

Polimorfizmi gena za glutation S-transferazu kao rani predskazatelj učinkovitosti metotreksata u liječenju juvenilnog idiopatskog artritisa

Huljev Frković, Sanda

Doctoral thesis / Disertacija

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:811847>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-25**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Sanda Huljev Frković

**Polimorfizmi gena
za glutathion S-transferazu
kao rani predskazatelj
učinkovitosti metotreksata
u liječenju
juvenilnog idiopatskog artritisa**

DISERTACIJA

Zagreb, 2022.

Disertacija je izrađena u Zavodu za kliničku imunologiju, respiracijske i alergološke bolesti i reumatologiju Klinike za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Citogenetskom laboratoriju Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Marija Jelušić

Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Mariji Jelušić na ukazanom povjerenju i ustrajnoj podršci.

Svim osobama u mojoj blizini koje su mi svojom prisutnošću, djelom ili riječju pomogle da i poneki korak natrag postane korak u pravom smjeru.

Mojoj obitelji, od koje svaki dan učim kako su divni svi oblici prave ljubavi!

KAZALO

1.	UVOD	1
1.1.	Juvenilni idiopatski artritis	1
1.1.1.	Epidemiologija	2
1.1.2.	Etiopatogeneza	3
1.1.3.	Klinička slika JIA	8
1.1.4.	Laboratorijski nalazi	11
1.1.5.	Postavljanje dijagnoze	13
1.1.6.	Procjena aktivnosti bolesti	15
1.1.7.	Liječenje	18
1.1.8.	Tijek i prognoza bolesti.....	20
1.2.	Metotreksat	21
1.2.1.	Metabolički putovi metotreksata i protuupalno djelovanje	23
1.2.2.	Metotreksat u JIA	26
1.3.	Glutation S-transferaze (GSTs)	29
1.3.1.	Polimorfizmi gena za GSTs i aktivnost enzima	32
2.	HIPOTEZA	35
3.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA	36
3.1.	Opći cilj	36
3.2.	Specifični ciljevi	36
4.	ISPITANICI I METODE	37
4.1	Ispitanici	37
4.2.	Metode rada	38
4.2.1.	Anamneza i fizikalni pregled	38
4.2.2.	Laboratorijske pretrage	38
4.2.2.1.	Genotipizacija GSTM1 i GSTT1 metodom PCR	40
4.3.	Statističke metode	42
5.	REZULTATI	43
5.1.	Pregled osnovnih podataka o ispitanicima	43
5.2.	Polimorfizmi gena za GSTs	52
6.	RASPRAVA	61

7.	ZAKLJUČCI	70
8.	SAŽETAK	72
9.	SUMMARY.....	74
10.	LITERATURA	76
11.	ŽIVOTOPIS	94

POPIS OZNAKA I KRATICA

5-metil-THF	5-metil-tetrahidrofolat
7-OH-MTX	7-hidroksimetotreksat
ABCC	transportni proteini koji vežu adenzin trifosfat (engl. <i>ATP-binding cassette proteins</i>)
ABA	abatacept
ACR	Američko reumatološko društvo (engl. <i>American College of Rheumatology</i>)
ADAD1	domena 1 koja sadržava adenzin deaminazu (engl. <i>adenosine deaminase domain containing 1</i>)
ADA	adalimumab
ADGRL2	prianjajući G proteinski spojeni receptor L2 (engl. <i>adhesion G protein coupled receptor L2</i>)
ADORA	adenzin A receptor (ADORA, engl. <i>adenosine A receptor</i>)
AICAR	5-aminoimidazol-4-karboksiribonukleotid (engl. <i>5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranoside</i>)
AMP	adenzin monofosfat (engl. <i>adenosine monophosphate</i>)
AMPD	AMP deaminaza (engl. <i>adenosine monophosphate deaminase</i>)
ANA	antinuklearna protutijela (engl. <i>antinuclear antibodies</i>)
ANK	anakinra
ANKRD55	ankirinska ponavljajuća domena 55 (engl. <i>ankyrin repeat domain 55</i>)
ANGPT1	angiopoetin 1 (engl. <i>angiopoietin 1</i>)
ANTXR2	receptor antraks toksina 2 (engl. <i>anthrax toxin receptor 2</i>)
AS	ankilozantni spondilitis
ATIC	5-aminoimidazol-4-karboksiribonukleotid transformilaza (engl. <i>5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase</i>)
ATP	adenzin trifosfat
bDMARD	biološki antireumatski lijekovi koji modificiraju tijek bolesti (engl. <i>biologic disease-modifying antirheumatic drugs</i>)
CAN	canakinumab

CCP	ciklički citrulinirani protein (engl. <i>cyclic citrullinated protein</i>)
CHAQ	upitnik za ocjenu funkcijske sposobnosti i kakvoće života (engl. <i>Childhood Health Assessment Questionnaire</i>)
COG6	komponenta oligomernog Golgijeva kompleksa 6 (engl. <i>component of oligomeric Golgi complex 6</i>)
COX	ciklooksigenaza (engl. <i>cyclooxygenase</i>)
CRP	C-reaktivni protein
csDMARD	klasični sintetski antireumatski lijekovi koji modificiraju tijek bolesti (engl. <i>conventional synthetic disease-modifying antirheumatic drugs</i>)
CXCR4	kemokinski receptor tip 4 (engl. <i>C-X-C chemokine receptor type 4</i>)
CYP1A1	prvi član obitelji 1 podobitelji A u citokromu P450 (engl. <i>cytochrome P450 family 1 subfamily A member 1</i>)
DAMP	molekularni obrasci udruženi s ozljedom tkiva (engl. <i>damage-associated molecular patterns</i>)
DHFR	dihidrofolat reduktaza
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dsDNA	dvostruka uzvojnica DNA (engl. <i>double stranded DNA</i>)
ERA	entezitisu pridruženi artritis (engl. <i>enthesitis related arthritis</i>)
ETN	etanercept
Fc	kristalizirajući fragment (engl. <i>fragment crystallizable</i>)
FcRn	neonatalni Fc receptor (engl. <i>neonatal Fc receptor</i>)
Foxp3	regulator ekspresije gena regulacijskih limfocita T (engl. <i>forkhead box P3</i>)
FPGS	folilpoliglutamat sintetaza
GBM	glomerularna bazalna membrana
Gd-DTPA	gadolinij-dietilentriamin pentaocetna kiselina (engl. <i>gadolinium-diethylenetriamine pentaacetic acid</i>)
GGH	γ -glutamil hidrolaza
GK	glukokortikoidi

GSH	glutation
GST	glutation S-transferaza
GUK	glukoza u krvi
GWAS	cjelogenomska istraživanja povezanosti (engl. <i>genome-wide association study</i>)
HLA	humani leukocitni antigeni (engl. <i>human leukocyte antigens</i>)
HMGB1	protein visoke pokretljivosti skupine 1 (engl. <i>high mobility group box 1 protein</i>)
HSP	proteini toplinskog šoka (engl. <i>heatshock proteins</i>)
IBD	upalna bolest crijeva (engl. <i>inflammatory bowel disease</i>)
IFN- γ	interferon gama
IFX	infliksimab
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
IL2RA	alfa lanac receptora za interleukin 2 (engl. <i>interleukin 2 receptor subunit alpha</i>)
ILAR	Međunarodna liga reumatoloških društava (engl. <i>International League of Association for Rheumatology</i>)
ITPA	inozin trifosfataza (engl. <i>inosine triphosphatase</i>)
JADAS	ocjena aktivnosti juvenilnog idiopatskog artritisa (engl. <i>Juvenile Arthritis Disease Activity Score</i>)
JAK	Janus kinaza (engl. <i>Janus kinase</i>)
JAMAR	izvještaj višedimenzionalne procjene juvenilnog artritisa (engl. <i>Juvenile Arthritis Multidimensional Assessment Report</i>)
JDM	juvenilni dermatomiozitis (engl. <i>juvenile dermatomyositis</i>)
JIA	juvenilni idiopatski artritis
jSpA	juvenilni spondiloartritis
jSpADA	indeks aktivnosti juvenilnog spondiloartritisa (engl. <i>Juvenile Spondyloarthritis Disease Activity Indeks</i>)
KKS	kompletna krvna slika
MAS	sindrom aktivacije makrofaga (engl. <i>macrophage activation</i>)

syndrome)

MCTD	miješana bolest veziva (engl. <i>mixed connective tissue disease</i>)
MD global	procjena aktivnosti bolesti po liječniku (engl. <i>medical doctor global</i>)
MMPs	matriksne metaloproteinaze (engl. <i>matrix metalloproteinases</i>)
MR	magnetska rezonancija
MRP	mijeloid vezani protein (engl. <i>myeloid-related protein</i>)
MTHFR	metilen tetrahidrofolat reduktaza
MTX	metotreksat
MTXPG	MTX-poliglutamat
NAA25 (C12orf30)	N-alfa-acetiltransferaza 25, pomoćna podjedinica NatB (engl. <i>N-alpha-acetyltransferase 25, NatB auxiliary subunit</i>)
NF- κ B	nuklearni faktor transkripcije beta (engl. <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>)
NSAID	nesteroidni protuupalni lijekovi (engl. <i>nonsteroidal anti-inflammatory drugs</i>)
PCR	lančana reakcija polimerazom (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PCRO	procjena ishoda prema roditelju/djetetu (engl. <i>Parent/Child Reported Outcomes</i>)
PTPN22	protein tirozin fosfataza nerekceptorskog tipa 22 (engl. <i>protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22</i>)
RA	reumatoidni artritis
RAGE	receptor za krajnje produkte uznapredovale glikacije (engl. <i>receptor for advanced glycation end products</i>)
RF	reumatoidni faktor
RNA	ribonukleinska kiselina (engl. <i>ribonucleic acid</i>)
ROS	kisikove reaktivne vrste (engl. <i>oxygen reactive species</i>)
S100	proteini koji vežu kalcij topivi u 100-postotnom amonijevu sulfatu (engl. <i>calcium-binding proteins soluble in 100 % ammonium sulfate</i>)
SAM	S-adenozilmetionin

SE	sedimentacija eritrocita
sJIA	sistemska tip juvenilnog idiopatskog artritisa
SLC19A1/ RFC1	protein za transport reduciranih folata (engl. <i>solute carrier family 19, folate transporter member 1/reduced folate carrier protein 1</i>)
SLE	sistemska eritemski lupus (engl. <i>systemic lupus erythematosus</i>)
SNP	polimorfizmi jednog nukleotida (eng. <i>single-nucleotide polymorphism</i>)
SSc	sistemska sklerodermija (engl. <i>systemic sclerosis</i>)
STAT	pretvornik signala i aktivator transkripcije (engl. <i>signal transducer and activator of transcription</i>)
TBC	tuberkuloza (engl. <i>tuberculosis</i>)
TENM3	teneurinski transmembranski protein 3 (engl. <i>teneurin transmembrane protein 3</i>)
THF	tetrahidrofolat
TLR	receptori slični Tollu (engl. <i>Toll-like receptor</i>)
TNF- α	čimbenik tumorske nekroze alfa (engl. <i>tumor necrosis factor alfa</i>)
Treg	regulacijski limfociti T (engl. <i>regulatory T cells</i>)
tsDMARD	ciljani sintetski antireumatski lijekovi koji modificiraju tijek bolesti (engl. <i>targeted synthetic disease-modifying antirheumatic drugs</i>)
TYK2	tirozin kinaza 2 (engl. <i>tyrosine kinase 2</i>)
TYMS	timidilat sintaza (engl. <i>thymidylate synthase</i>)
UZV	ultrazvuk
VAS	vizualno analogna ljestvica (engl. <i>visual analogue scale</i>)
VTCN1	inhibitor 1 aktiviranja limfocita T koji sadrži domenu V (engl. <i>V-set domain containing T cell activation inhibitor 1</i>)

1.1. Juvenilni idiopatski artritis

Juvenilni idiopatski artritis (JIA) najčešća je reumatska bolest dječje dobi (1, 2, 3). Započinje prije 16. godine života, a očituje se upalom jednog ili više zglobova u trajanju od najmanje šest tjedana. Dijagnoza bolesti postavlja se sukladno kriterijima Međunarodne lige reumatoloških društava (ILAR, engl. *International League of Association for Rheumatology*) iz 1997. godine, a temelji se na kliničkim i laboratorijskim obilježjima bolesti koja se pojavljuju tijekom prvih šest mjeseci (1, 2).

JIA obuhvaća heterogenu skupinu artritisa nepoznatog uzroka. Sukladno ILAR kriterijima dijeli se s obzirom na broj zahvaćenih zglobova, prisutnost ekstraartikularnih manifestacija i dodatnih markera na sedam podtipova: oligoartikularni tip JIA (perzistentni i prošireni), poliartikularni tip s negativnim nalazom reumatoidnog faktora (RF), poliartikularni tip s pozitivnim nalazom RF, psorijatični tip, sistemski JIA (sJIA), entenzitisu pridruženi artritis (ERA, engl. *enthesitis related arthritis*) i nediferencirani JIA (1, 2). Iako prvi opisi bolesti datiraju u sredinu 19. stoljeća, do danas nije razjašnjena njezina etiologija niti su poznati svi patogenetski mehanizmi (3, 4).

Recentni protokoli liječenja JIA razvijeni su od strane Američkog reumatološkog društva (ACR, engl. *American College of Rheumatology*) 2011. godine i revidirani 2019. godine, odnosno za liječenje sJIA 2013. godine (5, 6). Današnji cilj liječenja je postizanje remisije bolesti koja je definirana kriterijima po Wallaceovoj: odsutnost zglobova s aktivnom upalom, odsutnost febriliteta, osipa, serozitisa, generalizirane limfadenopatije i splenomegalije (vezanih uz JIA), odsutnost aktivnog uveitisa, normalne vrijednosti sedimentacije eritrocita (SE) i C-reaktivnog proteina (CRP) te globalna procjena aktivnosti bolesti prema liječniku (MD global) = 0. Kriteriji za kliničku remisiju moraju biti zadovoljeni u trajanju od najmanje 6 mjeseci za bolesnike na terapiji, odnosno najmanje 12 mjeseci za bolesnike bez terapije (7 – 9).

Rana kontrola upalnog procesa u JIA korelira s povoljnijim ishodima liječenja (10, 11). Sukladno ACR protokolima liječenja JIA, prvi lijek druge linije liječenja djece s JIA je klasični sintetski antireumatski lijek koji modificira tijek bolesti (csDMARD, engl. *conventional synthetic disease-modifying antirheumatic drugs*) metotreksat (MTX). Odgovor na primjenu MTX u JIA je heterogen, s udjelom većim od 30 % djece u koje navedeni lijek nema učinka u smislu postizanja remisije. Kako je za procjenu učinka MTX nužan period od 3 do 6 mjeseci kontinuirane primjene, u djece u koje navedeni lijek neće djelovati gubi se mogućnost ranog postizanja remisije, odnosno smanjuje vjerojatnost povoljnog ishoda liječenja. Navedeno naglašava potrebu pronalaska jednog ili više pouzdanih „biomarkera“ za ranu identifikaciju djece oboljele od JIA u kojih terapija MTX neće imati učinka, odnosno djece oboljele od JIA u kojih je indiciran rani početak biološke terapije (bDMARD, engl. *biologic DMARD*) (12, 13, 14, 15).

1.1.1. Epidemiologija

Prema različitim literaturnim podacima, pojava JIA varira diljem svijeta s incidencijom od 2 do 20/100.000 i prevalencijom između 16 do 150/100.000 godišnje ovisno o geografskom području, dizajnu studije i klasifikaciji bolesti. Većina dostupnih podataka o incidenciji i prevalenciji odnosi se na populaciju Sjeverne Amerike i Europe (16, 17). Bolest je dva puta češća u djevojčica, a iznimku čini ERA (odnosno juvenilni spondiloarthritis (jSpA)) koji se češće javlja u dječaka starijih od 8 godina (3, 18). Točna učestalost bolesti nije poznata i stoga što JIA nije jedan entitet, nego više bolesti. Tako postoje varijacije u prevalenciji različitih oblika JIA s obzirom na geografsku i etničku pripadnost. Primjerice, oligoartikularni tip češći je u bijeloj rasi Europe i Sjeverne Amerike, dok je poliartikularni tip češći u crnoj rasi (3). Prema novijim studijama čini se da u europskoj populaciji postoji gradijent učestalosti koji opada od sjevera prema jugu kontinenta, s većom incidencijom u nordijskim zemljama, a manjom u Španjolskoj i Francuskoj (18, 19, 20, 21, 22). S obzirom na dob, JIA se najčešće javlja u predškolskoj dobi između prve i treće godine, iznimno rijetko prije šestog mjeseca života (3, 18).

1.1.2. Etiopatogeneza

Etiološki čimbenici i patogeneza JIA još uvijek nisu poznati. Smatra se da je riječ o složenoj interakciji između nemendelskih genetskih i čimbenika okoliša, odnosno u genetski predisponirane osobe dolazi do razvoja nekontroliranog i štetnog imunogenog odgovora prema vlastitom antigenu nakon izlaganja određenom okolišnom utjecaju (23).

Usprkos kliničkoj heterogenosti bolesti, puno je dokaza koji govore u prilog važnosti genetskih čimbenika u imunopatogenezi JIA. U prilog navedenoj činjenici idu stopa podudarnosti pojave bolesti kod monozigotnih blizanaca od 25 do 40 %, češća pojava bolesti u određenim obiteljima i dokazi o većoj prevalenciji autoimunih bolesti među srodnicima oboljele osobe u prvom koljenu. Uz navedeno, u studijama s blizancima te braćom i sestrama, JIA je sličnih kliničkih obilježja i tijeka (24, 25).

Posljednjih godina brojni lokusi u genomu povezani su s JIA zahvaljujući cjelogenomskim studijama povezanosti (GWAS, engl. *genome-wide association study*). Prema ovim istraživanjima, glavni sustav tkivne snošljivosti HLA (engl. *human leukocyte antigens*) najviše pridonosi potvrdi genetske predispozicije za JIA (26). Geni unutar HLA kompleksa kodiraju molekule klase I (HLA A, B i C) i klase II (HLA-DR, DP i DQ). Alel klase I, HLA-A2 povezuje se s različitim podtipovima JIA, posebice onim s ranim početkom bolesti. HLA-B27 povezuje se s ERA. Najveću međusobnu genetsku podudarnost unutar HLA sustava pokazuju oligoartikularni i RF negativni poliartikularni tip, što je u skladu s kliničkom ekspresijom. Oligoartikularni tip JIA ima najviše povezanosti s alelima HLA DRB1*01, DRB1*08, DRB1*11, DRB1*13, DPB1*02 i DQB1*04. Poliartikularni RF negativni tip JIA povezuje se s DRB1*08 i DPB1*03, dok je RF pozitivni poliartikularni tip koji je fenotipski sličan reumatoidnom artritisu (RA) odraslih povezan s DRB1*04, DQA1*03 i DQB1*03. Zanimljivo je da se lokusi DRB1*04 i DRB1*07 smatraju protektivnim za oligoartikularni, a DRB1*15:01 za oligoartikularni i poliartikularni RF negativni JIA. sJIA pokazuje jasnu povezanost samo s alelom HLA-DRB1*11 bez drugih povezanosti s HLA sustavom (24, 26). Ovo je u skladu s rezultatima dobivenim uporabom GWAS Umbrella i sur. u kojima

je na genetskoj razini potvrđena jedinstvena arhitektura sJIA s obzirom na izostanak povezanosti s drugim tipovima JIA (27).

Osim HLA sustava GWAS su identificirala i druga područja u genomu koja ukazuju na povezanost s JIA (28). Prva GWAS s JIA bolesnicima pokazala je najveću povezanost s genom VTCN1 (inhibitor 1 aktiviranja limfocita T koji sadrži domenu V, engl. *V-set domain containing T cell activation inhibitor 1*) koji kodira protein iz skupine B7 i eksprimira se na površini stanica koje prezentiraju antigen i komuniciraju s ligandima na limfocitima T (29). Nadalje, GWAS koja je obuhvatila 388 djece s JIA i kontrolom od 2500 zdrave djece europskog podrijetla potvrdila je tri ranije utvrđena lokusa mapirana na genima PTPN22 (protein tirozin fosfataza nerekceptorskog tipa 22, engl. *protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22*), IL2RA (alfa lanac receptora za interleukin 2, engl. *interleukin 2 receptor subunit alpha*) i ANTXR2 (receptor antraks toksina 2, engl. *anthrax toxin receptor 2*). Uz to, identificiran je i novi lokus CXCR4 (C-X-C kemokinski receptor tip 4, engl. *C-X-C chemokine receptor type 4*) (30, 31).

Varijante gena PTPN22 povezane su s JIA, ali i drugim autoimunim bolestima. Protein koji kodira ovaj gen uglavnom se eksprimira u citoplazmi hematopoetskih stanica. Prethodne studije pokazale su da se broj efektorskih / memorijskih limfocita T povećao u miševa s nedostatkom Ptpn22, u usporedbi s miševima divljeg tipa tijekom stanja mirovanja, ali nije imalo utjecaja na nepobuđene limfocite T što ukazuje na moguću važnost u efektorskoj regulaciji (32).

U cilju sustavnog istraživanja potencijalnog pleiotropnog učinka gena udruženih s različitim autoimunim bolestima Li i sur. (33) proveli su metaanalizu na GWAS različitih autoimunih bolesti koje se javljaju u pedijatrijskoj dobi. Polimorfizmi jednog nukleotida (SNP, engl. *single-nucleotide polymorphism*) na lokusima ADGRL2 (prijanjajući G proteinski spojeni receptor L2, engl. *adhesion G protein coupled receptor L2*), PTPN22, TENM3 (teneurinski transmembranski protein 3, engl. *teneurin transmembrane protein 3*), ANKRD55 (ankirinska ponavljajuća domena 55, engl. *ankyrin repeat domain 55*), IL2RA, IL-21 (interleukin-21) i ANKRD30A (ankirinska ponavljajuća domena 30A, engl. *ankyrin repeat domain 30A*) povezuju se s JIA te drugim autoimunim bolestima kao što su autoimuni tireoiditis, ulcerozni kolitis, celijakija, sistemski eritemski lupus (SLE, engl. *systemic lupus erythematosus*). U oligoartikularnom i poliartikularnom RF

negativnom tipu JIA uz ranije poznate lokuse autoimunih bolesti uključujući PTPN22, STAT4 (pretvornik signala i aktivator transkripcije 4, engl. *signal transducer and activator of transcription 4*), NAA25 (C12orf30) (N-alfa-acetiltransferaza 25, pomoćna podjedinica NatB, engl. *N-alpha-acetyltransferase 25, NatB auxiliary subunit*) i ADAD1-IL2-IL21 (domena 1 koja sadržava adenozin deaminazu, engl. *adenosine deaminase domain containing 1*) identificirana su još tri lokusa PTPN2, COG6 (komponenta oligomernog Golgijeva kompleksa 6, engl. *component of oligomeric Golgi complex 6*) i ANGPT1 (angiopoetin 1, engl. *angiopoietin 1*) u studiji koja je obuhvatila 809 pacijenata s ovim tipom nasuprot kontroli od 3535 zdravih Europljana nehispankog podrijetla, što ukazuje na njihovu zajedničku genetsku predispoziciju (34). Nasuprot tome, spomenuta GWAS u sJIA (27), uz navedeni HLA alel HLA-DRB1*11 istakla je novi lokus na kromosomu 1p36.32 kao lokus povezanosti s navedenim tipom JIA. Provedene studije nisu pronašle preklapajuće genetske lokuse između sJIA i drugih uobičajenih podtipova JIA (27, 28, 33, 34).

GWAS ukazuju na predispoziciju određenih genetskih lokusa, ali imaju svoje ograničenje zbog malog uzorka, različitih podtipova bolesti te nemogućnosti otkrivanja suptilnih uzročnih varijanti i uloge nekodirajućeg dijela genoma u razvoju bolesti. Genetskoj komponenti u procesu patogeneze i razvoja JIA svakako pridonosi i epigenetska modulacija. Studije transkriptoma i epigenetske studije zasigurno će u budućnosti povećati doprinos genetskih čimbenika u etiopatogenezi JIA (35 – 37).

Pretpostavlja se da će sve veća dostupnost i standardiziranje genetskih pretraga, temeljem analize velikog broja bolesnika, dovesti do definiranja takozvanog „genomskog potpisa“ temeljem kojeg će se u pojedinog bolesnika definirati tip bolesti, učinkovitost različitih lijekova te u konačnici i prognoza bolesti (38, 39).

Čimbenici okoliša predmet su brojnih znanstvenih pregleda i danas se smatra da mogu utjecati na razvoj JIA preko različitih mehanizama, uključujući spomenute epigenetske promjene, neravnotežu mikrobiote i direktne modulacije imunosnog sustava. Prema provedenim istraživanjima, kao čimbenici koji imaju potencijalno zaštitnu ulogu u nastanku JIA navode se prehrana na prsima te život s braćom ili sestrama u istom kućanstvu, ali čvrsti dokazi o efektu ovih čimbenika su ograničeni jer ovise o socioekonomskom statusu, genetskim utjecajima, ali i

dizajnu provedenih ispitivanja (40 – 42). Premda se za infekcije smatra da pridonose nastanku JIA ili potiču razvoj relapsa bolesti, provedene studije nisu potvrdile jasnu povezanost između infektivnih uzroka i nastanka bolesti (43). Pretpostavlja se da djeca rođena elektivnim carskim rezom u usporedbi s djecom rođenom prirodnim putem mogu imati predispoziciju za imunosne poremećaje zbog promjene mikrobiote i imunosnog odgovora, ali i za ovu pretpostavku još uvijek nedostaju čvrsti dokazi (40, 44). Promjene u crijevnom mikrobiomu koje formiraju proupalnu okolinu prisutne su u bolesnika s JIA, ali ne treba zanemariti varijable tipa i trajanja bolesti, čimbenike prehrane, upotrebe lijekova i drugih mogućih utjecaja, što implicira daljnja istraživanja (45). Konačna saznanja o ulozi do sada pretpostavljenih ili nekih novih čimbenika okoliša zahtijevat će najvjerojatnije nove studije koncipirane na temelju spoznaja iz područja genomike, epigenomike, mikrobioma i djelovanja okoliša u djece koja su razvila ili imaju rizik za JIA kako bi se identificirali pravi utjecaji s ciljem prevencije i poboljšanja ishoda bolesti (40).

