.
264. Meilke H, Wildhagen K, Mau W, Zeidler H. Follow-up of patients with double stranded DNA antibodies induced by sulphasalazine during the treatment of inflammatory rheumatic diseases. *Rheumatology* 1993;22:299-301.
265. Rubin RL, Richardson BC. Etiology and mechanisms of drug-induced lupus. *Curr Opin Rheumatol* 1999; 11: 357-63.
266. Novak S, Čikeš N. Infliximab-induced lupus or rheumatoid arthritis (RA) overlapping with systemic lupus erythematosus (SLE) unmasked by infliximab. *Clin Exp Rheumatol* 2004; 22:268.
267. Eriksson C, Engstrand S, Sundqvist K, Rantapa-Dahlqvist S. Autoantibody formation in patients with rheumatoid arthritis treated with TNF $\alpha$  inhibitors. *Ann Rheum Dis* 2002;61(suppl I):193.
268. Jonsdottir T, Harju A, van Vollenhoven A i sur. Treatment with TNF-antagonists is associated with an increasing frequency of anticardiolipin antibodies (ACLA): ACLA positivity predicts worse clinical outcomes. *Arthritis Rheum* 2002;46 (suppl I): S573.
269. Ferraccioli G, Mecchia F, Di Poi E i sur. Anticardiolipin antibodies in rheumatoid patients treated with etanercept or conventional combination therapy: direct and indirect evidence for a possible association with infections. *Ann Rheum Dis* 2002;61:358-61.

270. Keystone EC. Advances in targeted therapy: safety of biological agents. *Ann Rheum Dis* 2003;62(Suppl II):ii34-ii36.
271. Mohan AK, Cote TR, Siegel JN, Braun MM. Infectious complications of biological treatments of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2003;15:179-184.
272. Keane J, Gershon S, Wise RP i sur. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N Engl J Med* 2001;345:1098-1104.
273. Keane J, Gershon S, Braun MM. Tuberculosis and treatment with infliximab. *N Engl J Med* 2002;346:625-626.
274. Baecklund E, Ekblom A, Sparen P i sur. Disease activity and risk of lymphoma in patients with rheumatoid arthritis. Nested case-control study. *BMJ* 1998;317:180-1.
275. Mohan N, Edwards ET, Cupps TR i sur. Demyelination occurring during anti-tumor necrosis factor alpha therapy for inflammatory arthritides. *Arthritis Rheum* 2001;44:2862-9.
276. Flendrie M, Creemers MCW, Welsing PMJ, den Broeder AA, van Riel PLCM. Survival during treatment with tumor necrosis factor blocking agents in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2003;62(Suppl II):ii30-ii33.
277. Geborek P, Crnkic M, Petersson IF, Saxne T. Etanercept, infliximab and leflunomide in established rheumatoid arthritis; clinical experience using a structured follow up programme in southern Sweden. *Ann Rheum Dis* 2002;61:793-8.
278. Cientifico Biobadaser C. Spanish experience with a registry of adverse event on biological therapy. *Ann Rheum Dis* 2003;61(suppl I): S388.

## **ŽIVOTOPIS (Curriculum vitae)**

**Mr.sc. Srđan Novak, dr.med**

**Mjesto i datum rođenja:** Rijeka, 29. rujna 1966.

**Kućna adresa:** Osječka 4, 51000 Rijeka; **email:** [srđan.novak@ri.hinet.hr](mailto:srđan.novak@ri.hinet.hr).

**Službena adresa:** KBC Rijeka, Klinika za internu medicinu, Krešimirova 42, 51000 Rijeka

**Telefon:** posao: 051 658188; kuća: 551015

### **ZAPOSLENJE:**

1993. - stručni jednogodišnji staž, KBC Rijeka

1994. - Internacionalna organizacija za migracije (IOM)

1995. - Medicinski fakultet u Rijeci, Katedra za internu medicinu i KBC Rijeka, Klinika za internu medicinu, Odjel za kliničku imunologiju i reumatologiju (od 2000.)

### **ŠKOLOVANJE:**

1980.-1984. Centar za usmjereno obrazovanje za kadrove u kulturi i obrazovanju, Rijeka

1985.-1992. Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci (prosječna ocjena 4,4, 1993. položen stručni ispit)

1995.-1999. Poslijediplomski studij, smjer opće kliničke patofiziologije, Medicinski fakultet u Rijeci

1995.-1999. Specijalizacija iz interne medicine, KBC Rijeka (studen 1999. položen specijalistički ispit pri Ministarstvu zdravstva Republike Hrvatske)

### **AKADEMSKI STUPNJEVI**

1992., svibanj - doktor medicine, Medicinski fakultet u Rijeci

1999., ožujak - magistar medicinskih znanosti, Medicinski fakultet u Rijeci

### **ZNANSTVENI STUPNJEVI**

1995.-1999. - mladi asistent na Katedri za internu medicinu, Medicinski fakultet u Rijeci