Na podlozi pretpostavljene genetske predispozicije i utjecaja okoliša u bolesnika s JIA se razvija imunopatogenetski slijed u kojem važnu ulogu imaju mreža citokina, regulacijski limfociti T, te alarmni odnosno molekularni obrasci udruženi s ozljedom tkiva (DAMP, engl. *damage-associated molecular patterns*) (3). Pri tome, narušena ravnoteža imunosnog sustava, koja se očituje povišenim razinama citokina Th1 (dominantno IFN- γ (interferon γ)) i sniženim razinama citokina Th2 (dominantno IL-4 i IL-10) u serumu, sinovijalnoj tekućini i sinoviji, predstavlja samo dio složenog imunosnog poremećaja u oboljelih od RA i JIA (3, 46).

Regulacijski limfociti T (Treg) smatraju se ključnim stanicama u razvoju autoimunosti, s obzirom na to da osim odgovora na strane, reguliraju imunosni odgovor i na vlastite antigene. U fiziološkim uvjetima za njihov razvoj i djelovanje nužan je transkripcijski faktor Foxp3 (regulator ekspresije gena regulacijskih limfocita T, engl. *forkhead box P3*), a karakterizira ih visoka površinska gustoća receptora za IL-2 (IL-2R, CD25). Svoju ulogu u kontroli imunosnog odgovora obavljaju supresijom efektorskih limfocita T (47). U bolesnika s težim oblicima JIA smanjena je razina Treg limfocita, a oni i slabije suprimiraju proliferaciju ostalih tipova limfocita T. Nalaz povećanog broja Treg u sinovijalnoj tekućini upaljenih

zglobova ukazuje na nastojanje kontrole autoimunosne upale od strane imunskog sustava, bilo direktno ili putem topivih medijatora (3, 48).

U patogenezi autoimunih bolesti općenito, pa tako i patogenezi JIA, važnu ulogu imaju i limfociti Th17 koji luče proupalni citokin IL-17. Navedeni citokin potiče makrofage na lučenje TNF- α (čimbenik tumorske nekroze alfa, engl. *tumor necrosis factor alpha*) i IL-1, kojima stimulira sinoviocite na lučenje IL-6 i IL-8 i potencira upalno zbivanje. Naglašeno povišene razine Th17 dokazane su u sinoviji oboljelih od oligoartikularnog tipa JIA te u serumu oboljelih od sJIA (3, 4, 49). U ERA bolesnika s pozitivnim nalazom HLA-B27, zbog pogrešnog savijanja i dimerizacije molekula B27 dolazi do poremećaja sekretornih mehanizama endoplazmatskog retikuluma. Isti rezultira naglašenom ekspresijom IL-23 i patogenom diferencijacijom limfocita Th17 (49, 50).

Među efektornim molekulama posebnu ulogu u razvoju JIA imaju autoantitijela.

Tako u patogenezi poliartikularnog, RF pozitivnog tipa JIA važnu ulogu ima RF. RF je autoantitijelo, obično klase IgM (imunoglobulin M) usmjereno na Fc fragment (kristalizirajući fragment, engl. *fragment crystallizable*) molekule IgG. Vežanjem RF na IgG nastaju imunokompleksi koji mogu aktivirati sustav komplementa, a vežanjem za mikrovaskulaturu sinovije povećavaju njezinu permeabilnost i ulazak upalnih stanica te direktno induciraju produkciju citokina u sinovijalnim stanicama (50).

Autoantitijela usmjerena na ciklički citrulinirani peptid (anti-CCP, engl. *anti-cyclic citrullinated peptide*), pozitivna u do 48 % bolesnika s poliartikularnim, RF + tipom JIA, imaju sličan mehanizam djelovanja (50).

Mehanizam djelovanja ANA (antinuklearna antitijela, engl. *antinuclear antibodies*) u JIA još nema patofiziološko objašnjenje (50).

Novija istraživanja upućuju i na važnu ulogu poremećaja mehanizama prirođene imunosti u razvoju JIA na što, između ostalog, ukazuje naglašena indukcija transkripcije gena prirođene imunosti, posebno gena IL-1 u mononuklearima periferne krvi oboljelih.

Glavnu ulogu u navedenim mehanizmima imaju alarmini kojima pripadaju: protein visoke pokretljivosti iz skupine 1 (HMGB1, engl. *high mobility group box 1 protein*), proteini skupine S100 koji vežu kalcij (npr. S100A8, S100A9 i S100A12, engl.

calcium-binding proteins) i proteini toplinskog šoka (HSPs, engl. *heatshock proteins*). Ova skupina multifunkcionalnih proteina, eksprimirana u granulocitima, monocitima i makrofagima tijekom njihove diferencijacije, po otpuštanju u međustanični prostor (najčešće nakon ozljede tkiva ili infekcije) veže se za receptore slične Tollu (TLR4) na površini monocita, u kojima potom aktiviraju nuklearni faktor transkripcije beta (NF- κ B, engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) te produkciju TNF- α koji pridonosi razvoju upale (3, 48). Ključni učinak alarmina u patogenezi JIA obilježen je pojačavanjem prirodnog imunskog odgovora djelovanjem na stanice koje prezentiraju antigen i posrednim djelovanjem na mehanizme stečene imunosti, donosno povezivanjem mehanizama prirodnog i stečenog imunskog odgovora. Razine alarmina koriste se kao biomarker pri određivanju aktivnosti bolesti (3, 50).

Iako sudjeluju u patogenezi svih tipova JIA, poremećaji mehanizama prirodne imunosti odnosno autoinflamatorna zbivanja imaju centralno mjesto u patogenezi sJIA s naglašenim sistemskim kliničkim simptomima (pseudoseptičke temperature, limfadenopatija, osip, hepatosplenomegalija, serozitis). Na to ukazuju serumske koncentracije S100A8 i S100A9 koje su do 44 puta više u bolesnika sa sJIA u odnosu na zdrave osobe, osobe sa sistemskim infekcijama, hematoonkološkim bolestima ili drugim autoinflamatornim stanjima (50). S100A9 je snažan induktor IL-1 β ekspresije u fagocitima te i na taj način igra važnu ulogu u upalnoj kaskadi u sJIA. Drugi citokin iz IL-1 obitelji, IL-18, također je povišen u sJIA, a njegove izrazito visoke koncentracije koriste se za predikciju razvoja sindroma aktivacije makrofaga (MAS, engl. *macrophage activation syndrome*) u navedenih bolesnika (50, 51).

1.1.3. Klinička slika JIA

JIA predstavlja skupinu bolesti podijeljenih u sedam podskupina temeljem broja zahvaćenih zglobova, s obzirom na oblik i vrijeme nastupa simptoma, pridružene znakove i trajanje simptoma bolesti. Najčešći su oligoartikularni (56 – 60 %) i poliartrikularni tip bolesti (25 – 30 % bolesnika). Artritis se prepoznaje po klasičnim znakovima upale: zglob je otečen, bolan, topao, funkcija zgloba je poremećena, koža iznad zgloba rijetko je crvena (slika 1) (2, 3).

Oligoartikularni tip predstavlja upalu jednog do četiri zglobova tijekom prvih šest mjeseci bolesti. Razlikuju se dvije podskupine: perzistirajući oligoartikularni tip (90 – 95 % bolesnika) kod kojeg bolest ostaje ograničena na četiri zglobova i prošireni oligoartikularni tip (5 – 10 % bolesnika) u kojem nakon šest mjeseci bolest zahvaća pet ili više zglobova. Oligoartikularni tip pojavljuje se vrlo rano, između prve i treće godine života, češće u djevojčica, a 60 do 80 % bolesnika ima pozitivna ANA. Najčešće su nesimetrično zahvaćeni veliki zglobovi, obično koljeno, gležanj ili lakat (3, 52). Kronični uveitis javlja se u oko petine bolesnika s oligoartritisom i obično je inicijalno asimptomatski, stoga je u ovom obliku posebno važno redovito oftalmološko praćenje (52, 53).

Poliartikularni oblik predstavlja upalu pet ili više zglobova tijekom prvih šest mjeseci bolesti. Ovaj tip bolesti se dijeli u dvije skupine, seropozitivni (poliartikularni tip s pozitivnim nalazom RF) i seronegativni (poliartikularni tip s negativnim nalazom RF) artritisa. Artritis najčešće zahvaća velike zglobove, ali i male zglobove šaka i stopala, cervikalne kralježnice i temporomandibularne zglobove te se uglavnom javlja simetrično. Seronegativni oblik češći je u djetinjstvu, dok je seropozitivni češći u starijih djevojčica i adolescentica te ima klinička obilježja slična onima u RA odraslih, poput rane pojave erozivnog sinovitisa i kronični tijek koji se nastavlja u odraslu dob. U početku bolesti ili za vrijeme egzacerbacija mogu biti prisutni i sistemski znakovi bolesti kao što su povišena tjelesna temperatura, hepatosplenomegalija i limfadenopatija. Kronični uveitis javlja se u 5 do 10 % oboljelih (52 – 54).

Sistemski JIA javlja se približno u 10 % bolesnika. Karakteriziraju ga opći simptomi bolesti, a u kasnijem tijeku pojava artritisa. Pojavljuje se s podjednakom učestalošću u dječaka i djevojčica, najčešće oko druge godine života. Dijagnoza se prema ILAR-ovim kriterijima postavlja temeljem postojanja artritisa, kojem prethodi ili je udružen s povišenom tjelesnom temperaturom u trajanju od najmanje dva tjedna uz postojanje barem jednog od sljedećih simptoma: mrljasti ili makulopapulozni osip, splenomegalija i/ili hepatomegalija, generalizirana limfadenopatija, serozitis. Dijagnoza ovog oblika je klinička, a diferencijalno dijagnostički dolaze u obzir različiti klinički entiteti kao što su infekcije, maligne bolesti, autoinflamatorni sindromi ili druge autoimunosne bolesti (55, 56).

Psorijatični artritis ima 2 – 7 % bolesnika s JIA. Karakterizira ga istodobna prisutnost artritisa i tipičnog psorijatičnog osipa ili ako je osip odsutan, prisutnost artritisa i barem dvaju od sljedećih znakova: daktilitis, psorijatične promjene noktiju ili pozitivna obiteljska anamneza u srodnika u prvom koljenu (3, 57, 58).

ERA čini skupinu juvenilnih spondiloartritisa, a obuhvaća dvije bolesti: nediferencirane spondiloartropatije i juvenilni ankilozantni spondilitis. Javlja se u približno 3 – 11 % bolesnika s JIA. Prema ILAR-ovim kriterijima ERA se definira kao istodobna prisutnost artritisa i entezitisa. Ako je prisutan samo artritis ili samo entezitis tada je za potvrdu dijagnoze potrebna prisutnost još najmanje dvaju od sljedećih znakova: sakroileitis, prisutnost HLA-B27 antigena, artritis u dječaka starijih od osam godina, akutni simptomatski prednji uveitis, HLA-B27 povezane bolesti u srodnika u prvom ili drugom koljenu (2, 3, 59).

Nediferencirani artritis predstavlja podskupinu kojom se obuhvaćaju pacijenti koji ne zadovoljavaju dijagnostičke kriterije za navedene kategorije JIA ili ispunjavaju kriterije za više različitih podskupina JIA (2, 54).



Slika 1. Otok koljenskih zglobova u JIA (arhiva Zavoda za kliničku imunologiju, respiracijske i alergološke bolesti i reumatologiju Klinike za pedijatriju KBC-a Zagreb)

1.1.4. Laboratorijski nalazi

Dijagnoza JIA primarno se temelji na kliničkim kriterijima. Laboratorijski testovi služe kao dokaz prisutne upale i podupiru kliničku dijagnozu JIA. Važni su pri određivanju tipa bolesti, odabiru terapije, praćenju učinka terapije i njezinih mogućih nuspojava. Nema laboratorijskog testa koji je specifičan i koji izdvaja JIA u odnosu na druge bolesti (3, 52, 60 – 64).

Nalazi ubrzane SE i povišene koncentracije CRP tipično se nalaze u sJIA te poliartikularnim tipovima bolesti, rjeđe u uznapredovalim slučajevima ERA. U sJIA dodatno se nalaze i posebno visoke koncentracije feritina i fibrinogena te nespecifičnih markera upale S100A8/9 i S100A12. Posebnu situaciju u slučajevima sJIA predstavlja razvoj MAS, kada uz odgovarajuću kliničku sliku (pogoršanje općeg stanja bolesnika, kontinuirani febrilitet) te porast koncentracija CRP i feritina dolazi do pada koncentracije fibrinogena i brzine SE. Febrilni bolesnik sa sJIA ili sumnjom na sJIA zadovoljava postojeće dijagnostičke kriterije za MAS ukoliko uz koncentraciju feritina iznad 684 ng/ml ima prisutna još dva od sljedećih laboratorijskih kriterija: trombociti $\leq 181 \times 10^9/l$, aspartat-aminotransferaza (AST) $> 48 U/l$, trigliceridi $> 156 mg/dl$, fibrinogen $\leq 360 mg/dl$ (52, 60 – 63).

Ukoliko upalni proces dulje traje, u kompletnoj krvnoj slici (KKS) registrira se anemija kao posljedica kronične bolesti. Iznimno, anemija u sklopu simptoma koji ukazuju na razvoj ERA može ukazivati i na krvarenje iz probavne cijevi odnosno razvoj upalne bolesti crijeva (IBD). Leukocitoza je česta kod djece s aktivnom bolešću, posebno u sJIA i poliartikularnim oblicima bolesti. Tijekom liječenja tipična je u tijeku sistemske primjene glukokortikoida (GK). Nasuprot tome, inicijalno registrirana leukopenija može ukazivati na razvoj neke druge upalne reumatske bolesti (npr. SLE), a tijekom liječenja može se razviti kao nuspojava primijenjenih lijekova (npr. MTX, tocilizumab (TCZ)) (60). Promjene broja trombocita slične su po dinamici i etiologiji promjenama u broju leukocita (52, 62, 64).

U sklopu bolesti, posebno kod sJIA, može se registrirati porast koncentracije aminotransferaza. Iste je nužno odrediti i prije početka terapije nesteroidnim protuupalnim lijekovima (NSAID, engl. *nonsteroidal anti-inflammatory drugs*), GK, MTX ili bDMARD zbog praćenja efekta terapije, a posebno zbog

registriranja eventualnih neželjenih učinaka navedenih lijekova na funkciju jetre (58, 62). S ciljem praćenja nuspojava lijekova nužno je tijekom liječenja pratiti i koncentracije glukoze u krvi (GUK) zbog moguće hiperglikemije pri primjeni GK te ureje i kreatinina zbog mogućeg poremećaja funkcije bubrega kod primjene NSAID.

U nalazu elektroforeze proteina u sklopu JIA može se registrirati hipoalbuminemija kao odraz kronične bolesti (52, 64). Na početku bolesti, posebno kod sJIA te poliartikularnih oblika registrira se porast koncentracije α 2-globulina kao odraz akutnog zbijanja te γ -globulina kao odraz produkcije autoantitijela. Uz posljednje je vezana i albuminsko-globulinska (A/G) inverzija koja također ukazuje na sistemsko autoimunosno zbijanje. U imunoelektroforezi proteina može se registrirati porast IgG i/ili IgM, rjeđe IgA, također u smislu pojačane produkcije autoantitijela.

S druge strane, izostanak nalaza koji ukazuju na sistemsko upalno / imunosno zbijanje ne isključuje dijagnozu JIA (52).

Pozitivan nalaz ANA je visoko osjetljiv u smislu postavljanja dijagnoze SLE, ali i drugih autoimunih bolesti kao što su miješana bolest veziva (MCTD, engl. *mixed connective tissue disease*), juvenilni dermatomiozitis (JDM), Sjögrenov sindrom, sistemska sklerodermija (SSc, engl. *systemic sclerosis*), autoimuni hepatitis, primarna bilijarna ciroza, ulcerozni kolitis i autoimuni tireoiditis. Određivanje ANA ne koristi se za postavljanje dijagnoze JIA, ali ima prognostičku važnost, s obzirom na to da je pozitivan nalaz vezan uz povećani rizik od razvoja inicijalno asimptomatskog, kroničnog uveitisa (52). Ukupno je pozitivan u nešto manje od 50 % djece s JIA (do 80 % djece s oligoartikularnim tipom, u 30 – 40 % s poliartikularnim tipom te 15 – 20 % s psorijatičnim tipom), češće u mlađe djece te djece ženskog spola. Nasuprot navedenom, nalaz ANA je pozitivan i u do 20 % potpuno zdrave djece, a ponekad lažno ili tranzitorno pozitivan i u infekcijama, što može otežati interpretaciju nalaza i zahtijevati ponovno određivanje s vremenskim odmakom (52, 64). U tom smislu korisno može biti određivanje i anti-DFS70 protutijela (DFS, engl. *dense fine speckled*) vezanih uz fino zrnati uzorak u nalazu indirektno imunofluorescencije. Njihova prevalencija u većini provedenih studija je značajno viša u zdravih osoba s pozitivnim nalazom ANA, odnosno smatraju se

korisnima u isključivanju upalnih reumatskih bolesti s pozitivnim nalazom ANA, uključujući i JIA s ili bez uveitisa (65 – 67).

Nalaz pozitivnog RF nije potreban niti dostatan za postavljanje dijagnoze JIA. Pozitivan nalaz RF dominantno se vezuje uz dijagnozu RA u odraslih, iako može biti pozitivan i u slučajevima reumatske vrućice, SLE i Sjögrenova sindroma. Također može biti pozitivan u slučajevima infekcija kao što su tuberkuloza (TBC) ili Lajmska bolest, ali i u potpuno zdravih osoba. Većina djece s JIA imat će negativan nalaz RF (pozitivan u < 5 % bolesnika s JIA). Ipak, određivanje RF je nužno kako bi se prepoznali slučajevi poliartikularnog, RF pozitivnog tipa bolesti, s obzirom na to da je isti vezan uz teže oblike bolesti i lošiju prognozu. Pozitivan nalaz RF zahtijeva potvrdu ponavljanjem pretrage u 2 ili više navrata u minimalnom razmaku od 3 mjeseca. Ponavljanje nalaza je nužno jer RF može biti prolazno ili lažno pozitivan, posebno kao epifenomen odgovora imunskog sustava na infekciju (52, 63, 64).

Slično kao i u odraslih, djeca s RF pozitivnim poliartikularnim tipom bolesti mogu razviti i anti-CCP. Pretpostavlja se da je njihova prisutnost, isto kao i u odraslih s RA, vezana uz teže, agresivnije forme bolesti (52, 64).

Iako je jasno utvrđena povezanost pojavnosti JIA s HLA sustavom, određivanje pojedinih lokusa ne predstavlja rutinski dio obrade osim kod sumnje na razvoj ERA (63). U slučajevima navedenog tipa bolesti, pozitivan nalaz HLA-B27 lokusa (u 60 do 70 % pacijenata) dodatno povećava vjerojatnost dijagnoze ERA, iako nije nužan za postavljanje dijagnoze. Pozitivan nalaz HLA-B27 lokusa vezan je i uz veću vjerojatnost razvoja akutnog uveitisa (koji se nasuprot kroničnom uveitisu može javiti isključivo u ERA) te razvoj simptoma JIA u sklopu IBD (63).

1.1.5. Postavljanje dijagnoze

Dijagnoza JIA temelji se na osobnoj i obiteljskoj anamnezi, detaljnom kliničkom pregledu, slikovnim pretragama, laboratorijskim nalazima i postojećim kliničkim kriterijima za pojedine tipove bolesti. Za postavljanje dijagnoze ponekad je potreban određeni vremenski period s obzirom na karakterističan tijek i izostanak patognomonične značajke koja bi bila specifična za bolest. U

anamnestičkim podacima važno je usmjeriti pažnju na trajanje i postojanje određenih tegoba u smislu pojave povišene tjelesne temperature, prisutnost otekline, boli ili topline te poremećene funkcije pojedinog zgloba. Važno je imati precizne podatke, primjerice jutarnja ukočenost u trajanju duljem od 15 minuta karakterističan je simptom, a povišena tjelesna temperatura je obično prisutna u popodnevnim satima i nije kontinuirana, već je pseudoseptična ili povremena. Laboratorijski pokazatelji nisu uvijek specifični, ali mogu biti važni u određivanju tipa bolesti i opisani su u zasebnom potpoglavlju (3, 68).

Radi upotpunjivanja dijagnoze potrebno je učiniti radiološku obradu. Radiološke pretrage su zlatni standard u detekciji strukturnih zglobnih promjena i oštećenja kosti u bolesnika s JIA. Iako se klasičnim rendgenogramima u pravilu otkriva paraartikularna osteopenija i ubrzana maturacija jezgara okoštavanja u blizini upalom zahvaćenog zgloba, s obzirom na njihovu slabu osjetljivost u otkrivanju aktivnog sinovitisa i ograničenja pri detekciji ranih erozivnih promjena, nastala je potreba za korištenjem drugih slikovnih metoda u dijagnostici, poput ultrazvuka (UZV) i magnetske rezonancije (MR). Ultrazvučna obrada je neinvazivna, brza i učinkovita metoda pri analizi površine hrskavice, izljeva i zadebljanja sinovije, posebno uz primjenu osnaženog doplera (*power Doppler*) i obojene (*color*) dopler tehnologije u procjeni aktivnosti bolesti (69, 70). MR je jedini alat kojim je moguće prikazati sve značajke sinovijalne bolesti, hrskavice, rane erozivne promjene, a posebno je pogodan za procjenu aktivnosti bolesti u području temporomandibularnih zglobova, kukova, zglobova kralježnice i sakroilijakalnih zglobova. Može imati značajnu ulogu u diferencijaciji JIA u odnosu na infektivni ili maligni proces te stanja koja zahtijevaju ortopedsko liječenje. Kod MR snimanja moguća je upotreba kontrastnog sredstva, gadolinij-dietilentriamin pentaoctene kiseline (Gd-DTPA, engl. *gadolinium diethylenetriamine pentaacetic acid*), koja ima paramagnetski učinak na protone vode. Intenzitet signala povećava se proporcionalno koncentraciji Gd-DTPA, koja se brzo distribuira u vaskularna tkiva pa se upalom zahvaćena sinovija prikazuje pojačanim intenzitetom. Tehnika dinamičke MR omogućuje mjerenje intenziteta sinovitisa ispitivanjem unosa gadolinija u jedinici vremena (71).

Denzitometrija skeleta također ima važnost u obradi pacijenata s JIA. Oboljeli imaju sniženu mineralnu gustoću kosti zbog sistemskog djelovanja

proupalnih citokina koji naglašeno suprimiraju aktivnost osteoblasta (više nego osteoklasta). Denzitometrijom se, osim pri inicijalnoj obradi, periodično prati i aktivnost bolesti odnosno efekt liječenja (72).

JIA je najčešća neinfektivna sistemska bolest dječje dobi uz koju se pojavljuje uveitis, stoga je oftalmološki pregled prednjeg segmenta oka procjepnom svjetiljkom uz pregled očne pozadine oftalmoskopom važan dio dijagnostičkog procesa i praćenja ovih bolesnika. Kronični uveitis najčešće se pojavljuje kod oligoartikularnog oblika bolesti, te u poliartikularnom, RF negativnom tipu i psorijatičnom artritisu (3, 52, 53).

1.1.6. Procjena aktivnosti bolesti

Današnji cilj liječenja JIA je uspješna kontrola simptoma / upalnih manifestacija bolesti u cilju poboljšanja kvalitete života i smanjenja trajnog oštećenja. Kako bi se postigao ovaj učinak, poželjno je praćenje tijeka bolesti i kliničkog statusa kroz redovitu primjenu mjera za validaciju aktivnosti bolesti, koje su lako upotrebljive u svakodnevnoj kliničkoj praksi (73).

Validacijske mjere koje se koriste kod djece s JIA u zadnjih nekoliko godina uključuju: ocjenu aktivnosti bolesti, odgovor na terapiju i procjenu kvalitete života uz parametre koji se odnose na sve fenotipove JIA. Ovakve udružene, kompozitne ocjene aktivnosti bolesti omogućuju usporedbu statusa bolesti između pojedinih bolesnika i različitih skupina bolesnika (74).

Jedna od takvih zbirnih ocjena aktivnosti JIA je JADAS (engl. *Juvenile Arthritis Disease Activity Score*) razvijena 2009. godine (75). JADAS uključuje procjenu aktivnosti bolesti prema liječniku (engl. *medical doctor (MD) global*), procjenu aktivnosti bolesti prema roditelju, brzinu SE i broj zglobova zahvaćenih aktivnom bolešću. Roditeljska i liječnička procjena temelje se na vizualnim analognim ljestvicama (VAS, engl. *visual analogue scale*) gdje oznaka 0 označava „bez aktivnosti“, a oznaka 10 „maksimalnu aktivnost“. JADAS predstavlja jednostavan zbroj svojih komponenti, a razvijene su tri njegove verzije koje se razlikuju prema broju zglobova obuhvaćenih procjenom – JADAS10, JADAS27 i JADAS71 (76).

Uz osnovnu, razvijene su druge dvije verzije JADAS-a. Prva, JADAS-CRP, u kojoj je brzina SE zamijenjena koncentracijom CRP te druga, cJADAS, u kojoj se aktivnost bolesti procjenjuje na temelju kliničkih parametara, bez vrijednosti SE ili CRP. Obje ove verzije imaju dobru korelaciju s originalnim JADAS bodovnim sustavom (77, 78).

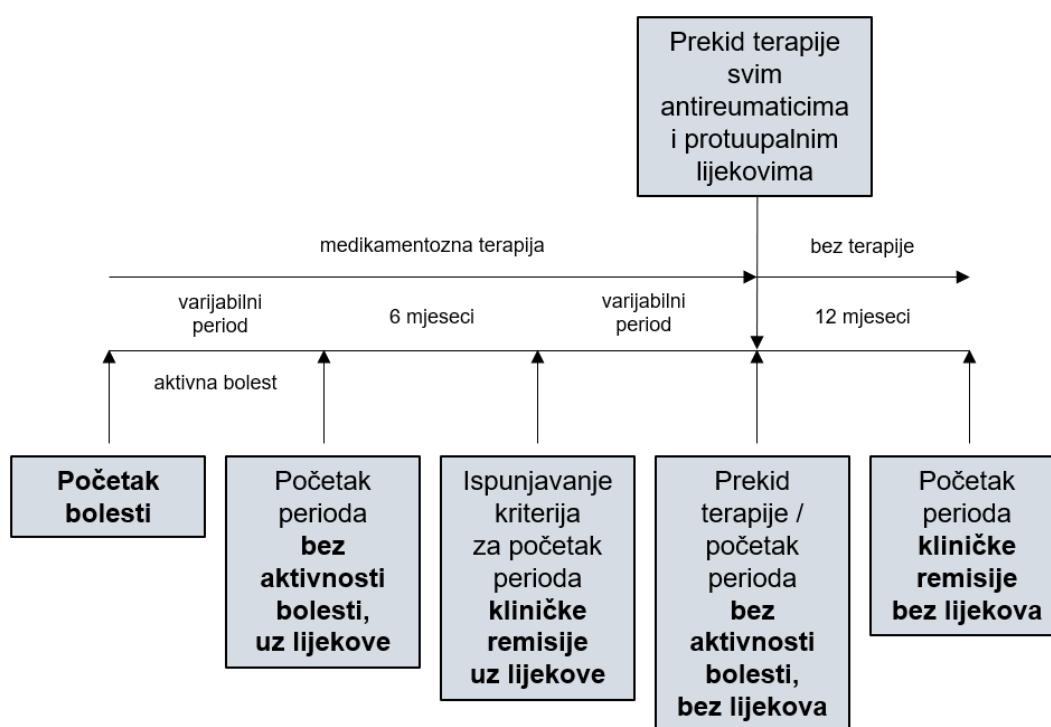
Za procjenu aktivnosti jSpA osmišljena je 2014. godine od strane Weissa i suradnika posebna procjena – jSpADA (indeks aktivnosti juvenilnog spondiloartritisa, engl. *Juvenile Spondyloarthritis Disease Activity Index*). jSpADA uključuje sljedećih osam parametara: artritis, entezitis, ocjenu bolnosti prema bolesniku, koncentraciju reaktanta akutne faze, jutarnju ukočenost, kliničke znakove sakroileitisa, prisutnost uveitisa i pokretljivost leđa. Svaki se parametar vrednuje jednim bodom, a veća vrijednost indeksa korelira s većom aktivnošću bolesti. Navedeni indeks pokazao se učinkovitim u razlikovanju pacijenata s aktivnom i neaktivnom bolesti te u ocjeni promjene aktivnosti bolesti (79).

Korisnost primjene ovakvih zbirnih bodovnih sustava poboljšana je točnim definiranjem graničnih vrijednosti kako bi se pravilno utvrdila visoka, odnosno niska razina aktivnosti bolesti (80).

Uključivanje roditelja/staratelja i bolesnika u procjenu aktivnosti bolesti putem upitnika za procjenu ishoda prema roditelju/djetetu (PCRO, engl. *Parent/Child Reported Outcomes*) smatra se iznimno važnim jer odražava njihovu percepciju o tijeku bolesti i liječenju i može pridonijeti donošenju medicinskih odluka te povećati vjerojatnost uspjeha u brizi o bolesniku (81). Danas je dostupan širok spektar mjera za ovakvu procjenu u djece s JIA. Za izdvojiti je klinički alat JAMAR (engl. *Juvenile Arthritis Multidimensional Assessment Report*) koji predstavlja multidimenzijski upitnik u kojem se procjena aktivnosti bolesti temelji na subjektivnoj ocjeni od strane bolesnika i njegova roditelja/staratelja, a obuhvaća i ranije razvijene PCRO (82). JAMAR pruža liječniku uvid u stanje pacijenta, ali usprkos multidimenzijском obliku, obično ukazuje i na jasne razlike između procjena pojedinih parametara od strane liječnika odnosno roditelja/staratelja i bolesnika.

Na temelju različitih pristupa u definiranju aktivnosti bolesti, od strane Wallace i suradnika 2004. godine razvijeni su preliminarni kriteriji za remisiju u JIA. Prema ovim kriterijima i njihovoj kasnijoj reviziji iz 2011. godine, bolesnik je u

remisiji kada nema zglobova s aktivnom bolešću, nema sistemskih manifestacija koje se mogu pripisati JIA (povišena tjelesna temperatura, osip, serozitis, splenomegalija ili limfadenopatija), nema aktivni uveitis, ima uredne vrijednosti SE ili CRP, odnosno ukoliko su povišene onda razlog nije JIA, trajanje jutarnje ukočenosti nije više od 15 minuta i prema procjeni liječnika nema znakova aktivnosti bolesti. Ukoliko su zadovoljeni kriteriji za klinički neaktivnu bolest najmanje 6 mjeseci uzastopno uz terapiju antireumaticima, tada je bolesnik u periodu kliničke remisije uz lijekove. Ukoliko je bolesnik po prekidu terapije bez znakova klinički aktivne bolesti 12 mjeseci uzastopno, tada ulazi u period remisije bez lijekova (slika 2) (7, 8).



Slika 2. Remisija u JIA (preuzeto i prilagođeno iz referencije 7)

Aktualna definicija neaktivne bolesti je stroga i zahtijeva odsutnost bilo kakvog simptoma bolesti, što je u kliničkoj praksi teško ostvarivo, posebno kod poliartikularnog ili sistemskog tipa bolesti. Stoga je u kliničkoj praksi lakše ostvariv cilj stanje tzv. minimalne aktivnosti bolesti, što je stanje između visoke aktivnosti bolesti i remisije, bliže remisiji bolesti (83). Studije na odraslim pacijentima s RA ukazuju na poboljšanje ishoda bolesti ako se u liječenju implementira tzv.

strategija „*treat-to-target*“, odnosno česta prilagodba terapije prema kliničkim pokazateljima, koja za cilj ima održavanje niske aktivnosti bolesti (84, 85). Ova strategija u pacijenata s JIA sažeta je u šest načela (uz osam preporuka) objavljenih od strane internacionalne skupine pedijatrijskih reumatologa: ciljevi i strategija liječenja temelje se na zajedničkim odlukama roditelja/pacijenta i liječničkog tima, JIA zbog svoje heterogenosti zahtijeva različite terapijske pristupe, cilj liječenja je kontrola simptoma bolesti i zaustavljanje upalnog procesa pri čemu treba izbjegavati dugotrajnu sistemsku upotrebu GK uz prilagodbu terapije ovisno o aktivnosti bolesti (85).

1.1.7. Liječenje

Optimalni pristup liječenju bolesnika s JIA temelji se na multidisciplinarnosti i uključivanju u liječenje različitih struka, od reumatologa, oftalmologa, fizioterapeuta i ortopeda do psihologa (3). S boljim poznavanjem patogeneze JIA došlo je i do napretka u farmakoterapiji bolesti. Današnji pristup nalaže što raniji početak terapije kako bi se spriječio razvoj nepopravljivih posljedica i poboljšao ishod bolesti. Farmakološki preparati koji se rabe za liječenje JIA su NSAID, GK za lokalnu i sistemsku primjenu te csDMARD, bDMARD i ciljani sintetski antireumatski lijekovi koji modificiraju tijek bolesti (tsDMARD, engl. *targeted synthetic disease-modifying antirheumatic drugs*) (86, 87).

NSAID su tradicionalno glavni oslonac u liječenju svih oblika JIA i predstavljaju terapiju prvog reda kojom se započinje liječenje. Kod djece u uporabi je nekoliko ovih lijekova: ibuprofen, naproksen, diklofenak i indometacin. Oni pripadaju inhibitorima enzima ciklooksigenaze-1 (COX-1, engl. *cyclooxygenase-1*) i stoga uz povoljan protuupalni učinak imaju i nuspojave, kao što su iritacija želučane sluznice, kožne reakcije, porast aminotransferaza s mogućim razvojem hepatitisa, akutni intersticijski nefritis te moguće akutno reverzibilno zatajenje bubrega, što zahtijeva oprez pri praćenju bolesnika. Nova generacija nesteroidnih antireumatika tzv. selektivnih COX-2-inhibitora nema ove nuspojave, ali su iskustva vezana za primjenu ovih lijekova kod djece oskudna (5, 68).

GK su vrlo djelotvorni protuupalni lijekovi, ali s brojnim nuspojavama, posebno ukoliko se primjenjuju sistemski i dugotrajno. Stoga se danas sistemski

koriste najviše u akutnoj fazi bolesti, najčešće pri liječenju sJIA. Lokalna, intraartikularna primjena GK je učinkovita u liječenju upalom zahvaćenih zglobova u djece i ima prednost pred sistemskom GK terapijom. Moguće nuspojave lokalne terapije su rijetke, primjerice infekcija zgloba, mehanička indukcija ponovne upale zgloba te atrofija kože i potkožja ili kalcifikati na mjestu punkcije (88, 89).

csDMARD predstavljaju drugi red izbora u liječenju JIA i uključuju se u terapiju kada izostane učinak liječenja s NSAID. Djelotvornost terapije csDMARD vidljiva je tek nakon više tjedana liječenja. Najčešće primjenjivani lijek iz ove skupine je MTX, a ostali lijekovi su sulfasalazin i leflunomid (5, 11).

S bDMARD je započeto novo razdoblje u liječenju JIA. Ovi se lijekovi primjenjuju kod bolesnika koji ne reagiraju na druge oblike liječenja, osim u sJIA s visokom inicijalnom aktivnošću bolesti, gdje se mogu upotrijebiti na početku liječenja. Anticitokinska terapija primjenjuje se od kraja 20. stoljeća, a anti-TNF pripravci su najčešće primjenjivani tip biološke terapije. Prvi registrirani biološki lijek bio je etanercept (ETN), potpuno ljudski TNF inhibitor čija je efikasnost potvrđena brojnim studijama, a potpuna remisija bolesti postiže se u oko pola pacijenata. Od ostalih bioloških lijekova koji blokiraju djelovanje TNF- α kao ključnog proupalnog citokina, koriste se adalimumab (ADA) i infliksimab (IFX). TNF inhibitori pokazuju veću efikasnost ukoliko se započne rano s njihovom primjenom, u kombinaciji s MTX i/ili GK. Ako nema povoljnog odgovora na ovu skupinu biološke terapije, u liječenje se uvodi blokator kostimulacijskog puta potrebnog za aktivaciju limfocita – abatacept (ABA) ili blokator receptora IL-6 – TCZ. TCZ je lijek koji se osim u liječenju poliartikularnog tipa bolesti primjenjuje i u sJIA, s obzirom na također znatno povišene razine IL-6. Blokatori IL-1 koji se koriste u liječenju sJIA su anakinra (ANK) i canakinumab (CAN). Biološki pripravci se generalno dobro podnose, najteže nuspojave su moguća pojava oportunističkih infekcija, pojava drugih autoimunih bolesti, zloćudnih bolesti te zatajenje srca (3, 6). Učinkovitost i nuspojave bDMARD u velikoj su mjeri još uvijek nepoznate zbog: nepotpuno razjašnjenih mehanizama njihova metaboliziranja (koje se uglavnom, ali ne isključivo, odvija djelovanjem različitih proteaza, nukleaza i peptidaza u različitim organima i tkivima), reakcija oksidacije, deaminacije i izomerizacije čime se mijenja njihova aktivnost (90), deponiranja vezanog uz mjesta ciljanog djelovanja, vezivanja na glikoreceptore, lizosomskog recikliranja, elektrostatskih

naboja i velikog hidrodinamičkog volumena bDMARD molekula, ali i interakcija s drugim endogenim i egzogenim molekulama, posebno manjih molekularnih masa te drugim enzimskim sustavima (npr. moguća inhibicija aktivnosti sustava citokroma P450) (91).

Kronološki posljednji među lijekovima razvijenim za liječenje RA i JIA su JAK inhibitori koji pripadaju skupini tsDMARD. Navedena skupina lijekova je u sve široj upotrebi u liječenju bolesnika s RA, u kojih se obično primjenjuju u slučaju prethodne neuspješne primjene bDMARD (92). Iskustva s primjenom tsDMARD u djece s JIA još uvijek su relativno ograničena (87, 93).

1.1.8. Tijek i prognoza bolesti

Napredak u liječenju JIA postignut zadnjih godina zasigurno pridonosi boljoj prognozi, ali tijek bolesti je još uvijek nepredvidiv, posebice po pitanju mogućeg oštećenja zglobova. Oko 60 % bolesnika koji boluju od JIA prelazi u odraslu dob bez aktivne bolesti ili funkcionalnog ograničenja. Međutim, studije dugoročnih ishoda JIA pokazuju da između 30 i 56 % bolesnika ima ozbiljna funkcionalna ograničenja koja uključuju deformitet i oštećenje zglobova. U nepovoljne učinke bolesti ubrajaju se i odstupanje u rastu, prisutnost osteoporoze, problemi s vidom zbog uveitisa te narušeno psihičko zdravlje (94). U skladu s definicijom remisije bolesti (8), provedena je studija prema kojoj $47,5 \pm 22,6$ % djece postiže klinički neaktivnu bolest nakon medijana vremena od $6,5 \pm 1,5$ godine. Neaktivna bolest i remisija postignuti su najčešće u perzistentnom oligoartikularnom obliku, za razliku od proširenog oligoartikularnog i poliartrikularnog RF pozitivnog tipa bolesti gdje je prognoza u smislu postizanja remisije najmanje povoljna (95). U nedavno objavljenoj studiji ishoda, 45,6 % djece imalo je aktivnu bolest nakon 18 godina praćenja (96).

Predskazatelji lošeg dugoročnog ishoda bolesti su: rano zahvaćanje zgloba kuka ili ručnog zgloba, simetrična bolest, pozitivan RF i dugotrajna aktivna sistemska bolest. Uz to, prognoza je različita i za pojedini tip JIA. Tako djeca sa sJIA imaju tendenciju ili reagirati u potpunosti na medicinsku terapiju ili razviti teški, poliartrikularni tijek bolesti koji je uglavnom otporan na medikamentozno liječenje. Čimbenici rizika koji upućuju na loš ishod sJIA su prisutnost sistemnih

simptoma šest mjeseci nakon početka bolesti, trombocitoza i poliartritis sa zahvaćenošću kuka. Smrtnost je manja od 1 %, a smrtni ishod nastupa zbog infekcije, MAS ili amiloidoze (3).

Poliartikularni tip s pozitivnim nalazom RF ekvivalent je RA odraslih s ranim početkom i ima najlošiju prognozu. Navedeni tip bolesti ima najniži postotak remisije, a bolesnici koji ne odgovore adekvatno na terapiju razvit će znatne deformitete i disfunkciju zglobova.

U poliartikularnom tipu s negativnim RF manje od 50 % djece će ući u remisiju, često nakon dugotrajnog liječenja.

Kod ERA je dugoročni tijek nepoznat, u dječaka s pozitivnim nalazom HLA-B27 i artritism kuka postoji visok rizik za razvoj ankilozantnog spondilitisa (AS) (3, 96).

1.2. Metotreksat

MTX je analog i antagonist folne kiseline koji se kao lijek u reumatologiji koristi više od 30 godina (slika 3) (97). Originalno je razvijen kao protutumorski lijek, a danas se najviše koristi kao prva terapijska linija u skupini csDMARD za liječenje JIA, RA i psorijaze. Zbog svojih protuupalnih i imunomodulatornih aktivnosti ima primjenu i u drugim područjima, od transplantacijske medicine do liječenja kroničnog artritisa uzrokovanog virusima (98, 99).

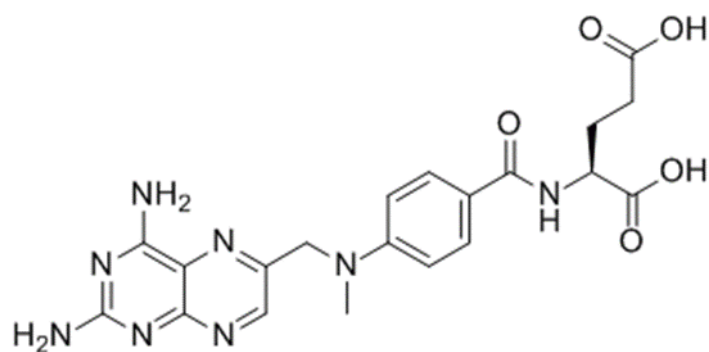
Terapijski učinak i mehanizmi djelovanja MTX u visokim dozama kod malignih bolesti dobro su poznati. MTX kao antagonist folne kiseline kompetitivno inhibira aktivnost enzima ovisnih o folatima i sintezu purina i pirimidina potrebnih za proizvodnju DNA i RNA u malignim stanicama koje se brzo dijele. Međutim, mehanizam s pomoću kojeg MTX u malim dozama ima terapijski učinak kod upalnih poremećaja nije još uvijek u potpunosti razjašnjen (97, 100).

MTX, ranije poznat kao ametopterin, jedan je od nekoliko antagonista folne kiseline koji su izvorno sintetizirani 1940-ih za liječenje zloćudnih bolesti. Faber i suradnici su 1947. godine dokazali da antifolat aminopterin, sintetski derivat pterina, može dovesti do remisije u akutnoj limfoblastičnoj leukemiji kod djece (101). Zbog manje toksičnosti aminopterin je zamijenjen MTX, a Grubner i suradnici su 1951. godine objavili prvu dokumentiranu kliničku primjenu MTX kod

pacijenata s reumatoidnim artritismom (102). Njegova učinkovitost u odnosu prema placebo dokazana je tek kasnijim studijama tijekom 1980-tih, zahvaljujući kojima MTX postaje temelj liječenja reumatskih bolesnika (97). Ovu poziciju zadržava i danas, unatoč napretku u razumijevanju etiopatogeneze i uvođenju u terapiju bDMARD i tsDMARD (87, 93, 97, 103, 104).

MTX se može primjenjivati oralno, intravenski, intramuskularno, supkutano i intratekalno. U reumatologiji se pretežno primjenjuje oralno ili supkutano, rjeđe intramuskularno. U JIA MTX pokazuje učinkovitost u dozi od 10 do 20 mg/m²/tjedno (104, 105). Bioraspoloživost oralno primijenjene terapije pada s porastom doze zbog zasićenja crijevnih transportnih mehanizama. Supkutano primijenjen MTX ne pokazuje efekt zasićenja, već linearni porast razine u krvi proporcionalan primijenjenoj dozi (106, 107). Supkutana primjena ima veću kliničku učinkovitost i poboljšanu podnošljivost u usporedbi s oralnom primjenom (107, 108, 109), iako rezultati nekih studija ne ukazuju na navedene razlike (110). Oko 50 % cirkulirajućeg MTX vezano je za proteine plazme. Razina MTX u sinovijalnoj tekućini usporediva je s razinom u plazmi. MTX se metabolizira u jetri gdje se pretvara u 7-hidroksimetotreksat (7-OH-MTX). Prvenstveno se izlučuje putem bubrega, tako da je njegova eliminacija smanjena kod bolesnika s oštećenjem bubrežne funkcije te kod bolesnika s ascitesom ili pleuralnim izljevom i u tim situacijama je potrebno pažljivo titrirati dozu lijeka (104). Kod primjene niskih doza MTX vrijeme poluživota u plazmi varira od 4,5 do 10 sati (111).

Kao lijek je dostupan, siguran i učinkovit, ali osim njegove učinkovitosti, treba uzeti u obzir i nuspojave. S obzirom na niže doze lijeka koje se koriste u reumatologiji, rjeđe su teške i za život opasne nuspojave, kao što su hepatotoksičnost i citopenija, koje zahtijevaju redovite kontrole koncentracije aminotransferaza i kompletne krvne slike. Među nuspojavama su puno češće i u kliničkoj praksi značajnije gastrointestinalne tegobe, glavobolja i drugi oblici netolerancije MTX, jer navedene utječu na kvalitetu života i mogu uzrokovati izostanak suradnje od strane bolesnika u smislu prestanka uzimanja lijeka (104, 105, 112).



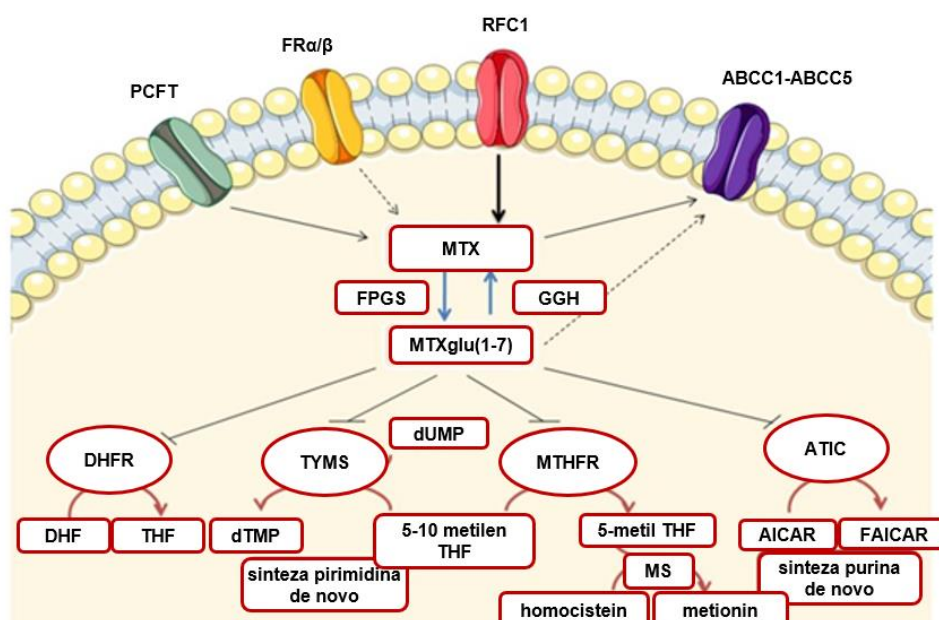
Slika 3. Molekula MTX (preuzeto s https://www.chemsrc.com/en/cas/59-05-2_390975.html)

1.2.1. Metabolički putovi metotreksata i protuupalno djelovanje

Ulazak MTX u stanicu posredovan je uglavnom proteinom za transport reduciranih folata, SLC19A1/RFC1 (engl. *solute carrier family 19, folate transporter member 1/reduced folate carrier protein 1*). Izlazak iz stanice reguliran je ABCC proteinima (engl. *ATP-binding cassette proteins*) koji vežu adenozin trifosfat (ATP) i imaju ulogu prijenosnika velikog broja lijekova i kemoterapijskih sredstava (113). Po ulasku u stanicu MTX podliježe procesu poliglutamacije zahvaljujući folilpoliglutamat sintetazi (FPGS) što povećava unutarstanični poluživot MTX jer poliglutamati ne mogu biti supstrat za ABCC proteine. Ovo nakupljanje MTX-poliglutamata (MTXPG) u stanici omogućuje primjenu MTX jednom tjedno, usprkos relativno kratkom poluživotu u plazmi. Poliglutamacija je reverzibilan proces kataliziran γ -glutamil hidrolazom (GGH) čime se održava ravnoteža razine MTX unutar stanice. MTXPG predstavljaju aktivnu formu lijeka, a detektirani su u eritrocitima, neutrofilima, mononuklearima, hepatocitima i sinoviocitima (97, 100, 114, 115). Koncentracija MTXPG u eritrocitima prema nekim ispitivanjima korelira s terapijskim učinkom lijeka (115, 116).

Djelovanje MTX unutar stanice vezano je za inhibiciju dihidrofolat reduktaze (DHFR) i ostalih enzima koji ovise o folatima, poput timidilat sintaze (TYMS, engl. *thymidylate synthase*), 5-aminoimidazol-4-karboksiribonukleotid (AICAR, engl. *5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside*) transformilaze (ATIC, engl. *5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase*) i metilen tetrahidrofolat reduktaze (MTHFR) (104).

Kao snažni inhibitor DHFR, MTX dovodi do smanjenja razine tetrahidrofolata (THF). THF je bitan za *de novo* sintezu purina i prekursor je kofaktora 5-metil-tetrahidrofolata (5-metil-THF). Smanjena dostupnost 5-metil-THF dovodi i do smanjenja remetilacije homocisteina u metionin i akumulacije homocisteina, te smanjenja unutarstaničnog kapaciteta za transmetilaciju. Direktna, ali i indirektna inhibicija TYMS putem manjka THF vodi inhibiciji biosinteze pirimidina. Inhibicija AICAR transformilaze utječe na *de novo* sintezu purina i do unutarstaničnog nakupljanja adenin nukleotida i adenzina te njihova otpuštanja u izvanstanični prostor (slika 4) (100, 104).



Slika 4. Metabolički putovi metotreksata, transportni mehanizmi i unutarstanično djelovanje (preuzeto i prilagođeno iz referencije 104)

MTX – metotreksat, PCFT – transporter folata vezan uz proton (engl. *proton-coupled folate transporter*), FR α / β – folatni receptori, RFC1 – protein za transport reduciranih folata 1 (engl. *reduced folate carrier protein 1*), ABCC1-ABCC5 – ABCC proteini (engl. *ATP-binding cassette proteins*), FPGS – folilpoliglutamat sintetaza, MTXglu(1-7) – MTX poliglutamati, GGH – γ -glutamil hidrolaza, DHFR – dihidrofolat reduktaza, DHF – dihidrofolat, THF – tetrahidrofolat, dTMP – deoksitimidin monofosfat, TYMS – timidilat sintetaza, MTHFR – metilen tetrahidrofolat reduktaza, ATIC – 5-amino-imidazol-4-karboksiribonukleotid transformilaza, AICAR – 5-amino-imidazol-4-karboksiribonukleotid, FAICAR – formil AICAR, MS – metionin sintetaza

Učinkovitost visokih doza MTX u liječenju zloćudnih bolesti pripisuje se upravo sposobnosti inhibiranja ključnih enzima koji sudjeluju u biosintezi purina i pirimidina čime se ograničava dioba malignih stanica. Smatra se da je isti mehanizam odgovoran i za nuspojave lijeka. Uzimanje folne kiseline s MTX nema

utjecaja na terapijski učinak MTX, ali može imati utjecaj na smanjenje nuspojava (104, 117).