1999.- asistent na Katedri za internu medicinu, Medicinski fakultet u Rijeci

### **NAGRADE I PRIZNANJA**

1990. stipendija Grada Rijeke za osobito nadarene učenike i studente

### **STUDIJSKI BORAVCI**

1998. Beč, program za izabrane mlade kliničare na 11. svjetskom gastroenterološkom kongresu

1997., rujna - Klinika za hepatologiju, Klinička bolnica Trst, Italija

2001., veljača - Laboratorij za kliničku imunologiju "Jean Dussecat", Graz, Austrija

### **IZBOR IZ POSLIJEDIPLOMSKIH TEČAJEVA**

2000. International Workshop on Scientific Communication in Biomedicine organized by Lancet and CMJ- Split

2001. Basic course of clinical research Vienna School of Medicine - Beč

2003. 1st EULAR course on SLE, San Miniato, Italija

### **ČLANSTVA**

Hrvatsko reumatološko društvo, Hrvatsko društvo za kliničku imunologiju i alergologiju, Europsko udruženje za sklerodermiju (EUSTAR)

### **STRANI JEZICI**

engleski, talijanski i njemački jezik

### **Znanstveni rad objavljen u časopisu citiranom u tercijarnim publikacijama**

1. Vojniković B, Brčić N, Zamolo G, Budiselić R, Njirić S, **Novak S**. Severe Trichinellosis cured with pulse doses of glucocorticoids. *Coll Antropol* 2001; 25(suppl):131-5. (Current Contentst)
2. **Novak S**, Čikeš N. Infliximab-induced lupus or rheumatoid arthritis (RA) overlapping with systemic lupus erythematosus (SLE) unmasked by infliximab. *Clin Exp Rheumatol* 2004; 22:268. (Current Contentst)

### **Znanstveni rad recenziran, objavljen u zborniku radova s međunarodnog znanstvenog skupa**

1. **Novak S**, Anić B, Čikeš N, Sentić M, Bosnić D, Budiselić R. Clinical significance of occurrence of autoantibodies in rheumatoid arthritis patients treated with infliximab and metotrexate. *Ann Rheum Dis* 2003; 62 (suppl. 1); 386 (abstract) (Current Contentst)
2. Mijandrušić Sinčić B, Stamenković D, **Novak S**, Štiglic Rogoznica N. Prevalence of arthritis in inflammatory bowel disease patients - 7 year study. *Ann Rheum Dis* 2003, 62 (suppl. 1); 242 (abstract) (Current Contentst)
3. **Novak S**, Antončić I, Budiselić R i Bosnić D. Chorea as the result of late diagnosis of systemic lupus erythematosus (SLE) and antiphospholipid syndrom (APS) - case report. *Clin Exp Immunol* 2002; 20: 271 (abstract) (Current Contentst)
4. **Novak S**, Rubinić M, Milić S. Duodenal diverticulum and pancreatico-biliary disorders. *Digestion* 1998; (suppl 3):1-757;557(abstract) (Current Contentst)

### **Znanstveni rad, recenziran, objavljen u zborniku radova s domaćeg znanstvenog skupa**

1. **Novak S**, Anić B, Čikeš N i sur. Kliničko značenje pojave autoantitijela u bolesnika s reumatoidnim artritismom (RA) liječenih infliksimabom. *Reumatizam* 2003;50:61.
2. Anić B, **Novak S**, Čikeš N i sur. Djelotvornost i sigurnost primjene infliksimaba u liječenju reumatoidnog artritisa rezistentnog na standardnu terapiju – jednogodišnje iskustvo. *Reumatizam* 2003;50:60.
3. **Novak S**, Anić B, Čikeš N, Sentić M, Bosnić D i sur. Djelotvornost i sigurnost primjene infliksimaba u liječenju reumatoidnog artritisa (RA) rezistentnog na standardnu terapiju – prvi rezultati. *Reumatizam* 2002; Vol 48:2.
4. Anić B, **Novak S**, Čikeš N, Sentić M, Bosnić D i sur. Djelotvornost infliksimaba u liječenju reumatoidnog artritisa (RA) rezistentnog na standardnu terapiju – prvi rezultati. *Liječ Vjesn* 2002; suppl 3:36 (sažetak)
5. Anić B, **Novak S**, Čikeš N, Sentić M, Bosnić D i sur. Pojava autoantitijela u bolesnika s rezistentnim reumatoidnim artritismom (RA) liječenih infliksimabom. *Liječ Vjesn* 2002; suppl 3: 37 (sažetak)

SEKCIJA ZA  
RHEUMATIZAM