Više je pretpostavljenih farmakoloških mehanizama djelovanja MTX kao protuupalnog lijeka.

S obzirom na brzu proliferaciju stanica upalnog odgovora, inhibicija biosinteze purina i pirimidina može biti jedan od mehanizama učinkovitosti. Niske doze MTX imaju citostatični, a ne citotoksični učinak i zaustavljaju proliferaciju limfocita T stimuliranih mitogenom (118).

Inhibicija DHFR dovodi do smanjenja razine THF i 5-metil-THF koji su donatori metilne skupine u kemijskim reakcijama i važni su u proizvodnji metionina i S-adenozilmetionina (SAM) te poliamina. Poliamini djeluju kao limfotoksini, stoga bi inhibicija produkcije poliamina mogla pridonijeti djelotvornosti MTX (98). Ipak, opažanje da dodatak folata nije povezan sa smanjenjem protuupalne učinkovitosti MTX u bolesnika s RA važan je dokaz o tome da se i drugi mehanizmi djelovanja moraju uzeti u obzir (117).

Mehanizam djelovanja MTX kao protuupalnog lijeka s najviše dokaza jest učinak MTX na nakupljanje adenzina unutar stanice i njegovo ispuštanje u međustanični prostor stanica koje su u stanju upale (97, 98). Adenzin je snažan protuupalni posrednik koji djeluje u interakcijama s različitim stanicama imunskog odgovora, uključujući neutrofile, makrofage i limfocite T. Inhibicija AICAR transformilaze (ATIC) djelovanjem MTX rezultira unutarstaničnom akumulacijom AICAR-a i njegovih metabolita, koji su inhibitori enzima važnih za katabolizam adenzina i adenzin monofosfata (AMP, engl. *adenosine monophosphate*): adenzin deaminaze (ADA) i AMP deaminaze (AMPD, engl. *adenosine monophosphate deaminase*) što dovodi do porasta izvanstanične razine adenzina. Adenzin djeluje preko transmembranskih adenzin A receptora (ADORA, engl. *adenosine A receptor*), aktivacija ADORA2A i ADORA3 receptora rezultira smanjenjem produkcije i otpuštanja proupalnih citokina IL-1 β , TNF- α i IL-6 te smanjenjem produkcije matriksnih metaloproteinaza (MMPs, engl. *matrix metalloproteinases*) (100, 119, 120). Adenzin je zbog ekstremno kratkog poluživota od 2 do 8 sekundi, teško mjerljiv u plazmi i tjelesnim tekućinama. Riksen i suradnici dokazali su da MTX inhibira ADA u limfocitima i pojačava adenzinom induciranu vazodilataciju što ukazuje na utjecaj MTX na razinu izvanstaničnog adenzina

(121). Učinak kofeina, kao neselektivnog antagonista adenozijskih receptora i učinkovitost MTX ispitivani su u više studija, ali rezultati istih nisu jednoznačni (122, 123).

Nedavno je MTX klasificiran kao inhibitor JAK/STAT signalnog puta (engl. *Janus kinase-signal transducer and activator of transcription*) što može predstavljati važan protuupalni i imunosupresivni mehanizam djelovanja niskih doza MTX neovisan o metabolizmu folata (124). Ovaj signalni put ima važnu ulogu u prijenosu signala od receptora na staničnoj membrani do jezgre, aktiviran je širokim spektrom citokina i faktora rasta bitnim u hematopoezi i imunskim procesima. Postoje četiri Janus kinaze, JAK 1-3 i tirozin kinaza 2 (TYK2), te sedam aktivatora transkripcije, STAT 1-4, 5a, 5b, 6 (124, 125). Unutar signalnog puta, JAK fosforiliraju i aktiviraju čimbenike transkripcije (STAT) koji moduliraju unutarstaničnu aktivnost uključujući ekspresiju gena. JAK inhibitori danas predstavljaju zasebnu terapijsku skupinu (tsDMARD) koja se u liječenju RA i JIA primjenjuje kao monoterapija ili u kombinaciji s MTX. Iako prema rezultatima dosadašnjih studija JAK inhibitori primijenjeni u monoterapiji nisu inferiorni u odnosu na kombinaciju JAK inhibitora i MTX, ipak se navedena kombinacija češće primjenjuje u kliničkoj praksi zbog sinergijskog učinka (126, 127).

Utvrđeno je da MTX smanjuje ekspresiju HMGB1 u sinovijalnim tkivima kod RA i inhibira progresiju bolesti (128). Uz navedene mehanizme, učinak može imati i posredno djelovanje na produkciju kisikovih reaktivnih vrsta (ROS, engl. *oxygen reactive species*) ili na produkciju prostaglandina E2.

Na temelju navedenog, najvjerojatnije kombinacija više navedenih mehanizama dovodi do sveukupnog prigušivanja upalnog odgovora i djelovanja MTX na modifikaciju bolesti (97, 100, 104).

1.2.2. Metotreksat u JIA

Današnji pristup liječenju JIA zahtijeva ranu, uspješnu kontrolu upalnog procesa s ciljem što povoljnijeg ishoda liječenja (12). Prvi lijek druge linije liječenja u djece s JIA je MTX (3, 10) s heterogenim odgovorom na terapiju i udjelom većim od 30 % djece u koje navedeni lijek nema učinka u smislu postizanja remisije (10, 11, 13, 14). Kako je za procjenu učinka MTX nužan period od 3 do 6 mjeseci

kontinuirane primjene, u djece u koje navedeni lijek neće djelovati gubi se mogućnost ranog postizanja remisije, odnosno smanjuje se vjerojatnost povoljnog ishoda liječenja. Do danas je objavljen niz istraživanja iz područja epidemiologije, farmakokinetike i genomike s ciljem pronalaska jednog ili više pouzdanih „biomarkera“ za ranu identifikaciju djece oboljele od JIA u kojih terapija MTX neće imati učinka, odnosno djece oboljele od JIA u kojih je indiciran rani početak liječenja bDMARD (15, 129 – 134). U do sada provedenim istraživanjima demografski pokazatelji uključujući spol, dob kod početka bolesti i površinu tijela, nisu pokazali vrijednost u predskazivanju učinkovitosti MTX (12, 13). U tom smislu bezvrijednima su se pokazali i duljina trajanja bolesti prije početka terapije MTX te tip JIA. Upitnik za ocjenu funkcijske sposobnosti i kakvoće života (CHAQ, engl. *Childhood Health Assessment Questionnaire*), procjena aktivnosti bolesti prema liječniku te zahvaćenost oba ručna zgloba, prema navedenim radovima imaju djelomičnu vrijednost u predskazivanju učinkovitosti terapije MTX (13). Od laboratorijskih parametara pozitivnu predskazujuću vrijednost ima pozitivan nalaz ANA te povišene koncentracije osteopontina, dugolančanih MTX poliglutamata (MTX-PG) te proteina vezanog za mijeloid (MRP, engl. *myeloid-related protein*). Na primjer, koncentracija MTX-PG u eritrocitima je viša u oboljelih od JIA koji dobro reagiraju u odnosu na one koji ne reagiraju na terapiju MTX (15, 129).

Provedeno je i nekoliko studija koje su pokušale odrediti genetsku determinantu odgovora na MTX u JIA (97). Genetska ispitivanja primarno su temeljena na identifikaciji SNP u genima uključenim u signalni put MTX ili GWAS na velikom broju ispitanika u svrhu pronalaska povezanosti određenih genomskih varijanti s odgovorom na MTX. U radu Pastore i sur. ispitivane su najčešće varijante gena za ATIC, ITPA (engl. *inosine triphosphatase*) i SLC19A1 koje su povezane s dobrim kliničkim odgovorom na MTX. Tako je npr. ATIC rs2372536 GG genotip povezan s dobrim kliničkim odgovorom na primjenu MTX što je evaluirano stabilnom kliničkom remisijom u periodu od 6 mjeseci u 69 bolesnika s JIA (14). U studiji de Rotte i sur. analizom kandidatnih gena odgovornih za transport MTX, u skupini od 287 djece i mladih s različitim tipovima JIA, identificirani su SNP u genima za ABCC proteine, rs1045642 u genu ABCB1 i rs4793665 varijanta u genu ABCC3, vezani uz povoljan odgovor na terapiju MTX. Prema istom istraživanju varijanta rs1051266 u genu za SLC19A1 umanjuje

vjerojatnost povoljnog odgovora za dva do tri puta (134). Ipak, s obzirom na mali broj bolesnika u ovakvim ispitivanjima, složenost signalnog puta i manjak studija koje uzimaju u obzir sve relevantne varijante, do sada nije pronađen definitivni genetski marker odgovora na MTX koji bi bio značajan za individualno kreiranje terapije. Na genomskoj razini ispitivanje terapijskog odgovora na MTX u JIA putem GWAS, kojim je pokušana identifikacija do sada nepoznatih relevantnih gena, također nije dalo jednoznačne odgovore na ovo pitanje (135). Navedeno može upućivati da multipli geni, ne samo oni uključeni u farmakokinetiku i farmakodinamiku MTX, određuju efikasnost navedenog lijeka u JIA. Otkrivanje novih putova metaboliziranja i mehanizama djelovanja pridonijet će razjašnjavanju učinkovitosti MTX u liječenju JIA (130 – 133).

U dijela JIA bolesnika MTX neće dovesti do adekvatne kontrole bolesti te će biti potrebno započeti liječenje bDMARD. Međutim, kod primjene anti-TNF pripravaka (posebno adalimumaba ili etanercepta), najčešće upotrebljavane skupine bDMARD u terapiji JIA, postoji mogućnost razvoja neutralizirajućih protutijela usmjerenih na anti-TNF molekule čijim se djelovanjem povećava klirens anti-TNF odnosno umanjuje / dokida njihova učinkovitost, što u konačnici dovodi do prekida navedene terapije i potrebe za promjenom bDMARD (97, 136). U do sada provedenim studijama dokazano je da istodobna primjena MTX s anti-TNF pripravcima učinkovito smanjuje produkciju neutralizirajućih protutijela usmjerenih na anti-TNF, čime se održava njihova terapijska učinkovitost. Smatra se da MTX navedeni efekt primarno postiže imunskim mehanizmima, pojačanim generiranjem adenozina (137) i ranom supresijom ekspanzije limfocita T i B (97). Dodatno, s obzirom na to da se uz istodobnu primjenu anti-TNF i MTX uz veću učinkovitost bilježe i više koncentracije anti-TNF nego kod njihove samostalne primjene, smatra se da MTX utječe i na farmakodinamiku anti-TNF, primarno smanjujući antigensko opterećenje terapeutika (djelovanjem MTX smanjuje se razina TNF, a samim time i usporava potrošnja anti-TNF) (138). Uz to, MTX indukcijom neonatalnih Fc receptora (FcRn, engl. *neonatal Fc receptor*) koji na sebe uz endogene IgG vežu i biološke pripravke na bazi IgG te na taj način blokiraju njihovu pinocitozu i brzo kataboliziranje, smanjuje klirens odnosno povećava poluživot i osigurava bolju učinkovitost anti-TNF (139). U konačnici,

moguće je da MTX mehanizmima neovisnim o anti-TNF terapiji suprimira upalno zbivanje u JIA te time povećava učinkovitost bDMARD (97).

S druge strane, interakcija bDMARD i MTX nije jednosmjerna, budući da ADA, ETN, IFX i TCZ dokazano ubrzavaju metabolizam MTX (140), a smatra se i smanjuju njegovu toksičnost imunosno posredovanim mehanizmima (141).

Dosadašna istraživanja mogućnosti predskazivanja učinkovitosti ostalih lijekova koji se koriste u liječenju JIA su manje opsežna. Tako su za NSAID dominantno provedene studije utvrđivanja kliničkih, a za bDMARD studije utvrđivanja kliničkih i biokemijskih (npr. S100A8/A9 ili serumski amiloid A (SAA)) predskazatelja njihove učinkovitosti u oboljelih od RA i JIA (39, 142). Među genetskim markerima dominantno su istraživani i detektirani polimorfizmi gena koji utječu na učinkovitost anti-TNF pripravaka: gen PTPRC (engl. *protein tyrosine phosphatase receptor type C*), CHUK (engl. *component of inhibitor of nuclear factor kappa B kinase complex*), LRPAP1 (engl. *LDL receptor related protein associated protein 1*) te PDE3A-SLCO1C1 (engl. *phosphodiesterase 3A-solute carrier organic anion transporter family member 1C1*) (143).

U slučaju JAK inhibitora, u literaturi se uglavnom navode studije utvrđivanja kliničkih, rijetko biokemijskih predskazatelja njihove učinkovitosti u oboljelih od RA. (144).

Većina autora naglašava nužnost daljnjih istraživanja s ciljem otkrivanja jedinstvenih predskazatelja učinkovitosti pojedinih protokola liječenja u djece oboljele od JIA (142).

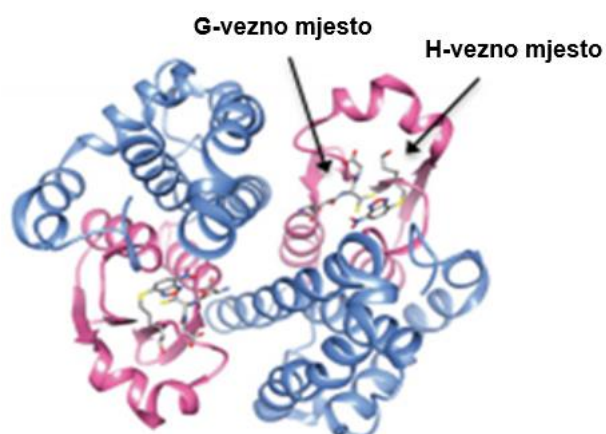
1.3. Glutation S-transferaze (GSTs)

Glutation S-transferaze (GSTs) predstavljaju skupinu u prirodi široko rasprostranjenih multifunkcionalnih proteina, koji u stanicama prokariota i eukariota kataliziraju konjugaciju toksičnih reaktivnih komponenti s glutationom (GSH). Na taj način omogućavaju detoksikaciju niza egzogenih i endogenih metabolita uz njihovu inaktivaciju i eliminaciju iz stanica (145, 146).

U eukariota se GSTs prema staničnoj lokalizaciji dijele na citosolne, mitohondrijske i mikrosomalne. Citosolne se, s obzirom na kemijska, strukturna i fizikalna svojstva, u sisavaca dijele u sedam klasa. Mitohondrijske, klase kappa,

imaju veliku strukturnu sličnost s citosolnim GSTs. Nasuprot prethodne dvije, mikrosomalne GSTs (MAPEG, engl. *membrane-associated proteins involved in eicosanoid and glutathione metabolism*) su membranski proteini evolucijski drugačiji od prethodno navedenih glavnih klasa (147).

Klase citosolnih GSTs su alfa, zeta, theta, mi, pi, sigma i omega (147, 148). Obilježavaju se velikim latiničnim slovima neposredno iza skraćenice GST (npr. alfa klasa – GSTA, zeta klasa – GSTZ, theta klasa – GSTT itd.). Na kraju se arapskim brojevima odijeljenim spojnicom dodatno obilježavaju i podjedinice homo- ili heterodimera (npr. GSTP1-1). Citosolne GSTs u sisavaca su najčešće dimerne molekule građene od identičnih lanaca, rjeđe heterodimerne molekule građene od različitih lanaca iste klase (146, 147). U svakom monomeru u sastavu GST razlikuje se N-terminalni kraj, nalik tioredoksinu i C-terminalni, spiralni kraj. Vezno mjesto N-terminalnog kraja evolucijski je starije mjesto oznake G, budući da na sebe veže glutation (GSH). Evolucijski mlađe vezno mjesto C terminalnog kraja ima oznaku H, s obzirom na to da se na njega veže širok spektar hidrofobnih kospstrata (slika 5) (147, 149).



Slika 5. Struktura monomera GST (preuzeto i prilagođeno iz referencije br.147)
G-vezno mjesto za vezanje glutationa (GSH) na N-terminalnom kraju, H-vezno mjesto na C-terminalnom kraju na koje se vežu hidrofobni kospstrati

Enzimski posredovana detoksikacija ksenobiotika (tvari unesenih u organizam izvana) i endobiotika (tjelesnih tvari u povišenim koncentracijama) odvija se u tri faze. Prva, oksidacijska faza, najvećim je dijelom katalizirana

sustavom citokroma P450. Enzimi druge faze sudjeluju u biotransformaciji ksenobiotika i endobiotika u oblike koji se lakše eliminiraju iz stanica i organizma te u metaboličkoj inaktivaciji farmakološki aktivnih tvari. Konjugacija, kao dominantna reakcija druge faze koja za cilj ima stvaranje hidrofilnih spojeva, obuhvaća glukuronidaciju, sulfatizaciju, metilaciju, acetilaciju te konjugaciju s glicinom i glutationom. Prva i druga faza detoksikacije rezultiraju konverzijom lipofilnih, nepolarnih ksenobiotika i endobiotika u vodotopive, manje toksične metabolite. U trećoj fazi detoksikacije, djelovanjem transmembranskih proteina, odvija se aktivna, transmembranska eliminacija nastalih konjugata u međustanični prostor (145 – 147).

Citosolne GSTs su glavni enzimi druge faze detoksikacije. Njihova najvažnija funkcija je kataliziranje konjugacije reduciranih formi GSH s različitim hidrofobnim i elektrofilnim ksenobioticima i endobioticima, a u svrhu povećanja njihove topljivosti i olakšanog transmembranskog transporta u međustanični prostor. Na taj način citosolne GSTs štite stanične proteine, lipide i nukleinske kiseline od djelovanja toksičnih supstrata, ali i osiguravaju transport istih iz organizma – izlučivanjem putem bubrega (150, 151). GSTs imaju i niz drugih enzimskih i neenzimskih funkcija: djeluju kao peroksidaze (redukcija masnih kiselina, hiperoksida, fosfolipida) i izomeraze, štite stanicu od djelovanja vodikova peroksida i protein kinazama inducirane smrti, nekatalitički vežu širok spektar ksenobiotika i endobiotika te i na taj način omogućavaju njihov transport izvan stanica. Uz to, GSTs imaju ulogu u razgradnji tirozina i sintezi leukotriena, prostaglandina, testosterona i progesterona (146, 147, 152, 153).

GSTs su prisutne u stanicama svih organa i tkiva sisavaca uz specifičnu distribuciju pojedinih izoformi, prema tipu stanica. Različite izoforme GSTs mogu biti različito aktivne u istom tkivu, ovisno o tkivnoj izloženosti endobioticima i ksenobioticima. Na taj način, visoke tkivne koncentracije enzima u kombinaciji s njihovom specifičnom distribucijom omogućuju korištenje GSTs kao biomarkera oštećenja određenog tipa stanica ili tkiva. Tako je npr. kombinacija GSTA i GSTP u serumu upotrebljiva kao biomarker oštećenja stanica proksimalnog i distalnog tubula bubrega različite etiologije, a tkivna GSTM2 kao biomarker razvoja protutijelima posredovanog glomerulonefritisa zbog djelovanja istih na glomerularnoj bazalnoj membrani (GBM). S druge strane, GSTA u serumu se

može koristiti kao biomarker oštećenja hepatocita kod toksične ili infektivne lezije jetre (154 – 158).

1.3.1. Polimorfizmi gena za GSTs i aktivnost enzima

Klase GST enzima kodirane su genima lociranim u klasterima na različitim kromosomskim lokusima (159, 160). Većina je gena za GSTs polimorfna, što rezultira različitim fenotipskim inačicama GSTs. Polimorfni lokus ili polimorfizam označava prisutnost najmanje dvaju alela na jednome genskom lokusu čija je učestalost u populaciji najmanje 1 % (161, 162). Enzimska aktivnost GSTs ovisi o delecijским polimorfizmima ili SNP GST gena (146, 163 –165), količini egzogenih ili endogenih supstrata koji moduliraju ekspresiju GST gena (146, 165, 166), stabilnoj opskrbi GSH pod djelovanjem sintetskih enzima gama-glutamilcistein sintetaze i glutation sintetaze te aktivnosti specifičnih transportnih molekula koje uklanjaju konjugate GSH iz stanice (146, 167, 168).

Polimorfizmi gena koji kodiraju citosolne GSTs opisani su u različitim klasama s najviše pozornosti na alele klase mi, theta i pi. Mi genska obitelj, odnosno pet gena mi klase smješteno je u klasteru veličine 20 kb na kromosomu 1. Gen GSTM1 ima tri alela od kojih GSTM1*0 ili null alel podrazumijeva homozigotnu deleciju koja dovodi do stvaranja nefunkcionalnog proteina i izostanka enzimske aktivnosti. Ovaj genotip prisutan je u oko 50 % bijelaca i azijata. Slično je s delecijским polimorfizmom za GSTT1 unutar GSTθ podgrupe. Gen koji kodira ovu GST lociran je na kromosomu 22. GSTT1*0 ili null polimorfizam prisutan je u 10 do 20 % bjelačke populacije, a u azijata se nalazi u 16 – 64 % i rezultira odsutnošću enzimske aktivnosti (159, 167, 169, 170).

Geni i proteini koji su vezani za metabolizam ksenobiotika često se koriste kao potencijalni markeri podložnosti razvoju bolesti čija se etiologija povezuje s čimbenicima okoliša (171). Više studija pokazalo je utjecaj polimorfizama gena za GSTs u regulaciji njihove citosolne aktivnosti (172, 173). Brojna su istraživanja u kojima se polimorfizmi u genima za GSTs, posebno delecijски polimorfizmi gena GSTM1 i GSTT1, povezuju s povećanom sklonosti prema različitim bolestima, uključujući i upalne reumatske bolesti te učinkovitošću i nuspojavama različitih terapijskih protokola (164, 166, 169, 171, 174 – 176). Polimorfizmi gena za GSTs

koji rezultiraju smanjenom aktivnošću enzima prema provedenim ispitivanjima mogu povećati rizik od upalne bolesti crijeva izazivanjem oksidativnog stresa, pa je tako delecijски polimorfizam GSTT1 doveden u vezu s povećanom osjetljivošću za razvoj ulceroznog kolitisa (167). Prema drugim ispitivanjima zajednička kombinacija više null genotipova GSTs značajno povećava rizik za razvoj SLE (174). AS je još jedna kronična upalna bolest u kojoj su ispitivani odnosi sklonosti i težine bolesti s polimorfizmima za GSTs. Rezultati ispitivanja pokazali su značajno veću učestalost null GSTT1 genotipa u oboljelih od AS (175). Isto tako, sukladno provedenim istraživanjima nositelji homozigotne delecije GSTT1 imaju visok rizik za razvoj RA u sinergiji s drugim genima ili čimbenicima okoliša kao što je pušenje (176, 177). U studiji koja je obuhvatila pacijente s JIA, nađena je značajna veza između null genotipa GSTT1 i rizika za nastanak JIA, s naglaskom na veću učestalost kod težih tipova bolesti (171).

Kako su polimorfizmi GSTs vezani za gubitak ekspresije odnosno promjenu katalitičke aktivnosti enzima, ispitivana je njihova povezanost s različitim terapijskim protokolima i ishodima liječenja (178). Zbog svoje važne detoksikacijske uloge, nedostatak aktivnosti GSTs u slučaju delecijских polimorfizama povezana je sa smanjenom sposobnosti eliminacije ciklofosfamida i njegovih toksičnih metabolita u terapiji lupus nefritisa i na taj su način ovi null polimorfizmi dovedeni u vezu s mogućim postizanjem pojačanog terapijskog odgovora (179). Klinički odgovor i polimorfizmi GSTs ispitivani su i kod oboljelih od SLE i IBD (180 – 182). U nekim studijama polimorfizmi gena GSTs ispitivani su kao čimbenik koji modulira rizik od razvoja raka te je nađena pozitivna korelacija s rizikom od raka u prisutnosti null genotipa (183, 184). Prema nekim ispitivanjima polimorfizmi gena GSTs su dovedeni u korelaciju s prognozom liječenja kod pacijenata s tumorskom bolešću (185, 186).

Istraživanja su pokazala da MTX inducira povećanje aktivnosti GSTs u eksperimentalnih životinja (187). Niz radova povezuje polimorfizme gena GSTs s učinkovitošću pojedinih protokola koji uključuju MTX u liječenju različitih malignih bolesti djece i odraslih. Ispitivana je povezanost genotipova GSTs i odgovora na liječenje GK, te mogući modificirajući učinak njihove aktivnosti na različite kemoterapeutike (188 – 190).

Istraživanja povezanosti polimorfizama gena GSTs s učinkovitošću MTX u djece oboljele od JIA prema dostupnoj literaturi do sada nisu provedena.

2. HIPOTEZA

Delecijski polimorfizmi gena GSTM1 i GSTT1 u bolesnika s juvenilnim idiopatskim artritism povezani su s većom vjerojatnošću postizanja remisije tijekom terapije metotretksatom.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

3.1. Opći cilj:

- analiza delecijских polimorfizama gena GSTM1 i GSTT1 u bolesnika s JIA

3.2. Specifični ciljevi:

- određivanje polimorfizma gena GSTM1 i GSTT1 u bolesnika s JIA u kojih je, sukladno kriterijima po Wallaceovoj, postignuta remisija tijekom terapije MTX
- određivanje polimorfizma gena GSTM1 i GSTT1 u bolesnika s JIA u kojih tijekom liječenja metotreksatom, sukladno kriterijima po Wallaceovoj, nije postignuta remisija
- utvrđivanje vrijednosti određivanja delecijских polimorfizama gena GSTM1 i GSTT1 u ranom predskazivanju učinkovitosti MTX u liječenju bolesnika s JIA

4. ISPITANICI I METODE

4.1. Ispitanici

U istraživanje je uključeno 109 bolesnika s JIA obrađivanih i kontroliranih u Klinici za pedijatriju KBC-a Zagreb u periodu od 2016. do 2020. godine. Dijagnoza JIA u svih bolesnika postavljena je na temelju postojećih ILAR kriterija, a klinička remisija utvrđena je na temelju kriterija po Wallaceovoj. Svi bolesnici koji sudjeluju u istraživanju liječe se sukladno ACR smjernicama za liječenje JIA (5), odnosno revidiranim ACR smjernicama za liječenje sistemskog JIA (6). Bolesnici u istraživanju podijeljeni su u dvije skupine. Prva je skupina bolesnika s dijagnozom juvenilnog idiopatskog artritisa u kojih je tijekom terapije MTX, neovisno o načinu primjene, postignuta stabilna klinička remisija u trajanju od minimalno 6 mjeseci (46 bolesnika). Drugu skupinu čine bolesnici s dijagnozom juvenilnog idiopatskog artritisa u kojih tijekom liječenja metotretksatom, neovisno o načinu primjene, nije postignuta stabilna klinička remisija (63 bolesnika).

U svih bolesnika uključenih u studiju određeni su delecijски polimorfizmi gena GSTM1 i GSTT1.

Klinički dio znanstvenog istraživanja proveden je u Zavodu za kliničku imunologiju, respiracijske i alergološke bolesti i reumatologiju Klinike za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra Zagreb, a laboratorijski dio proveden je u Zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Istraživanje je počelo nakon odobrenja etičkih povjerenstava KBC Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Od roditelja sve djece, uključujući i djecu stariju od 12 godina, koja su sudjelovala u istraživanju nakon objašnjavanja ciljeva i uvjeta istraživanja te prije počinjanja postupaka vezanih uz istraživanje, pribavljena je pisana suglasnost za sudjelovanje.

4.2. Metode rada

4.2.1. Anamneza i fizikalni pregled

U svih je bolesnika sukladno kriterijima po Wallaceovoj za postizanje remisije u JIA, učinjen klinički pregled, oftalmološki pregled prednjeg segmenta oka procjepnom svjetiljkom i određena aktivnost bolesti prema liječniku (MD global).










4.2.2. Laboratorijske pretrage

Prema kriterijima po Wallaceovoj kod svih ispitanika određena je brzina SE i serumska koncentracija CRP (turbidimetrijski). Učinjena je izolacija DNA iz periferne krvi upotrebom komercijalnog seta za izolaciju DNA te potom genotipizacija GSTM1 i GSTT1 metodom lančane reakcije polimerazom (PCR, engl. *polymerase chain reaction*) (169).

Za potrebe analize genomska DNA izolirana je iz 2 ml periferne venske krvi pomoću komercijalnog seta za izolaciju DNA prema protokolu proizvođača (*Nucleospin, Macherey Nagel, Düren, Njemačka*). Metoda se temelji na izolaciji DNA s pomoću kolona na koje se DNA veže i potom ispire različitim puferima (BW i B5) (slika 6). U daljnjem postupku 200 µL krvi pomiješa se s 25 µL proteinaze K i 200 µL pufera B3. Nakon inkubacije 10 – 15 minuta pri temperaturi od 70 °C, 425 µL smjese pomiješa se sa 210 µL etanola i nanese na Nucleospin kolonu. Nakon centrifugiranja (centrifuga 5415, Eppendorf) 1 minutu pri 11000xg filtrat se baca, a vezana DNA se ispire sa 500 µL pufera BW i centrifugira 1 minutu na 11000xg. Nakon toga se doda 600 µL pufera B5 i centrifugira 2 x 1 minutu pri 11000xg. Nucleospin kolonu se zatim premjesti u novu epruvetu, doda se 100 µL pufera za otapanje (pufer BE), te se nakon inkubacije od 1 minute pri sobnoj temperaturi centrifugira 1 minutu na 11000xg. Koncentracija DNA dobivene ovim postupkom iznosi 20 – 60 ng/µL.

Koncentracija izolirane DNA mjeri se fluorometrom (*Invitrogen Qubit 2.0 Fluorometer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD*), a uz uređaj koristimo set *Qubit dsDNA HS Assay (Thermo Fisher Scientific)* koji je pogodan za sve

Qubit uređaje. Koncentracije koje je moguće izmjeriti ovim uređajem su između 10 ng/μL i 100 ng/μL, a određuju se na temelju apsorpcijske vrijednosti na 260 nm valne duljine. Prilikom mjerenja najprije je potrebno razrijediti koncentrirani reagens koristeći pufer za razrjeđivanje, zatim uzeti 1 μl uzorka prethodno izolirane DNA te na početnom zaslonu uređaja odabrati dsDNA assay. Ova metoda izvodi se pri sobnoj temperaturi, a dobiveni signal je stabilan iduća 3 sata. Čistoća izolirane DNA svih ispitanika određena je *NanoDrop 2000* (*Thermo Scientific*) spektrofotometrom iz 1 μl DNA izolata. Čistoća DNA određuje se na temelju omjera valnih duljina DNA / proteini (260/280 nm) koji iznosi približno 1,8 te omjera DNA / soli (260/230 nm) koji iznosi 2,0 – 2,2.

1. Liza uzoraka krvi	2. Prilagođavanje veznih uvjeta	3. Vežanje DNA
 200 μL krvi 25 μL proteinaze K 200 μL B3 miješanje 70 °C 10 – 15 min	+ 210 μL etanola	 Nanošenje na kolonu  1 min 11000xg
4. Ispiranje membrane	5. Sušenje membrane	6. Otapanje DNA
 500 μL BW 600 μL B5  1 min 11000xg  1 min. 11000xg	 1 min 11000g	 100 μL BE (70°C) sobna temp. 1 min  1 min 11000xg

Slika 6. Shematski prikaz postupka izolacije DNA primjenom komercijalnog seta za izolaciju DNA
 DNA – deoksiribonukleinska kiselina, B3, B5, BW – komercijalni puferi koji se koriste u postupku

4.2.2.1. Genotipizacija GSTM1 i GSTT1 metodom PCR

Polimorfizmi gena GSTM1 i GSTT1 određeni su metodom PCR. Kao unutarnja kontrola uspješnosti PCR reakcije korišten je egzon 7 gena CYP1A1 (prvi član obitelji 1 podobitelji A u citokromu P450, engl. *cytochrome P450 family 1 subfamily A member 1*). Slijed nukleotida početnica 5' i 3' specifičnih za gene GSTM1, GSTT1 i CYP1A1 i veličina njihovih fragmenata prikazani su u tablici 1, dok su uvjeti reakcije PCR prikazani u tablici 2 (191, 192).

Ukupni volumen reakcije PCR iznosio je 25 µl (19,85 µl H₂O; 0,5 µl početnica 5' i 3' koncentracije 10 pmol/µl; 2,5 µl pufera 10X koji sadrži 25 mM MgCl₂ (Applied Biosystems); 0,5 µl deoksiribonukleozid-trifosfata (dNTP) koncentracije 10 mM (Applied Biosystems); 0,15 µl polimeraze Taq koncentracije 5 U/µl (Applied Biosystems); 1 µl DNA koncentracije 50 – 70 ng/µl).

Tablica 1. Slijed nukleotida početnica 5' i 3' specifičnih za gene GSTM1, GSTT1 i CYP1A1 i veličina fragmenata

Polimorfizam	Veličina PCR produkta (pb)	Nukleotidni slijed početnica
GSTM1	215	F: 5-GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC-3 R: 5-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG-3
GSTT1	480	F: 5-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3 R: 5-TCACGGGATCATGGCCAGCA-3
CYP1A1	312	F: 5-GAACTGCCACTT CAGCTGTCT-3 R: 5-CAGCTGCATTTG GAAGTGCTC-3

PCR – lančana reakcija polimerazom, GSTM1 – glutation S-transferaza M1, GSTT1 – glutation S-transferaza T1, CYP1A1 – prvi član obitelji 1 podobitelji A u citokromu P450

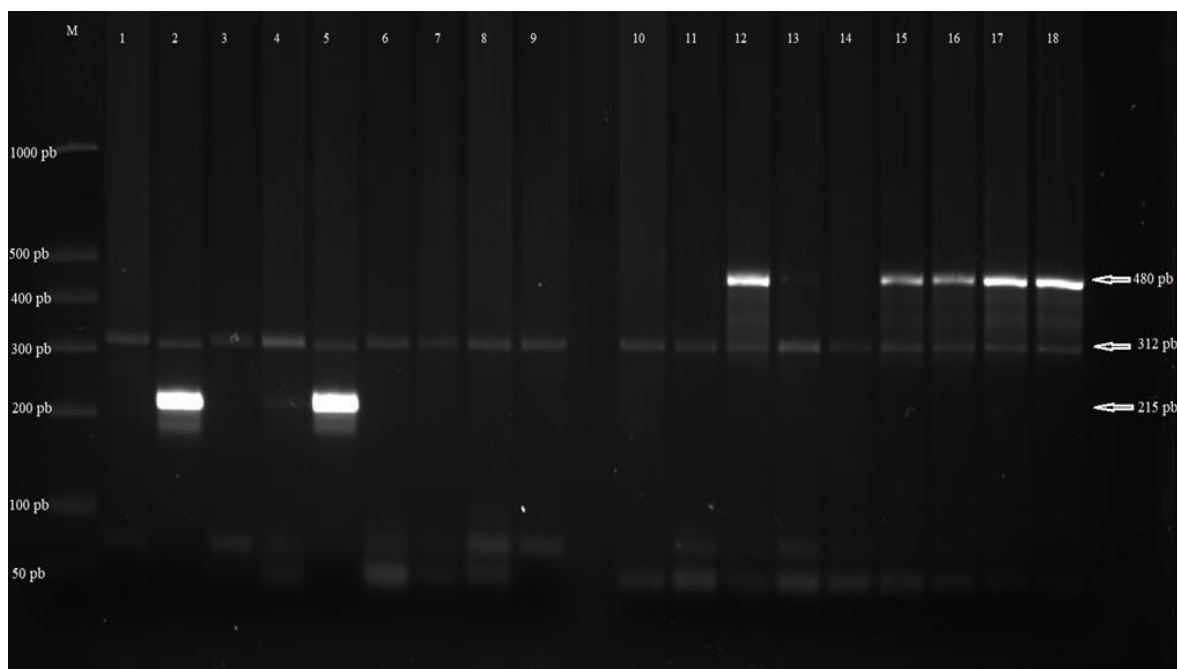
Tablica 2. Reakcijski uvjeti umnažanja istraživanih polimorfizama

Lokus	Uvjeti umnažanja																
GSTM1 GSTT1 CYP1A1	<table style="display: inline-table; vertical-align: middle;"> <tr> <td style="text-align: right;">94 °C</td> <td style="text-align: center;">}</td> <td style="text-align: left;">3'</td> <td rowspan="5" style="vertical-align: middle; padding-left: 10px;">30 ciklusa</td> </tr> <tr> <td style="text-align: right;">94 °C</td> <td style="text-align: center;">}</td> <td style="text-align: left;">30"</td> </tr> <tr> <td style="text-align: right;">59 °C</td> <td style="text-align: center;">}</td> <td style="text-align: left;">30"</td> </tr> <tr> <td style="text-align: right;">72 °C</td> <td style="text-align: center;">}</td> <td style="text-align: left;">45"</td> </tr> <tr> <td style="text-align: right;">72 °C</td> <td style="text-align: center;">}</td> <td style="text-align: left;">4'</td> </tr> </table>	94 °C	}	3'	30 ciklusa	94 °C	}	30"	59 °C	}	30"	72 °C	}	45"	72 °C	}	4'
94 °C	}	3'	30 ciklusa														
94 °C	}	30"															
59 °C	}	30"															
72 °C	}	45"															
72 °C	}	4'															

GSTM1 – glutation S-transferaza M1, GSTT1 – glutation S-transferaza T1, CYP1A1 – prvi član obitelji 1 podobitelji A u citokromu P450

PCR produkti gena *GSTM1* i *GSTT1* analizirani su na 2-postotnom agaroznom gelu. Gel agarozna dobije se otapanjem (u mikrovalnoj pećnici) 2 g agaroze (*Roche*) u 100 mL pufera 1×TAE. *GelRed* boja za bojenje nukleinskih kiselina u agarozu (*Olerup*) dodana je u ohlađenu, još tekuću agarozu. Otopina agaroze prelije se u kadicu za elektroforezu s postavljenim češljevim koji oblikuju jažice. Polimerizacija gela traje od 20 do 30 minuta. Nakon završene polimerizacije, uklone se češljevi, a agarozni gel se uranja u kadu za elektroforezu ispunjenu puferom 1×TAE. Uzorcima koji su se nanosili na ovako pripremljeni gel, prethodno je dodano 2 µl boje (*Loading Dye*) kako bi se pratio tijekom elektroforeze. DNA marker (*Olerup*) pipetira se u prvu jažicu svakog reda kako bismo odredili veličinu umnoženih fragmenata DNA u reakcijskim smjesama. DNA marker je smjesa točno određenog broja fragmenata DNA poznatih veličina (50, 100, 200, 300, 400, 500 i 1000 pb). Agarozna gel elektroforeza odvijala se 20 minuta, pri naponu struje od 200 V na sustavu za elektroforezu *VG-SYS wide Vari-Gel System (SCIE-PLAS)*, transformator *PowerPac Basic (BIORAD)*. Razdvojeni fragmenti DNA pod UV svjetlom transiluminatora *ImageQuant100 (Life Sciences)* fluoresciraju zbog vezanja molekula *GelRed* boje na DNA. Svaki se agarozni gel fotografira (slika 7), a fotografija gela se označi, analizira te arhivira.

Prisutnost alela određuje se identifikacijom PCR produkta veličine 215 parova baza za *GSTM1*, te veličine 480 parova baza za *GSTT1*. Odsutnost PCR produkta za *GSTM1* ili *GSTT1* ukazuje na null genotip ili delecijski polimorfizam za *GSTM1* ili *GSTT1*. Osobe s jednom ili dvije kopije ispitivanog gena klasificirane su kao „pozitivni“ genotip, a osobe s homozigotnim delecijama kao „null“ genotip. Fragment dužine 312 pb gena *CYP1A1* dokaz je uspješne PCR reakcije, kao pozitivna kontrola korišten je ispitanik s oba „pozitivna“ genotipa. Ovom analizom nije moguće razlikovati je li nositelj „pozitivnog“ genotipa homozigot ili heterozigot (191).



Slika 7. Elektroforetogram agaroznog gela. M – DNA marker za određivanje veličine fragmenata. Kod uzoraka br. 2 i 5 prisutan je umnoženi fragment veličine 215 pb – određen je GSTM1 „pozitivan“ genotip. Kod uzoraka 1, 3, 4, 6, 7, 8 i 9 nije umnožen fragment veličine 215 pb – određen je GSTM1 „null“ genotip. Kod uzoraka 12, 15, 16, 17 i 18 prisutan je umnoženi fragment veličine 480 pb – određen je GSTT1 „pozitivan“ genotip. Kod uzoraka 10, 11, 13 i 14 nije umnožen fragment veličine 480 pb – određen je GSTT1 „null“ genotip. Kod svih uzoraka umnožen je fragment veličine 312 pb, što potvrđuje uspješnost izvođenja PCR reakcije.

4.3. Statističke metode

Priprema podataka izvršena je s pomoću računalnog tabličnog kalkulatora Microsoft Office Excel. Podaci su prikazani tablično i grafički. Kolmogorov-Smirnovljevim testom analizirana je raspodjela kontinuiranih numeričkih vrijednosti te su se u skladu s dobivenim podacima primijenili odgovarajući neparametrijski testovi. Kategorijske i nominalne vrijednosti su prikazane kroz odgovarajuće frekvencije i udjele. Kontinuirane vrijednosti prikazane su kroz medijane i interkvartilne raspone, a razlike između njih analizirane su Mann-Whitneyjevim U testom. Razlike u kategorijskim varijablama analizirane su Fisher-Freeman-Haltonovim testom. P vrijednosti manje od 0,05 su smatrane značajnima. U analizi se koristila programska podrška IBM SPSS Statistics, verzija 27.0.1 (<https://www.ibm.com/analytics/spss-statistics-software>).

5. REZULTATI

5.1. Pregled osnovnih podataka o ispitanicima

Određivanje polimorfizama gena GSTM1 i GSTT1 učinjeno je u 109 djece s dijagnozom JIA, 35 dječaka i 74 djevojčice. Tijekom istraživanja djeca s JIA su podijeljena u dvije skupine: prvu skupinu od 46/109 (42,2 %) djece, u koje je tijekom liječenja MTX postignuta stabilna klinička remisija u trajanju od minimalno 6 mjeseci, te drugu skupinu od 63/109 (57,8 %) djece, u koje tijekom liječenja MTX nije postignuta stabilna klinička remisija. Prosječna dob u kojoj je bolest počela u skupini oboljele djece s postignutom remisijom tijekom liječenja MTX bila je 68 (10 – 210), a u skupini oboljele djece bez postignute remisije tijekom liječenja MTX 79 (9 – 209) mjeseci. Navedene dvije skupine ispitanika nisu se statistički značajno razlikovale prema spolu i dobi u kojoj je počela bolest (tablice 3A i 3B).

Tablica 3A. Podjela skupina ispitanika s obzirom na spol

		Skupina				P
		MTX N = 46		MTX + bDMARD N = 63		
		N	%	N	%	
Spol	Muški	17	37,0 %	18	28,6 %	0,409
	Ženski	29	63,0 %	45	71,4 %	

bDMARD – biološki antireumatski lijekovi koji modificiraju tijek bolesti, MTX – metotreksat

Tablica 3B. Podjela skupina ispitanika s obzirom na dob prilikom početka bolesti

Skupina		N	Min.	Max.	Centile			P
					25.	Medijan	75.	
Dob kod početka bolesti (mj.)	MTX	46	9,00	209,00	50,25	79,00	145,75	0,073
	MTX + bDMARD	63	10,00	210,00	23,00	68,00	129,00	

bDMARD – biološki antireumatski lijekovi koji modificiraju tijek bolesti, MTX – metotreksat

Razlike u kliničkim i laboratorijskim kategorijskim varijablama između ispitivanih skupina s obzirom na terapiju i remisiju bolesti prikazane su u tablici 4. S obzirom na tip JIA, dijagnoza oligoartikularnog perzistentnog tipa postavljena je u 42/109 djece (38,5 %) (remisija tijekom liječenja MTX 20/109 (18,3 %) / bez remisije tijekom liječenja MTX 22/109 (20,2 %)), oligoartikularnog proširenog tipa u 4/109 (3,7 %) djece (remisija tijekom liječenja MTX 0 (0,0 %) / bez remisije tijekom liječenja MTX 4/109 (3,7 %)), poliartrikularnog RF negativnog tipa u 51/109 (46,8 %) djece (remisija tijekom liječenja MTX 20/109 (18,3 %) / bez remisije tijekom liječenja MTX 31/109 (28,4 %)), poliartrikularnog RF pozitivnog tipa u 5/109 (4,6 %) djece (remisija tijekom liječenja MTX 3/109 (2,8 %) / bez remisije tijekom liječenja MTX 2/109 (1,8 %)) te sistemskog tipa u 7/109 (6,4 %) djece (remisija tijekom liječenja MTX 3/109 (2,8 %) / bez remisije tijekom liječenja MTX 4/109 (3,7 %)). S obzirom na imunološke nalaze, pozitivan nalaz ANA nađen je u 17/46 (37,0 %) oboljele djece s postignutom remisijom tijekom liječenja MTX te u 33/63 (52,4 %) oboljele djece bez postignute remisije tijekom liječenja MTX, dok je pozitivan nalaz RF nađen u 3/46 (6,5 %) oboljele djece s postignutom remisijom tijekom liječenja MTX te u 2/63 (3,2 %) oboljele djece bez postignute remisije tijekom liječenja MTX. Navedene dvije skupine oboljelih nisu se statistički značajno razlikovale s obzirom na tip JIA niti imunološke nalaze. S obzirom na zahvaćanje zglobova, samo su ručni zglobovi bili statistički značajno češće zahvaćeni u skupini oboljele djece bez postignute remisije tijekom liječenja MTX: 29,0 % naprema 10,9 %; $P = 0,032$. Također, u istoj skupini statistički je značajnije registriran i uveitis ($P = 0,034$).

Tablica 4. Razlike u kliničkim i laboratorijskim kategorijskim varijablama između ispitivanih skupina s obzirom na terapiju i remisiju bolesti: Fisher-Freeman-Haltonov test

		Skupina				P
		MTX N = 46		MTX + bDMARD N = 63		
		N	%	N	%	
JIA tip	Oligoartikularni perzistentni	20	43,5 %	22	34,9 %	0,395
	Oligoartikularni prošireni	0	0,0 %	4	6,3 %	
	Poliartikularni RF negativni	20	43,5 %	31	49,2 %	
	Poliartikularni RF pozitivni	3	6,5 %	2	3,2 %	
	Sistemska	3	6,5 %	4	6,3 %	
ANA	Negativan nalaz	29	63,0 %	30	47,6 %	0,124
	Pozitivan nalaz	17	37,0 %	33	52,4 %	
RF	Negativan nalaz	43	93,5 %	61	96,8 %	0,648
	Pozitivan nalaz	3	6,5 %	2	3,2 %	
Zahvaćenost zglobova stopala	Ne	38	82,6 %	54	85,7 %	0,790
	Da	8	17,4 %	9	14,3 %	
Zahvaćenost gležnjeva	Ne	28	60,9 %	42	66,7 %	0,551
	Da	18	39,1 %	21	33,3 %	
Zahvaćenost koljena	Ne	18	39,1 %	15	23,8 %	0,096
	Da	28	60,9 %	48	76,2 %	
Zahvaćenost kukova	Ne	40	87,0 %	54	85,7 %	1,000
	Da	6	13,0 %	9	14,3 %	
Zahvaćenost malih zglobova šaka	Ne	28	60,9 %	43	68,3 %	0,542
	Da	18	39,1 %	20	31,7 %	
Zahvaćenost ručnih zglobova	Ne	41	89,1 %	45	71,0 %	0,032
	Da	5	10,9 %	18	29,0 %	
Zahvaćenost laktova	Ne	44	95,7 %	54	85,7 %	0,112
	Da	2	4,3 %	9	14,3 %	
Zahvaćenost ramena	Ne	44	95,7 %	62	98,4 %	0,574
	Da	2	4,3 %	1	1,6 %	
Zahvaćenost temporomandibularnih zglobova	Ne	46	100,0 %	60	95,2 %	0,260
	Da	0	0,0 %	3	4,8 %	
Uveitis	Ne	44	95,7 %	50	79,4 %	0,034
	Jednostrani	1	2,2 %	3	4,8 %	
	Obostrani	1	2,2 %	10	15,9 %	

ANA – antinuklearna antitijela, bDMARD – biološki antireumatski lijekovi koji modificiraju tijek bolesti, JIA – juvenilni idiopatski artritis, MTX – metotreksat, RF – reumatoidni faktor

Prema anamnestičkim podacima o razvoju jutarnje ukočenosti i njezinu trajanju na početku bolesti te prije početka liječenja MTX, nije registrirano statistički značajnih razlika između skupine oboljele djece s postignutom remisijom te skupine oboljele djece bez postignute remisije tijekom liječenja MTX (tablica 5). S obzirom na kliničke karakteristike ispitivanih skupina očekivana je statistički značajna razlika između skupina djece s i bez postignute remisije tijekom liječenja MTX ($P < 0,001$). U skupini oboljele djece u koje je postignuta remisija tijekom liječenja MTX, 28/46 djece (60,9 %) je tijekom ispitivanja još uvijek bilo na terapiji (remisija uz lijek), a bez terapije je bilo 18/46 (39,1 %) djece (remisija bez lijeka).

Tablica 5. Razlike u trajanju jutarnje ukočenosti na početku bolesti i nakon uvođenja terapije metotreksatom između ispitivanih skupina te opisna statistika kliničke remisije uz terapiju metotreksatom: Fisher-Freeman-Haltonov test

		Skupina				P
		MTX N = 46		MTX + bDMARD N = 63		
		N	%	N	%	
Jutarnja ukočenost na početku bolesti	Ne	9	19,6 %	12	19,0 %	0,722
	≤ 15 min	6	13,0 %	12	19,0 %	
	> 15 min	31	67,4 %	39	61,9 %	
Jutarnja ukočenost prije početka terapije MTX	Ne	9	19,6 %	10	15,9 %	0,669
	≤ 15 min	7	15,2 %	14	22,2 %	
	> 15 min	30	65,2 %	39	61,9 %	
Klinička remisija uz terapiju MTX	Ne	0	0,0 %	63	100,0 %	< 0,001
	Uz terapiju	28	60,9 %	0	0,0 %	
	Bez terapije	18	39,1 %	0	0,0 %	

bDMARD – biološki antireumatski lijekovi koji modificiraju tijek bolesti, MTX – metotreksat

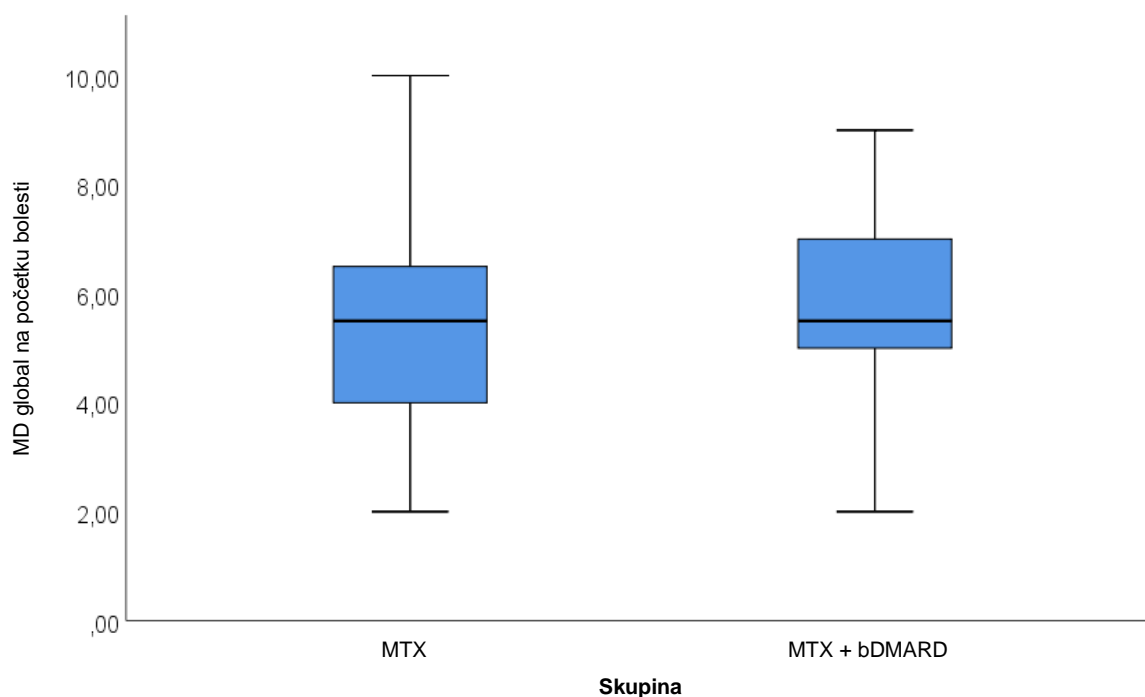
Prilikom usporedbe procjene aktivnosti bolesti prema liječniku na početku bolesti i na početku liječenja MTX nije registrirano statistički značajnih razlika između skupine oboljele djece s postignutom remisijom te skupine oboljele djece bez postignute remisije tijekom terapije MTX. Statistički značajna razlika pri usporedbi procjene aktivnosti bolesti prema liječniku očekivano je registrirana između ispitivanih skupina djece na posljednjoj kontroli tijekom monoterapije MTX odnosno na kraju monoterapije MTX ($P < 0,001$) (tablica 6 i slike 8 do 10).

Tablica 6. Razlike u vrijednostima MD global između ispitivanih skupina na početku bolesti, na početku terapije MTX te na posljednjoj kontroli tijekom / nakon monoterapije MTX: Mann-Whitneyjev U test

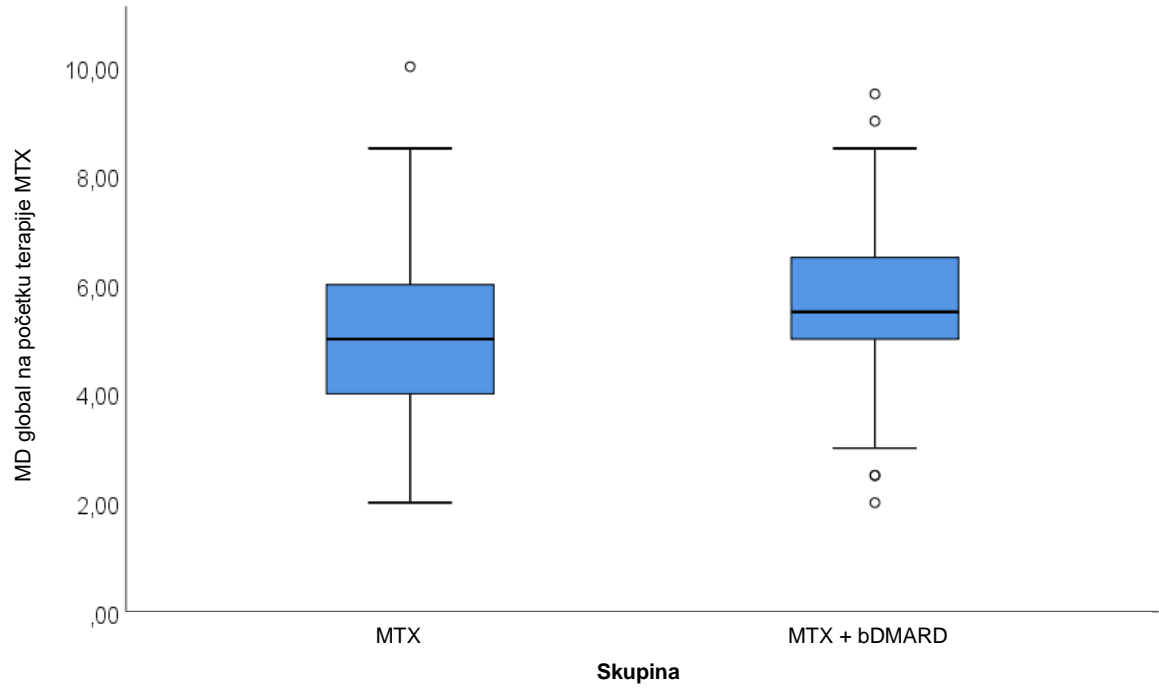
Skupina	N	Aritmetička sredina	SD	Min.	Max.	Centile			
						25.	Medijan	75.	
MD global na početku bolesti	MTX	46	5,44	1,67	2,00	10,00	4,00	5,50	6,50
	MTX + bDMARD	63	5,78	1,63	2,00	9,00	5,00	5,50	7,00
MD global na početku terapije MTX	MTX	46	5,22	1,65	2,00	10,00	4,00	5,00	6,00
	MTX + bDMARD	63	5,60	1,67	2,00	9,50	5,00	5,50	6,50
MD global na posljednjoj kontroli tijekom / nakon monoterapije MTX	MTX	46	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	MTX + bDMARD	63	5,44	1,66	2,00	9,50	4,50	5,00	6,00

	Mann-Whitney U	Z	P
MD global na početku bolesti	1270,000	- 1,104	0,270
MD global na početku terapije MTX	1201,500	- 1,527	0,127
MD global na posljednjoj kontroli tijekom / nakon monoterapije MTX	0,000	- 9,259	< 0,001

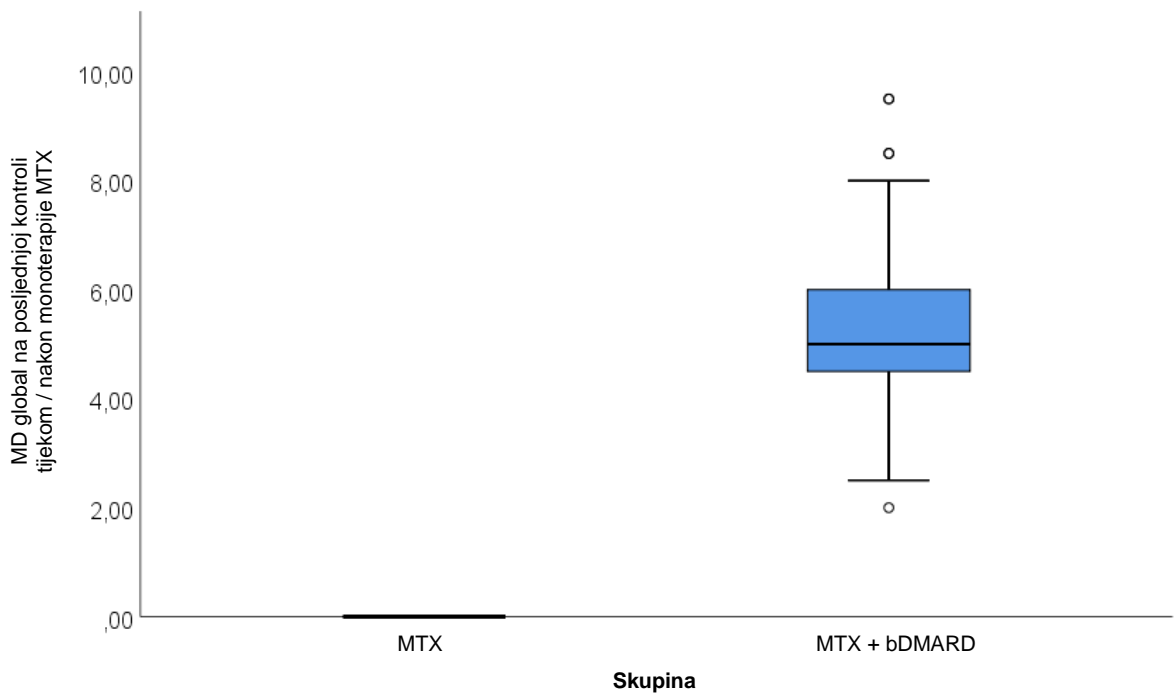
MD global – procjena aktivnosti bolesti prema liječniku, MTX – metotreksat, bDMARD – biološki antireumatski lijekovi koji modificiraju tijek bolesti



Slika 8. Razlike u vrijednostima MD global između ispitivanih skupina na početku bolesti



Slika 9. Razlike u vrijednostima MD global između ispitivanih skupina na početku terapije MTX



Slika 10. Razlike u vrijednostima MD global između ispitivanih skupina na posljednjoj kontroli tijekom / nakon monoterapije MTX

Razlike u promatranim kontinuiranim kliničkim i laboratorijskim vrijednostima između ispitivanih skupina s obzirom na postignutu remisiju tijekom liječenja metotreksatom prikazane su u tablici 7. Jedina statistički značajna razlika između skupine oboljele djece u koje je tijekom liječenja MTX postignuta remisija i skupine oboljele djece u koje tijekom liječenja MTX nije postignuta remisija (te je bilo potrebno liječenje i bDMARD) bila je u trajanju liječenja MTX, koje je bilo značajno duže u skupini koja nije postigla kliničku remisiju s medijanom vrijednosti (interkvartilni raspon) 58,0 (37,0 – 100,0) mjeseci naprema 36,5 (24,0 – 56,5) mjeseci; $P < 0,001$.

Tablica 7. Razlike u promatranim kontinuiranim kliničkim i laboratorijskim vrijednostima između ispitivanih skupina s obzirom na postignutu remisiju nakon terapije metotreksatom ili dodatnim uvođenjem biološke terapije: Mann-Whitneyjev U test

Skupina	N	Min.	Max.	Centile			P	
				25.	Medijan	75.		
Vrijeme od početka bolesti do početka terapije MTX (mj.)	MTX	46	1,00	84,00	1,00	3,00	14,25	0,828
	MTX + bDMARD	63	1,00	136,00	2,00	4,00	9,00	
Trajanje terapije MTX (mj.)	MTX	46	6,00	156,00	24,00	36,50	56,50	<0,001
	MTX + bDMARD	63	10,00	246,00	37,00	58,00	100,00	
SE (mm/h) na početku bolesti	MTX	46	4,00	95,00	15,00	25,00	42,75	0,632
	MTX + bDMARD	63	5,00	87,00	14,00	22,00	33,00	
CRP (g/l) na početku bolesti	MTX	46	0,30	163,60	1,58	3,95	14,35	0,849
	MTX + bDMARD	63	0,30	101,00	2,10	4,70	10,10	
Htc (l/l) na početku bolesti	MTX	46	0,25	0,40	0,32	0,34	0,36	0,197
	MTX + bDMARD	63	0,27	0,40	0,31	0,33	0,36	
L (x10 ⁹ /l) na početku bolesti	MTX	46	4,40	17,00	7,90	9,30	11,70	0,866
	MTX + bDMARD	63	4,61	31,40	8,10	9,40	11,30	
Trc (x10 ⁹ /l) na početku bolesti	MTX	46	218,00	784,00	310,75	385,50	440,25	0,441
	MTX + bDMARD	63	171,00	629,00	350,00	401,00	458,00	
SE (mm/h) prije početka terapije MTX	MTX	46	3,00	107,00	8,00	20,00	46,25	1,000
	MTX + bDMARD	63	5,00	85,00	12,00	20,00	31,00	
CRP (g/l) prije početka terapije MTX	MTX	46	0,30	214,90	0,68	2,85	11,63	0,425
	MTX + bDMARD	63	0,20	431,40	1,60	4,10	12,00	
Htc (l/l) prije početka terapije MTX	MTX	46	0,29	0,43	0,32	0,35	0,37	0,278
	MTX + bDMARD	63	0,26	0,44	0,32	0,34	0,36	
L (x10 ⁹ /l) prije početka terapije MTX	MTX	46	4,40	16,34	6,93	9,40	11,25	0,432
	MTX + bDMARD	63	4,50	24,80	7,80	9,70	11,50	
Trc (x10 ⁹ /l) prije početka terapije MTX	MTX	46	180,00	645,00	284,25	370,00	431,50	0,401
	MTX + bDMARD	63	182,00	765,00	318,00	389,00	425,00	

bDMARD – biološki antireumatski lijekovi koji modificiraju tijek bolesti, CRP – C reaktivni protein, Htc – hematokrit, L – leukociti, MTX – metotreksat, SE – sedimentacija eritrocita, Trc – trombociti

Tablica 8 prikazuje karakteristike ispitivane skupine oboljele djece u koje tijekom liječenja MTX nije postignuta remisija odnosno skupine oboljele djece kojoj je bilo indicirano započeti liječenje bDMARD. Više od pola djece (32/63, 50,8 %) u navedenoj skupini je prije početka liječenja bDMARD imalo jutarnju ukočenost dužu od 15 minuta. Tijekom ispitivanja je u sve oboljele djece u koje nije postignuta remisija uz liječenje MTX, ista postignuta uz liječenje bDMARD. Klinička remisija je u 49/63 (77,8 %) oboljele djece u navedenoj skupini postignuta liječenjem jednim bDMARD, dok je u 14/63 (22,2 %) oboljele djece za postizanje remisije trebala jedna ili više zamjena bDMARD. Tijekom ispitivanja remisija uz liječenje bDMARD je uspješno održavana u 56/63 (88,9 %) djece (remisija uz lijek), dok je u 7/63 (11,1 %) djece tijekom ispitivanja stabilna remisija održana i nakon prekida liječenja bDMARD (remisija bez lijeka).

Tablica 8. Karakteristike ispitivane skupine pacijenata koji su dobili biološku terapiju nakon monoterapije metotreksatom (N = 63)

		MTX + bDMARD N = 63	
		N	%
Jutarnja ukočenost prije početka biološke terapije	Ne	19	30,2 %
	≤ 15 min	12	19,0 %
	> 15 min	32	50,8 %
bDMARD: ADA	Ne	20	31,7 %
	Da	43	68,3 %
bDMARD: ETN	Ne	40	63,5 %
	Da	23	36,5 %
bDMARD: IFX	Ne	61	96,8 %
	Da	2	3,2 %
bDMARD: TCZ	Ne	49	77,8 %
	Da	14	22,2 %
Klinička remisija uz bDMARD	Ne	0	0,0 %
	Uz terapiju	56	88,9 %
	Bez terapije	7	11,1 %
Broj različitih bDMARD	Jedna vrsta terapije	49	77,8 %
	Dvije i više zamjena	14	22,2 %

ADA – adalimumab, bDMARD – biološki antireumatski lijekovi koji modificiraju tijek bolesti, ETN – etanercept, IFX – infliksimab, MTX – metotreksat, TCZ – tocilizumab

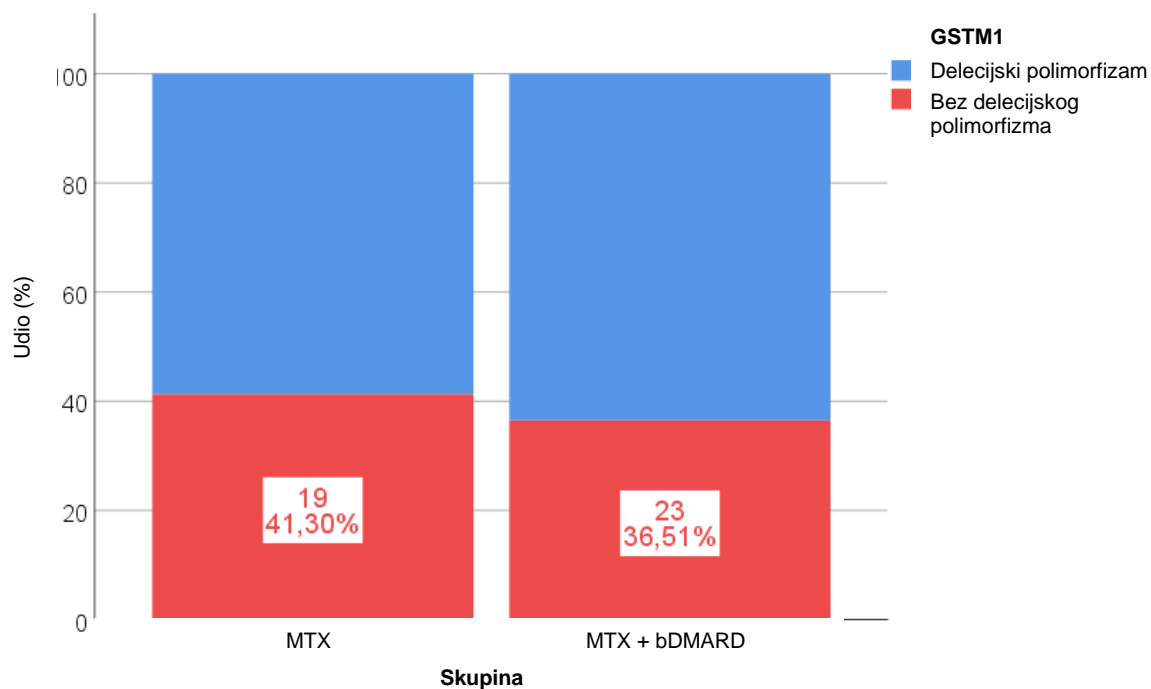
5.2. Polimorfizmi gena za GSTs

Razlike delecijских polimorfizama gena GSTM1 i GSTT1 između ispitivanih skupina s obzirom na postignutu remisiju tijekom liječenja MTX prikazane su u tablici 9 te na slikama 11 do 13. Nije bilo značajnih razlika u raspodjeli pojedinih delecijских polimorfizama između ispitivanih skupina. Delecijски polimorfizam gena GSTM1 detektiran je u 40/63 (63,5 %) ispitanika u kojih tijekom terapije MTX nije postignuta remisija te u 27/46 (58,7 %) ispitanika u kojih je tijekom terapije MTX postignuta remisija. Delecijски polimorfizam GSTT1 detektiran je u 14/63 (22,2 %) ispitanika u kojih tijekom terapije MTX nije postignuta remisija te u 8/46 (17,4 %) ispitanika u kojih je tijekom terapije MTX postignuta remisija. Kombinacija delecijских polimorfizama za gene GSTM1 i GSTT1 detektirana je 8/63 (12,7 %) ispitanika u kojih tijekom terapije MTX nije postignuta remisija te u 6/46 (13,0 %) ispitanika u kojih je tijekom terapije MTX postignuta remisija. Nije bilo značajnih razlika u raspodjeli pojedinih delecijских polimorfizama niti njihove kombinacije između ispitivanih skupina.

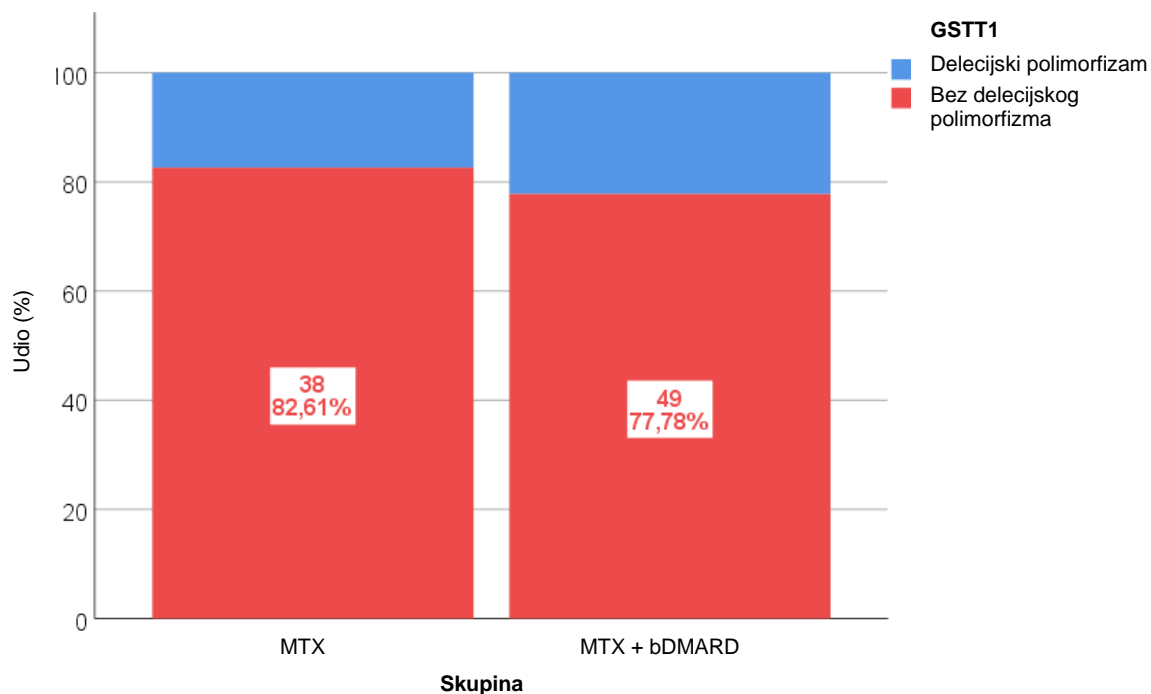
Tablica 9. Razlike delecijских polimorfizama gena GSTM1 i GSTT1 između ispitivanih skupina s obzirom na postignutu remisiju nakon terapije metotreksatom ili dodatnim uvođenjem biološke terapije: Fisher-Freeman-Haltonov test

		MTX N = 46		MTX + bDMARD N = 63		P
		N	%	N	%	
GSTM1	Delecijски polimorfizam (0)	27	58,7 %	40	63,5 %	0,692
	Bez delecijского polimorfizma (1)	19	41,3 %	23	36,5 %	
GSTT1	Delecijски polimorfizam (0)	8	17,4 %	14	22,2 %	0,632
	Bez delecijского polimorfizma (1)	38	82,6 %	49	77,8 %	
GSTM1/GSTT1	0/0	6	13,0 %	8	12,7 %	0,600
	0/1	21	45,7 %	32	50,8 %	
	1/0	2	4,3 %	6	9,5 %	
	1/1	17	37,0 %	17	27,0 %	

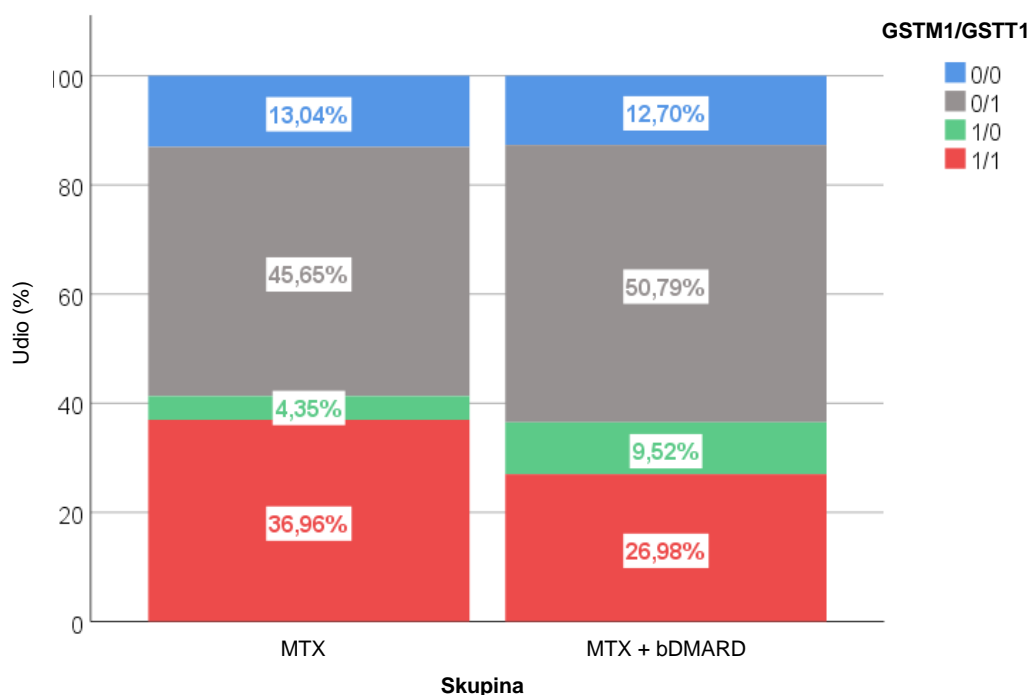
bDMARD – biološki antireumatski lijekovi koji modificiraju tijek bolesti, GST – glutacion S-transferaza, MTX – metotreksat, GSTM1 – glutacion S-transferaza M1, GSTT1 – glutacion S-transferaza T1



Slika 11. Razlike u učestalosti delecijjskih polimorfizama gena GSTM1 s obzirom na ispitivane skupine



Slika 12. Razlike u učestalosti delecijjskih polimorfizama gena GSTT1 s obzirom na ispitivane skupine



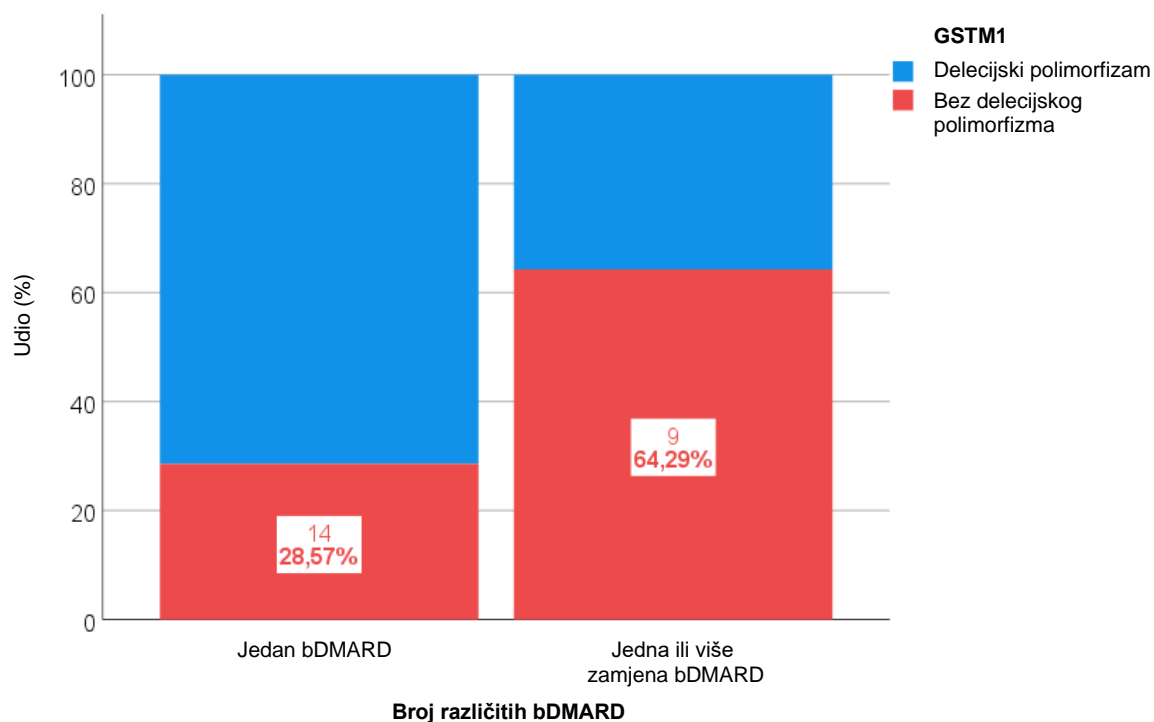
Slika 13. Razlike u učestalosti delecijских polimorfizama gena GSTM1 i GSTT1 s obzirom na ispitivane skupine

Dodatno su analizirane razlike delecijских polimorfizama gena GSTM1 i GSTT1 u skupini djece u koje tijekom liječenja MTX nije postignuta remisija, odnosno bilo je potrebno liječenje bDMARD (N = 63) u odnosu na broj bDMARD potrebnih za postizanje remisije (jedan bDMARD u odnosu na jednu ili više zamjena bDMARD), a dobiveni rezultati prikazani su u tablici 10 i na slici 14. U podskupini oboljele djece u kojoj je za postizanje remisije bila potrebna jedna ili više zamjena bDMARD statistički je značajno zastupljeniji nalaz pozitivnog genotipa polimorfizma GSTM1: 64,3 % naprema 28,6 %; P = 0,026.

Tablica 10. Razlike delecijских polimorfizama gena GSTM1 i GSTT1 u skupini djece u kojoj tijekom liječenja MTX nije postignuta remisija, odnosno bilo je potrebno liječenje bDMARD (N = 63) u odnosu na broj bDMARD potrebnih za postizanje remisije (jedan bDMARD u odnosu na jednu ili više zamjena bDMARD): Fisher-Freeman-Haltonov test

		Broj različitih bDMARD				P
		Jedan bDMARD N = 49		Jedna ili više zamjena bDMARD N = 14		
		N	%	N	%	
GSTM1	Delecijски polimorfizam (0)	35	71,4 %	5	35,7 %	0,026
	Bez delecijского polimorfizma (1)	14	28,6 %	9	64,3 %	
GSTT1	Delecijски polimorfizam (0)	11	22,4 %	3	21,4 %	1,000
	Bez delecijского polimorfizma (1)	38	77,6 %	11	78,6 %	
GSTM1/GSTT1	0/0	8	16,3 %	0	0,0 %	0,052
	0/1	27	55,1 %	5	35,7 %	
	1/0	3	6,1 %	3	21,4 %	
	1/1	11	22,4 %	6	42,9 %	

bDMARD – biološki antireumatski lijekovi koji modificiraju tijek bolesti, GSTM1 – glutation S-transferaza M1, GSTT1 – glutation S-transferaza T1



Slika 14. Razlike u učestalosti delecijских polimorfizama gena GSTM1 kod pacijenata koji su bili na biološkoj terapiji (N = 63) u odnosu na broj bioloških lijekova koje koriste

Daljnjom usporedbom podskupina djece u koje je remisija postignuta liječenjem bDMARD (podskupina u kojoj je za postizanje remisije bila dostatna terapija inicijalnim bDMARD i podskupina u kojoj je za postizanje remisije bila potrebna jedna ili više zamjena bDMARD) nije nađeno statistički značajnih razlika s obzirom na distribuciju prema spolu ili dobi kod početka bolesti (tablice 11A i 11B).

Tablica 11A. Podjela podskupina ispitanika s obzirom na spol

		Broj različitih bDMARD				P
		Jedan bDMARD N = 49		Jedna ili više zamjena bDMARD N = 14		
		N	%	N	%	
Spol	Muški	15	30,6 %	3	21,4 %	0,739
	Ženski	34	69,4 %	11	78,6 %	

bDMARD – biološki antireumatski lijekovi koji modificiraju tijek bolesti

Tablica 11B. Podjela podskupina ispitanika s obzirom na dob prilikom početka bolesti

	Broj različitih bDMARD	N	Min.	Max.	Centile			P
					25.	Medijan	75.	
Dob kod početka bolesti (mj.)	Jedna vrsta terapije	49	12	210	25,50	72,00	120,00	0,467
	Jedna ili više zamjena	14	10	191	13,50	35,50	141,25	

bDMARD – biološki antireumatski lijekovi koji modificiraju tijek bolesti

Razlike u kliničkim i laboratorijskim kategorijskim varijablama između ispitivanih podskupina s obzirom na broj bDMARD potrebnih za postizanje remisije prikazane su u tablici 12.

S obzirom na uspoređivane kliničke (tip JIA, zahvaćeni zglobovi, uveitis, jutarnja ukočenost na početku bolesti i prije početka biološke terapije) i laboratorijske (ANA, RF) kategorijske varijable između ispitivanih podskupina, statistički značajne razlike uočene su u učestalosti razvoja upale malih zglobova šaka, koji su statistički značajno češće bili zahvaćeni u podskupini djece u kojoj je za postizanje remisije bila nužna jedna ili više zamjena bDMARD: 57,1 % naprema 24,5 % ($P = 0,047$). Također u istoj podskupini statistički je značajnije registriran i uveitis: 42,9 % naprema 14,2 % ($P = 0,026$).

Razlike u promatranim kontinuiranim kliničkim i laboratorijskim vrijednostima između ispitivanih podskupina s obzirom na broj bDMARD potrebnih za postizanje remisije prikazane su u tablici 13. Jedina statistički značajna razlika u navedenim vrijednostima između uspoređivanih podskupina oboljele djece je trajanje terapije bDMARD, koje je bilo statistički značajno duže u podskupini u kojoj je za postizanje remisije bila potrebna jedna ili više zamjena bDMARD s medijanom vrijednosti (interkvartilni raspon) 79,5 (55,0 – 105,0) mjeseci naprema 43,0 (31,0 – 60,0) mjeseci; $P = 0,002$.

Tablica 12. Razlike u kliničkim i laboratorijskim kategorijskim varijablama između ispitivanih podskupina s obzirom na broj bDMARD potrebnih za postizanje remisije: Fisher-Freeman-Haltonov test

		Broj različitih bDMARD				P
		Jedan bDMARD N = 49		Jedna ili više zamjena bDMARD N = 14		
		N	%	N	%	
JIA dg	Oligoart. perzistentni	20	40,8 %	2	14,3 %	0,188
	Oligoart. prošireni	2	4,1 %	2	14,3 %	
	Poliart. RF negativni	22	44,9 %	9	64,3 %	
	Poliart. RF pozitivni	2	4,1 %	0	0,0 %	
	Sistemska	3	6,1 %	1	7,1 %	
ANA	Negativan nalaz	24	49,0 %	6	42,9 %	0,767
	Pozitivan nalaz	25	51,0 %	8	57,1 %	
RF	Negativan nalaz	47	95,9 %	14	100,0 %	1,000
	Pozitivan nalaz	2	4,1 %	0	0,0 %	
Zahvaćenost zglobova stopala	Ne	41	83,7 %	13	92,9 %	0,670
	Da	8	16,3 %	1	7,1 %	
Zahvaćenost gležnjeva	Ne	34	69,4 %	8	57,1 %	0,522
	Da	15	30,6 %	6	42,9 %	
Zahvaćenost koljena	Ne	12	24,5 %	3	21,4 %	1,000
	Da	37	75,5 %	11	78,6 %	
Zahvaćenost kukova	Ne	42	85,7 %	11	84,6 %	1,000
	Da	7	14,3 %	2	15,4 %	
Zahvaćenost malih zglobova šaka	Ne	37	75,5 %	6	42,9 %	0,047
	Da	12	24,5 %	8	57,1 %	
Zahvaćenost ručnih zglobova	Ne	36	73,5 %	8	61,5 %	0,495
	Da	13	26,5 %	5	38,5 %	
Zahvaćenost laktova	Ne	43	87,8 %	10	76,9 %	0,381
	Da	6	12,2 %	3	23,1 %	
Zahvaćenost ramena	Ne	49	100,0 %	12	92,3 %	0,210
	Da	0	0,0 %	1	7,7 %	
Zahvaćenost temporomandibularnih zglobova	Ne	48	98,0 %	11	84,6 %	0,109
	Da	1	2,0 %	2	15,4 %	
Uveitis	Ne	42	85,7 %	8	57,1 %	0,026
	Jednostrani	1	2,0 %	2	14,3 %	
	Obostrani	6	12,2 %	4	28,6 %	
Jutarnja ukočenost na početku bolesti	Ne	10	20,4 %	2	14,3 %	0,256
	≤ 15 min	7	14,3 %	5	35,7 %	
	> 15 min	32	65,3 %	7	50,0 %	
Jutarnja ukočenost prije početka biološke terapije	Ne	17	34,7 %	2	14,3 %	0,284
	≤ 15 min	8	16,3 %	4	28,6 %	
	> 15 min	24	49,0 %	8	57,1 %	

ANA – antinuklearna antitijela, bDMARD – biološki antireumatski lijekovi koji modificiraju tijek bolesti, JIA – juvenilni idiopatski artritis, RF – reumatoidni faktor

Tablica 13. Razlike u promatranim kontinuiranim kliničkim i laboratorijskim vrijednostima između ispitivanih podskupina s obzirom na broj zamjena bDMARD potrebnih za postizanje remisije: Mann-Whitneyjev U test

	Broj različitih bDMARD	N	Min.	Max.	Centile			P
					25.	Medijan	75.	
Dob kod početka bolesti (mj.)	Jedna vrsta terapije	49	12	210	25,50	72,00	120,00	0,467
	Jedna ili više zamjena	14	10	191	13,50	35,50	141,25	
SE (mm/h) na početku bolesti	Jedna vrsta terapije	49	5	87	14	22,00	31,00	0,358
	Jedna ili više zamjena	14	6	76	14	25,50	57,25	
CRP (g/l) na početku bolesti	Jedna vrsta terapije	49	0,30	101,00	2,05	4,70	10,05	0,608
	Jedna ili više zamjena	14	0,30	93,00	2,53	6,30	19,53	
Htc (l/l) na početku bolesti	Jedna vrsta terapije	49	0,27	0,40	0,32	0,33	0,36	0,060
	Jedna ili više zamjena	14	0,28	0,38	0,30	0,31	0,34	
L (x10 ⁹ /l) na početku bolesti	Jedna vrsta terapije	49	4,61	31,40	8,10	9,30	11,25	0,234
	Jedna ili više zamjena	14	6,90	15,10	8,90	9,70	11,60	
Trc (x10 ⁹ /l) na početku bolesti	Jedna vrsta terapije	49	171	629	329,50	412,00	464,00	0,585
	Jedna ili više zamjena	14	240	541	363,25	382,50	423,75	
Od početka bolesti do biološke terapije (mj.)	Jedna vrsta terapije	49	7	164	16,00	33,00	52,50	0,234
	Jedna ili više zamjena	14	8	111	10,50	17,00	51,50	
SE (mm/h) prije početka biološke terapije	Jedna vrsta terapije	49	2	53	6	13,00	24,50	0,063
	Jedna ili više zamjena	14	7	55	10,50	21,00	39,25	
CRP (g/l) prije početka biološke terapije	Jedna vrsta terapije	49	0,30	101,70	0,65	2,40	10,20	0,300
	Jedna ili više zamjena	14	0,30	92,90	0,68	6,45	22,63	
Htc (l/l) prije početka biološke terapije	Jedna vrsta terapije	49	0,29	0,43	0,34	0,36	0,37	0,194
	Jedna ili više zamjena	14	0,30	0,40	0,31	0,34	0,38	
L (x10 ⁹ /l) prije početka biološke terapije	Jedna vrsta terapije	49	4,10	17,60	6,65	8,40	10,30	0,203
	Jedna ili više zamjena	14	6,30	12,20	6,68	9,72	11,20	
Trc (x10 ⁹ /l) prije početka biološke terapije	Jedna vrsta terapije	49	182	536	294,50	380,00	421,00	0,747
	Jedna ili više zamjena	14	213	511	301,75	361,50	447,75	
Trajanje biološke terapije (mj.)	Jedna vrsta terapije	49	1	130	31	43,00	60,00	0,002
	Jedna ili više zamjena	14	17	137	55	79,50	105,00	

bDMARD – biološki antireumatski lijekovi koji modificiraju tijekom bolesti, CRP – C reaktivni protein, Htc – hematokrit, L – leukociti, SE – sedimentacija eritrocita, Trc – trombociti

U podskupini oboljele djece u koje je za postizanje remisije bila potrebna jedna ili više zamjena bDMARD, prvi bDMARD upotrijebljen za liječenje najčešće je bio adalimumab u 6/14 (42,9 %) te potom etanercept u 5/14 (35,7 %). Najčešći razlog promjene bDMARD u navedenoj podskupini bila je primarna neučinkovitost primijenjenog pripravka u 7/14 (50 %) oboljele djece. U najvećeg broja bolesnika za postizanje konačne remisije bila je potrebna jedna zamjena bDMARD (10/14, 71,4 %). bDMARD uz koji je najčešće postignuta konačna remisija bio je tocilizumab u 7/14 djece (50 %) (tablica 14).

Tablica 14. Broj bDMARD, bDMARD kojim je započeto liječenje, razlozi promjene bDMARD te bDMARD uz koji je postignuta konačna remisija u podskupini djece u koje remisija nije postignuta i/ili uspješno održavana inicijalnim bDMARD

		2 ili više bDMARD N = 14	
		N	%
Broj bDMARD	2	10	71,4 %
	3	2	14,3 %
	4	2	14,3 %
Inicijalni bDMARD	ADA	6	42,9 %
	ETN	5	35,7 %
	IFX	1	7,1 %
	TCZ	2	14,3 %
Razlog promjene terapije	primarna neučinkovitost	7	50,0 %
	relaps bolesti	4	28,6 %
	komplikacije (uveitis, TBC, parestezije)	3	21,4 %
bDMARD uz koji je postignuta konačna remisija	ADA	3	21,4 %
	ETN	4	28,6 %
	IFX	0	0,0 %
	TCZ	7	50,0 %

ADA – adalimumab, bDMARD – biološki antireumatski lijekovi koji modificiraju tijek bolesti, ETN – etanercept, IFX – infliksimab, MTX – metotreksat, TCZ – tocilizumab, TBC – tuberkuloza

6. RASPRAVA

Juvenilni idiopatski artritis (JIA) najčešća je kronična reumatska bolest dječje dobi koja obuhvaća heterogenu skupinu artritisa nepoznatog uzroka klasificiranih u sedam kategorija na temelju kliničkih i laboratorijskih obilježja bolesti (1, 2, 3, 18). Suvremeni pristup liječenju JIA nalaže brzo postizanje remisije kako bi se spriječile ili umanjile dugoročne posljedice (5, 6, 13, 68). Kako bi se postigao ovaj cilj nužno je što ranije otkriti pacijente kod kojih započeta terapija neće imati učinka. U drugoj liniji liječenja JIA, MTX još uvijek predstavlja najčešće korišten, siguran i povoljan antireumatski lijek koji dovodi do remisije u oko 70 % pacijenata (14, 15, 112). S obzirom na značajan udio oboljelih kod kojih MTX i nakon dulje primjene neće imati učinka, postoji interes pronalaska terapijskog biomarkera kojim bismo predvidjeli vjerojatnost povoljnog odgovora na terapiju MTX (13, 14, 15, 112, 129). Dosadašnji pokušaji identifikacije valjanog kliničkog, biokemijskog, molekularnog ili genetskog markera učinkovitosti MTX još nisu postigli željeni rezultat (13, 15, 112, 129 – 135).

Dio dosadašnjih istraživanja pokazao je da MTX inducira povećanje aktivnosti GSTs u eksperimentalnih životinja (187). U više studija opisana je povezanost polimorfizama GSTs gena (uz posljedičnu promjenu aktivnosti GSTs) s učinkovitošću pojedinih protokola liječenja koji uključuju i MTX, odnosno terapijskim ishodima u djece oboljele od autoimunskih (SLE i IBD) i tumorskih bolesti (173 – 177, 180, 181).

Osnovni demografski podaci o 109 djece oboljele od JIA uključene u ovo istraživanje, s obzirom na distribuciju prema spolu prema kojoj među oboljelom djecom dominiraju djevojčice u omjeru 2,1 : 1, gotovo su identični distribuciji prema spolu u većini istraživanja, prema kojima je bolest dva puta češća u djevojčica (3, 18). Navedeni veći udio djevojčica među oboljelim od JIA u skladu je s većim udjelom oboljelih osoba ženskog spola u većini autoimunih bolesti (3). Minimalno veći udio djevojčica u ovom istraživanju u odnosu na uobičajene podatke mogao bi se djelomično objasniti činjenicom da su u istraživanje uključeni samo bolesnici liječeni MTX, odnosno među ispitanicima nema bolesnika koji boluju od ERA (u kojih MTX u pravilu nema terapijskog učinka). Iako je udio takvih

bolesnika u populaciji djece oboljele od JIA mali (3 – 10 %), to je jedina podskupina oboljelih u kojoj dominiraju dječaci (3, 59). Kao i u većini drugih istraživanja, i u ovom istraživanju distribucija oboljelih prema spolu nije se pokazala kao prediktivni element učinkovitosti terapije MTX (12, 13).

S obzirom na dob u kojoj je bolest počela, ona je u oboljelih koji su sudjelovali u ovom istraživanju viša (prosječna dob od 5 godina i 8 mjeseci, odnosno 6 godina i 7 mjeseci prema skupinama) u odnosu na uobičajenu, najčešću dob početka JIA (3, 52, 55, 57). Navedenom je ponovno najvjerojatniji razlog uključivanje u istraživanje samo bolesnika koji su liječeni MTX. Među oboljelim od JIA inače uobičajeno dominiraju djeca s oligoartikularnim tipom bolesti, koji najčešće počinje između prve i treće godine života, a veliki dio tih bolesnika uspješno se liječi s NSAID uz intraartikularnu primjenu GK. Tek dio oboljelih u navedenoj, najbrojnijoj skupini u liječenju zahtijeva prelazak na sljedeći, viši nivo terapije odnosno primjenu MTX. Među ispitivanim skupinama bolesnika u ovom istraživanju nije nađeno statistički značajne razlike s obzirom na dob kod početka bolesti, što je u skladu s literaturnim podacima prema kojima se navedeni podatak pokazao bezvrijednim u predviđanju učinkovitosti MTX (12, 13).

Distribucija oboljele djece prema tipu JIA u ovom istraživanju (oligoartikularni tip 42,2 %, poliartrikularni RF negativni tip 46,8 %, poliartrikularni RF pozitivni tip 4,6 % i sJIA 6,4 %) drugačija je u odnosu na uobičajenu distribuciju navedenih tipova JIA u dostupnoj literaturi (oligoartikularni tip 56 do 60 %, poliartrikularni RF+ i RF– tip 25 do 30 % bolesnika, sJIA 10 do 12 %) (3, 52, 54, 55). U ovom istraživanju kao najbrojniji dominiraju bolesnici s poliartrikularnim tipom bolesti, što je s obzirom na prvi lijek izbora u liječenju tog tipa – MTX, u direktnoj vezi i s odabirom ispitanika, dok je udio bolesnika s oligoartikularnim tipom bolesti u ovom istraživanju, kako je već navedeno, niži. Udio bolesnika sa sJIA također je niži u ovom istraživanju, jer se u terapiji otprilike pola oboljelih od ovog tipa bolesti kao jedini lijek koriste sistemski GK, a u težim slučajevima i bDMARD (ANK, TCZ), dok je terapija MTX rezervirana za bolesnike s ranim znakovima artritisa u sklopu navedenog tipa bolesti. S obzirom na distribuciju oboljelih prema tipu JIA, između dvije ispitivane skupine u ovom istraživanju nije nađeno statistički značajnih razlika, što je također u skladu s literaturnim podacima

prema kojima tip JIA ne pomaže u predskazivanju učinkovitosti terapije MTX (12, 13).

Prilikom usporedbe procjene aktivnosti bolesti prema liječniku na početku bolesti i na početku liječenja MTX nije registrirano statistički značajnih razlika između skupine oboljele djece s postignutom remisijom te skupine oboljele djece bez postignute remisije tijekom terapije MTX, stoga prema rezultatima ovog istraživanja ista nema vrijednost u ranom predskazivanju učinkovitosti MTX. Navedeno je u skladu s većinom istraživanja prema kojima procjena aktivnosti bolesti prema liječniku pokazuje svoju vrijednost kao komponenta udruženih ocjena aktivnosti bolesti, a ne kao samostalna varijabla (75). Nasuprot dobivenim rezultatima, rijetki radovi ukazuju na djelomičnu vrijednost procjene aktivnosti bolesti prema liječniku u predskazivanju učinkovitosti terapije MTX (13).

Vežano uz imunološke nalaze, pozitivan nalaz ANA nađen je u nešto više ispitanika bez postignute remisije tijekom liječenja MTX (33/63, 52,4 %) u odnosu na ispitanike s postignutom remisijom tijekom liječenja MTX (17/46, 37,0 %), dok je pozitivan nalaz RF nađen u 3/46 (6,5 %) oboljele djece s postignutom remisijom tijekom liječenja MTX te u 2/63 (3,2 %) oboljele djece bez postignute remisije tijekom liječenja MTX. Veći udio pozitivnog nalaza ANA (iako bez statistički značajne razlike) u skupini djece bez postignute remisije tijekom liječenja MTX, u suprotnosti je s literaturnim podacima prema kojima pozitivan nalaz ANA ima pozitivnu predskazujuću vrijednost u određivanju učinkovitosti terapije MTX (12, 13). Budući da pozitivan nalaz ANA dominira među djecom oboljelom od oligoartikularnog tipa JIA, koji ima najbolju prognozu bolesti, ostaje otvoreno pitanje je li navedeni nalaz stvarno predskazuje učinkovitost MTX u ovom tipu bolesti, ili se radi samo o statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji bez patogenetske poveznice. Pozitivan nalaz RF, uz to što je nađen u malog broja oboljelih u ovom istraživanju kao i u većini proučavane literature (3, 52, 64), također nije poslužio u distinkciji dviju skupina ispitanika.

Pojavnost i trajanje jutarnje ukočenosti na početku bolesti ili prije početka terapije MTX također se, s obzirom na to da nije registrirano statistički značajnih razlika između ispitivanih skupina, nije pokazalo kao mogući parametar predikcije učinkovitosti MTX. S obzirom na zahvaćanje zglobova, u ovom istraživanju samo su ručni zglobovi bili statistički značajno češće zahvaćeni u skupini oboljele djece

bez postignute remisije tijekom liječenja MTX (29,0 % naprema 10,9 %; $P = 0,032$). Navedeno je u skladu s literaturnim podacima, prema kojima zahvaćenost oba ručna zgloba ima djelomičnu vrijednost u predskazivanju izostanka učinkovitosti MTX (13).

Kao dodatni element distinkcije među ispitivanim skupinama, u smislu negativne predikcije učinkovitosti MTX u liječenju JIA, u ovom istraživanju pokazao se nalaz uveitisa, koji je također statistički značajnije registriran u skupini oboljelih bez postignute remisije tijekom liječenja MTX ($P = 0,034$). Navedeni nalaz korelira s češće pozitivnim nalazom ANA (iako ne i statistički značajnim) u skupini oboljelih bez postignute remisije tijekom liječenja MTX. Vjerojatni razlog navedenom rezultatu je češći razvoj uveitisa u oboljelih s pozitivnim nalazom ANA te u vezi s tim i uvođenje bDMARD u barem dijela tih bolesnika zbog izostanka kontrole uveitisa, a ne izostanka postizanja remisije artritisa tijekom terapije MTX.

Prilikom analize razlika u promatranim kontinuiranim kliničkim i laboratorijskim vrijednostima između ispitivanih skupina s obzirom na postignutu remisiju ili izostanak remisije tijekom terapije MTX između dvije skupine nije nađeno statistički značajnih razlika u vremenu proteklom od početka bolesti do početka liječenja MTX, kao niti u nalazima SE, CRP, hematokrita, broja L i Trc na početku bolesti niti na početku liječenja MTX. Navedeno je u skladu s dostupnim literaturnim podacima, prema kojima niti jedan od navedenih parametara ne predskazuje izostanak učinkovitosti MTX u liječenju JIA (12, 13). Jedina statistički značajna razlika detektirana između skupine oboljele djece je trajanje liječenja MTX, koje je bilo statistički značajno duže u skupini koja nije postigla kliničku remisiju tijekom terapije MTX u odnosu na skupinu koja je postigla remisiju tijekom liječenja MTX s medijanom vrijednosti (interkvartilni raspon) 58,0 (37,0 – 100,0) mjeseci naprema 36,5 (24,0 – 56,5) mjeseci; $P < 0,001$. Najvjerojatniji razlog ove razlike nalazi se u najčešćoj kliničkoj praksi našeg Centra prema kojoj se blaža / umjerena ili rjeđa pogoršanja osnovne bolesti tijekom terapije MTX, pogotovo inducirana akutnim infekcijama ili traumama zahvaćenih zglobova, nastoje kupirati kraćom, sistemskom primjenom niskih doza GK ili intraartikularnim aplikacijama GK, a ne brzim uvođenjem bDMARD. Niži prag tolerancije prema ovakvim pogoršanjima osnovne bolesti u smislu promptnog uvođenja bDMARD u terapiju (koji neki pedijatrijski reumatolozi provode u praksi) u najvećoj mjeri bi poništio

navedenu razliku. S obzirom na neujednačenost prakse, još uvijek se u znanstvenim krugovima vodi rasprava oko ova dva pristupa u liječenju djece s JIA (3 – 6).

Tijekom ispitivanja je u sve oboljele djece u koje nije postignuta remisija uz liječenje MTX, ista postignuta uz liječenje bDMARD. Klinička remisija je u 49/63 (77,8 %) oboljele djece u navedenoj skupini postignuta liječenjem jednim bDMARD, dok je u 14/63 (22,2 %) oboljele djece za postizanje remisije trebala jedna ili više zamjena bDMARD. Tijekom ispitivanja remisija uz liječenje bDMARD je uspješno održavana u 56/63 (88,9 %) djece (remisija uz lijek), dok je u 7/63 (11,1 %) djece tijekom ispitivanja stabilna remisija održana i nakon prekida liječenja bDMARD (remisija bez lijeka). Ovi rezultati potvrđuju sintagmu o bDMARD kao „trećoj revoluciji u reumatologiji“ u smislu uspješne kontrole upale u većine bolesnika s upalnim reumatskim bolestima koje zahvaćaju zglobove, a u kojih prethodno primjenjena terapija nije polučila uspjeh (3).

Prilikom analize razlika u delecijским polimorfizmima gena GSTM1 i GSTT1 između ispitivanih skupina s obzirom na postignutu remisiju tijekom liječenja MTX, delecijски polimorfizam gena GSTM1 detektiran je u 63,5 % ispitanika u kojih tijekom terapije MTX nije postignuta remisija te u 58,7 % ispitanika u kojih je tijekom terapije MTX postignuta remisija. Navedena učestalost delecijskog polimorfizma GSTM1 u ispitivanim skupinama nešto je viša u odnosu na učestalost istog u općoj populaciji bijelaca i azijata koja prema literaturi iznosi oko 50 %. Delecijски polimorfizam GSTT1 detektiran je u 22,2 % ispitanika u kojih tijekom terapije MTX nije postignuta remisija te u 17,4 % ispitanika u kojih je tijekom terapije MTX postignuta remisija. Navedeni rezultat nešto je bliži pojavnosti delecijskog polimorfizma GSTT1 u bjelačkoj populaciji (10 – 20 %) u odnosu na populaciju azijata (16 – 64 %) (167, 170). Dodatno, kombinacija delecijskih polimorfizama za gene GSTM1 i GSTT1 detektirana je u 12,7 % ispitanika u kojih tijekom terapije MTX nije postignuta remisija te u 13,0 % ispitanika u kojih je tijekom terapije MTX postignuta remisija. Kako u pojavnosti delecijskih polimorfizama GSTM1 i GSTT1 i njihovoj kombinaciji u ovom istraživanju nema statistički značajne razlike između ispitivanih skupina bolesnika, navedeni ne predstavljaju distinkciju koja bi pomogla u detekciji bolesnika u kojih se neće postići remisija tijekom terapije MTX.

Dobiveni rezultati analize razlika u delecijским polimorfizmima gena GSTM1 i GSTT1 nisu u skladu hipotezom ovog istraživanja prema kojoj su isti u bolesnika s juvenilnim idiopatskim artritism povezani s većom vjerojatnošću postizanja remisije tijekom terapije MTX.

Hipoteza istraživanja je postavljena na temelju opsežnog pregleda literature koja se bavi problematikom utjecaja polimorfizama GST gena na promjenu enzimske aktivnosti GST u eksperimentalnih životinja te na pojavnost i terapijske ishode različitih malignih i imunosnih bolesti u djece i odraslih (169, 174 –179, 181 – 183, 187, 189). Kako delecijски polimorfizmi gena GST dokidaju enzimsku aktivnost pojedine GST, tako se smanjuje potencijal druge faze detoksikacije tijekom koje se u konjugirajućim reakcijama lipofilni nepolarni ksenobiotici i endobiotici konvertiraju u hidrofilne, manje toksične metabolite. Oni se potom djelovanjem transmembranskih proteina izbacuju iz stanica u međustanični prostor te eliminiraju iz organizma. Ukoliko je potencijal druge faze detoksikacije smanjen, za očekivati je da će osim eventualnog potenciranja toksičnog djelovanja pojedinih ksenobiotika, doći i do potenciranja njihova pozitivnog djelovanja u smislu boljeg terapijskog učinka kod pojedinih bolesti zbog njihove usporene eliminacije i veće bioraspoloživosti (149 – 151, 179). S druge strane, u pojedinim malignim bolestima maligne stanice pokazuju naglašenu aktivnost GST koja dovodi do rezistencije na pojedine kemoterapeutike uslijed njihove ubrzane eliminacije (188 – 190).

Iako je standardni put metabolizma i eliminacije MTX poznat, dosadašnja istraživanja nisu uspjela jednoznačno povezati polimorfizme gena čiji enzimi sudjeluju u metaboliziranju metotreksata s promjenom aktivnosti navedenih enzima niti promjenom učinkovitosti MTX u terapijskim protokolima za liječenje različitih bolesti uključujući i JIA (182, 187, 189, 190). Dodatno, u pojedinim istraživanjima na eksperimentalnim životinjama registrirano je povećanje aktivnosti GST prilikom ekspozicije MTX (187). Sve navedeno ukazuje da osim standardnog puta metaboliziranja MTX, on barem jednim dijelom podliježe i eliminaciji djelovanjem GST.

Iako bi prema svemu navedenom, inicijalno postavljena hipoteza ovim istraživanjem trebala biti potvrđena, mogući su višestruki razlozi izostanka pozitivne povezanosti delecijских polimorfizama GSTM1 i GSTT1 i učinkovitosti

MTX u postizanju remisije JIA. Prvo, iako su istraživanja na eksperimentalnim životinjama dokazala da MTX inducira pojačanu aktivnost GST iz čega proizlazi da se barem dio MTX metabolizira i djelovanjem navedenih enzima, životinjski modeli nisu idealni i na njima dobiveni rezultati ne mogu se u svim slučajevima jednoznačno preslikati na ljudske organizme. U slučajevima pozitivnog modulirajućeg učinka delecijских polimorfizama GST gena na učinkovitost terapijskih protokola koji uključuju i MTX, u obzir očigledno treba uzeti i potenciranje djelovanja i drugih ksenobiotika apliciranih u kombinaciji s MTX u svrhu liječenja pojedine bolesti. Dodatno, u ovom istraživanju analizirane su razlike u delecijским polimorfizmima GSTM1 i GSTT1 te bi isto trebalo proširiti i analizom drugih polimorfizama za GST.

U sklopu ovog istraživanja dodatno su analizirane razlike delecijских polimorfizama GSTM1 i GSTT1 gena samo u skupini djece u koje tijekom liječenja MTX nije postignuta remisija odnosno bilo je potrebno liječenje bDMARD u odnosu na broj bDMARD potrebnih za postizanje remisije (jedan bDMARD (49/63, 77,8 %) u odnosu na jednu ili više zamjena bDMARD (14/63, 22,2 %)). U podskupini oboljele djece u kojoj je za postizanje remisije bila potrebna jedna ili više zamjena bDMARD (14/63, 22,2 %) statistički je značajno zastupljeniji nalaz pozitivnog genotipa polimorfizma GSTM1: 64,3 % naprema 28,6 %; $P = 0,026$. Daljnjom usporedbom podskupine djece u kojoj je za postizanje remisije bila dostatna inicijalna terapija bDMARD i podskupine djece u kojoj je za postizanje remisije bila potrebna jedna ili više zamjena bDMARD, nije nađeno statistički značajnih razlika u distribuciji prema spolu ili dobi kod početka bolesti. Isto kao i kod MTX (12, 13), distribucija oboljelih prema spolu i dobi u našem istraživanju nije se pokazala kao prediktivni element niti učinkovitosti terapije bDMARD.

S obzirom na uspoređivane kliničke (tip JIA, zahvaćeni zglobovi, uveitis, jutarnja ukočenost na početku bolesti i prije početka biološke terapije) i laboratorijske (ANA, RF) kategorijske varijable između ispitivanih podskupina, u podskupini djece u kojoj je za postizanje remisije bila nužna jedna ili više zamjena bDMARD statistički značajno češće su detektirane upalne promjene malih zglobova šaka: 57,1 % naprema 24,5 % ($P = 0,047$) te pojavnost uveitisa: 42,9 % naprema 14,2 % ($P = 0,026$). Navedeno ne predstavlja iznenađenje u slučaju češće afekcije malih zglobova šaka budući da navedena klinička varijabla ukazuje

na poliarтикуlarnu – težu formu JIA, koja će pretpostavljeno češće zahtijevati liječenje bDMARD uključujući i moguće promjene terapije (3). U slučaju uveitisa dobiveni rezultat je manje jasan. S jedne strane njegova pojavnost primarno se povezuje s oligoartikularnim – prognostički najpovoljnijim tipom JIA. S druge strane, uveitis predstavlja često najozbiljniju i najtežu komplikaciju bolesti, koja u dijela JIA bolesnika predstavlja i indikaciju za početak bDMARD, a u ovom istraživanju u 3/14 (21,4 %) bolesnika i indikaciju za promjenu bDMARD zbog razvoja uveitisa tijekom liječenja inicijalnim bDMARD ili neučinkovitosti trenutno primjenjivanog bDMARD u kontroli uveitisa. Pri analizi razlika u promatranim kontinuiranim kliničkim i laboratorijskim vrijednostima između ispitivanih podskupina s obzirom na broj bDMARD potrebnih za postizanje remisije, jedina statistički značajna razlika detektirana je u trajanju terapije bDMARD, koje je bilo statistički značajno duže u podskupini u kojoj je za postizanje remisije bila potrebna jedna ili više zamjena bDMARD s medijanom vrijednosti (interkvartilni raspon) 79,5 (55,0 – 105,0) mjeseci naprema 43,0 (31,0 – 60,0) mjeseci; $P = 0,002$. Navedeni rezultat je logičan, s obzirom da se pri svakoj promjeni bDMARD tijekom liječenja prolongira vrijeme za ispunjavanje kriterija remisije (7).

U podskupini oboljele djece u koje je za postizanje remisije bila potrebna jedna ili više zamjena bDMARD, prvi bDMARD upotrijebljen za liječenje najčešće je bio adalimumab u 6/14 (42,9 %) te potom etanercept u 5/14 (35,7 %) djece, što je u skladu s literaturnim podacima o liječenju JIA upotrebom bDMARD (3). Najčešći razlog promjene bDMARD u navedenoj podskupini bila je primarna neučinkovitost primijenjenog pripravka u 7/14 (50 %) oboljele djece, a slijede relaps bolesti u 4/7 (28,6 %) i komplikacije (uveitis, TBC, parestezije) zbog ili tijekom primjene bDMARD u 3/14 (21,4 %) djece. U 10/14 (71,4 %) oboljele djece za postizanje konačne remisije bila je potrebna jedna zamjena bDMARD, dok je u 2/14 (14,3 %) djece postignuta nakon druge te u istom postotku nakon treće promjene bDMARD. bDMARD uz koji je najčešće postignuta konačna remisija bio je tocilizumab u 7/14 djece (50 %). Posljednji podatak u našem istraživanju posebno je zanimljiv jer je TCZ anti IL-6 pripravak te se u liječenju JIA primjenjuje kao monoterapija, bez konkomitantne primjene MTX. Svi navedeni, dodatni podaci ukazuju na mogući učinak polimorfizama GSTs na složene mehanizme apsorpcije, distribucije, metabolizma i izlučivanja anti-TNF (118) kao i njihovih interakcija s

drugim lijekovima (posebno MTX) i enzimskim mehanizmima (npr. citokrom P450) (91).

Rezultati dobiveni dodatnom analizom varijabli vezanih uz podskupine djece u kojima je za postizanja remisije bilo potrebno provesti liječenje jednim ili većim brojem bDMARD nemaju direktne veze s hipotezom niti ciljevima ovog istraživanja, ali otvaraju nove horizonte u daljnjim istraživanjima utjecaja polimorfizama GSTs na ishode liječenja JIA i drugih reumatskih bolesti.

7. ZAKLJUČCI

1. Prilikom određivanja delecijских polimorfizama gena GSTM1 i GSTT1 u skupinama djece oboljele od JIA, delecijски polimorfizam gena GSTM1 je detektiran u 63,5 % ispitanika u kojih tijekom terapije MTX nije postignuta remisija te u 58,7 % ispitanika u kojih je tijekom terapije MTX postignuta remisija, a delecijски polimorfizam GSTT1 je detektiran u 22,2 % ispitanika u kojih tijekom terapije MTX nije postignuta remisija te u 17,4 % ispitanika u kojih je tijekom terapije MTX postignuta remisija.

2. Prilikom analize učestalosti delecijских polimorfizama gena GSTM1 i GSTT1 u skupinama djece oboljele od JIA s obzirom na postignutu remisiju tijekom liječenja MTX, u ovom istraživanju nije nađeno statistički značajne razlike između ispitivanih skupina bolesnika.

3. Određivanje delecijских polimorfizama gena za GSTM1 i GSTT1 prema ovom istraživanju ne pomaže u detekciji djece oboljele od JIA u koje se neće postići remisija tijekom terapije MTX.

4. Kao elementi negativne predikcije učinkovitosti MTX u liječenju djece oboljele od JIA potvrđena je od ranije poznata upala ručnih zglobova te duže trajanje terapije MTX. Kao dodatni element negativne predikcije učinkovitosti MTX u liječenju JIA detektiran je kronični uveitis u sklopu osnovne bolesti.

5. U sklopu ovog istraživanja dodatno su analizirane razlike delecijских polimorfizama gena GSTM1 i GSTT1 samo u skupini djece u koje tijekom istraživanja zbog neučinkovitosti MTX započeto liječenje bDMARD u odnosu na broj bDMARD potrebnih za postizanje remisije. U podskupini oboljele djece u kojoj je za postizanje remisije bila potrebna jedna ili više zamjena bDMARD statistički je značajno zastupljeniji nalaz pozitivnog genotipa polimorfizma GSTM1. S obzirom na kompleksnost apsorpcije, distribucije, metabolizma i ekskrecije bDMARD kao i njihove složene interakcije s drugim endogenim i egzogenim molekulama te

enzimskim sustavima, dobiveni rezultat, iako nema direktne veze s hipotezom niti ciljevima ovog istraživanja, otvara nove horizonte u daljnjim istraživanjima polimorfizama gena GSTs u sklopu JIA i drugih upalnih reumatskih bolesti.

Polimorfizmi gena za glutacion S-transferazu
kao rani predskazatelj učinkovitosti metotreksata
u liječenju juvenilnog idiopatskog artritisa

Uvod: Juvenilni idiopatski artritis (JIA) najčešća je reumatska bolest dječje dobi. Rana kontrola upalnog procesa u JIA korelira s povoljnijim ishodima liječenja. Odgovor na primjenu metotreksata (MTX), prvog lijeka druge linije liječenja djece s JIA je heterogen, s udjelom većim od 30 % djece u koje navedeni lijek nema učinka u smislu postizanja remisije. Kako je za procjenu učinka MTX nužan period od 3 do 6 mjeseci kontinuirane primjene, u djece u koje navedeni lijek neće djelovati gubi se mogućnost ranog postizanja remisije, odnosno smanjuje vjerojatnost povoljnog ishoda liječenja. Cilj rada bio je istražiti vrijednost određivanja delecijjskih polimorfizama GSTM1 i GSTT1 kao predskazatelja učinkovitosti MTX u liječenju JIA.

Ispitanici i metode: U istraživanje je uključeno 109 JIA bolesnika: 46 bolesnika u kojih je tijekom terapije MTX postignuta stabilna klinička remisija u trajanju od minimalno 6 mjeseci i 63 bolesnika u kojih tijekom liječenja metotreksatom nije postignuta stabilna klinička remisija. U svih bolesnika uključenih u studiju određeni su delecijjski polimorfizmi gena GSTM1 i GSTT1.

Rezultati: Između ispitivanih skupina JIA bolesnika nije nađeno statistički značajnih razlika u raspodjeli pojedinih delecijjskih polimorfizama gena GSTM1 i GSTT1. Delecijjski polimorfizam gena GSTM1 detektiran je u 40/63 (63,5 %) ispitanika u kojih tijekom terapije MTX nije postignuta remisija te u 27/46 (58,7 %) ispitanika u kojih je tijekom terapije MTX postignuta remisija. Delecijjski polimorfizam gena GSTT1 detektiran je u 14/63 (22,2 %) ispitanika u kojih tijekom terapije MTX nije postignuta remisija te u 8/46 (17,4 %) ispitanika u kojih je tijekom terapije MTX postignuta remisija. Kombinacija delecijjskih polimorfizama gena GSTM1 i GSTT1 detektirana je u 8/63 (12,7 %) ispitanika u kojih tijekom terapije MTX nije postignuta remisija te u 6/46 (13,0 %) ispitanika u kojih je tijekom terapije

MTX postignuta remisija. Nije nađeno statistički značajnih razlika u raspodjeli pojedinih delecijских polimorfizama niti njihove kombinacije između ispitivanih skupina.

Dodatno su analizirane razlike delecijских polimorfizama gena GSTM1 i GSTT1 u skupini djece u koje tijekom liječenja MTX nije postignuta remisija, odnosno u koje je bilo potrebno liječenje bDMARD u odnosu na broj bDMARD potrebnih za postizanje remisije. U podskupini oboljele djece u kojoj je za postizanje remisije bila potrebna jedna ili više zamjena bDMARD u odnosu na podskupinu djece u kojoj je za postizanje remisije bio dostatan jedan bDMARD, statistički je značajno zastupljeniji nalaz pozitivnog genotipa polimorfizma gena GSTM1: 64,3 % naprema 28,6 %; $P = 0,026$.

Zaključak: Određivanje delecijских polimorfizama gena GSTM1 i GSTT1 prema ovom istraživanju ne pomaže u detekciji djece oboljele od JIA u koje se neće postići remisija tijekom terapije MTX. No, statistički značajno češća pojavnost pozitivnog genotipa polimorfizma gena GSTM1 u podskupini oboljele djece u kojoj je za postizanje remisije bila potrebna jedna ili više zamjena bDMARD u odnosu na skupinu djece u koje je remisija postignuta jednim bDMARD, otvara nove horizonte u istraživanjima polimorfizama gena GSTs u sklopu JIA i drugih upalnih reumatskih bolesti.

Glutathione S-transferase gene polymorphisms
as an early predictor of methotrexate effectiveness
in the treatment of juvenile idiopathic arthritis

Sanda Huljev Frković

PhD Thesis 2022

Introduction: Juvenile idiopathic arthritis (JIA) is the most common rheumatic disease of childhood. Early control of the inflammatory process in JIA correlates with more favourable treatment outcomes. The effectiveness of the MTX, the first-line drug in JIA treatment is heterogeneous, with a proportion of more than 30% of children without effect in terms of achieving remission. Since an assessment of the MTX effects requires a period of 3–6 months of continuous administration, in more than 30% of children the possibility of early remission and favourable outcome of treatment is reduced. The aim of the research was to investigate the value of the determination of GSTM1 and GSTT1 genes deletion polymorphisms as the predictor of the MTX treatment effectiveness in JIA patients.

Subjects and methods: The study included 109 JIA patients: 46 patients who had achieved stable clinical remission for a minimum of 6 months during MTX therapy and 63 patients who did not achieve stable clinical remission during MTX therapy. In all patients enrolled in the study, the deletion polymorphisms of the GSTM1 and GSTT1 genes were determined.

Results: No statistically significant differences in the distribution of deletion polymorphisms were found between the JIA patient study groups. Deletion polymorphism of the GSTM1 gene was detected in 40/63 (63.5%) subjects who did not achieve remission during MTX therapy and 27/46 (58.7%) subjects who achieved remission during MTX therapy. Deletion polymorphism of the GSTT1 gene was detected in 14/63 (22.2%) subjects in whom remission was not achieved

during MTX therapy and in 8/46 (17.4%) subjects in whom remission was achieved during MTX therapy. The combination of deletion polymorphisms for the GSTM1 and GSTT1 genes was detected in 8/63 (12.7%) subjects in whom remission was not achieved during MTX therapy and in 6/46 (13.0%) subjects in whom remission was achieved during MTX therapy. No statistically significant differences were found in the distribution of deletion polymorphisms or their combinations between the investigated groups.

The differences between the deletion polymorphisms of the GSTM1 and GSTT1 genes in the group of children in whom remission was not achieved during MTX therapy were further analyzed. In a subgroup of affected children in which one or more bDMARD changes were needed to achieve remission, positive genotype GSTM1 gene polymorphism was statistically significantly more frequently detected: 64.3% to 28.6%; $P = 0.026$.

Conclusion: According to this study, the determination of GSTM1 and GSTT1 gene deletion polymorphisms does not help in the distinction of JIA patients who will not achieve remission during MTX therapy. However, the statistically significantly more frequent occurrence of positive polymorphism of GSTM1 gene in a subgroup of children in which one or more changes of bDMARD were needed to achieve remission compared with the subgroup of children in whom remission was achieved by initial bDMARD, opens new horizons in GST gene polymorphism research in JIA and other inflammatory rheumatic diseases.

10. LITERATURA

1. Petty RE, Southwood TR, Baum J, Bhattay E, Glass DN, Manners P i sur. Revision of the proposed classification criteria for juvenile idiopathic arthritis: Durban, 1997. *J Rheumatol.* 1998;25:1991-4.
2. Petty RE, Southwood TR, Manners P, Baum J, Glass DN, Goldenberg J i sur. International League of Associations for rheumatology classification of juvenile idiopathic arthritis: second revision, Edmonton, 2001. *J Rheumatol.* 2004;31:390–2.
3. Jelušić M. Juvenilni idiopatski artritis. U: Jelušić M, Malčić I i sur. *Pedijatrijska reumatologija*. 1. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2014, str. 160 – 81.
4. Giancane G, Alongi A, Ravelli A. Update on the pathogenesis and treatment of juvenile idiopathic arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2017;29:523-9.
5. Ringold S, Angeles-Han ST, Beukelman T, Lovell D, Cuello CA, Becker ML i sur. 2019 American College of Rheumatology/Arthritis Foundation Guideline for the Treatment of Juvenile Idiopathic Arthritis: Therapeutic Approaches for Non-Systemic Polyarthritis, Sacroiliitis, and Enthesitis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2019;71:717-34.
6. Ringold S, Weiss PF, Beukelman T, Dewitt EM, Ilowite NT, Kimura Y i sur. 2013 update of the 2011 American College of Rheumatology recommendations for the treatment of juvenile idiopathic arthritis: recommendations for the medical therapy of children with systemic juvenile idiopathic arthritis and tuberculosis screening among children receiving biologic medications. *Arthritis Rheum.* 2013;65:2499-512.
7. Wallace CA, Ruperto N, Giannini E. Childhood Arthritis and Rheumatology Research Alliance; Pediatric Rheumatology International Trials Organisation; Pediatric Rheumatology Collaborative Study Group. Preliminary criteria for clinical remission for select categories of juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol.* 2004;31:2290-4.
8. Wallace CA, Giannini EH, Huang B, Itert L, Ruperto N. American College of Rheumatology Provisional Criteria for Defining Clinical Inactive Disease in

- Selected Categories of Juvenile Idiopathic Arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2011;63:929-36.
9. Consolaro A, Bracciolini G, Ruperto N, Pistorio A, Magni-Manzoni S, Malattia C i sur. Remission, Minimal Disease Activity, and Acceptable Symptom state in Juvenile Idiopathic Arthritis. *Arthritis Rheum*. 2012;64:2366-74.
 10. Pastore S, Stocco G, Moressa V, Zandonà L, Favretto D, Malusà N i sur. 5-Aminoimidazole-4-carboxiamide ribonucleotide-transformylase and inosine-triphosphate-pyrophosphatase genes variants predict remission rate during methotrexate therapy in patients with juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatol Int*. 2015;35:619-27.
 11. Wallace CA. The use of methotrexate in childhood rheumatic diseases. *Arthritis Rheum*. 1998;41:381-91.
 12. Albarouni M, Becker I, Horneff G. Predictors of response to methotrexate in juvenile idiopathic arthritis. *Pediatr Rheumatol Online J*. 2014;12:35.
 13. van Dijkhuizen EH, Wulffraat NM. Prediction of methotrexate efficacy and adverse events in patients with juvenile idiopathic arthritis: a systematic literature review. *Pediatr Rheumatol Online J*. 2014;12:51.
 14. Pastore S, Stocco G, Favretto D, De Iudicibus S, Taddio A, d'Adamo P i sur. Genetic determinant for methotrexate response in juvenile idiopathic arthritis. *Front Pharmacol*. 2015;6:52.
 15. Danila MI, Hughes LB, Brown EE, Morgan SL, Baggott JE, Arnett DK i sur. Measurement of Erythrocyte Methotrexate Polyglutamate Levels: Ready for Clinical Use in Rheumatoid Arthritis? *Curr Rheumatol Rep*. 2010;12:342-7.
 16. Thierry S, Fautrel B, Lemelle I, Guillemin F. Prevalence and incidence of juvenile idiopathic arthritis: A systematic review. *Joint Bone Spine*. 2014;81:112-7.
 17. Manners PJ, Bower C. Worldwide prevalence of juvenile arthritis: why does it vary so much? *J Rheumatol*. 2002;29:1520–30.
 18. Berthold E, Månsson B, Kahn R. Outcome in juvenile idiopathic arthritis: a population-based study from Sweden. *Arthritis Res Ther*. 2019;21:218.
 19. Riise ØR, Handeland KS, Cvancarova M, Wathne KO, Nakstad B, Abrahamsen TG i sur. Incidence and characteristics of arthritis in Norwegian children: a population-based study. *Pediatrics*. 2008;121:299–306.

20. Modesto C, Anton J, Rodriguez B, Bou R, Arnal C, Ros J i sur. Incidence and prevalence of juvenile idiopathic arthritis in Catalonia (Spain). *Scand J Rheumatol.* 2010;39:472–9.
21. Danner S, Sordet C, Terzic J, Donato L, Velten M, Fischbach M i sur. Epidemiology of juvenile idiopathic arthritis in Alsace, France. *J Rheumatol.* 2006;33:1377–81.
22. Andersson Gare B. Juvenile arthritis - who gets it, where and when? A review of current data on incidence and prevalence. *Clin Exp Rheumatol.* 1999;17:367-74.
23. Prakken B, Albani S, Martini A. Juvenile idiopathic arthritis. *Lancet.* 2011; 377:2138–49.
24. Pahalad S, Glass DN. A comprehensive review of the genetics of juvenile idiopathic arthritis. *Pediatr Rheumatol Online J.* 2008;6:11.
25. Pahalad S, McCracken CE, Ponder LA, Angeles-Han ST, Rouster Stevens KA, Vogler LB i sur. Familial autoimmunity in the Childhood Arthritis and Rheumatology Research Alliance registry. *Pediatr Rheumatol Online J.* 2016;14:14.
26. Hinks A, Bowes J, Cobb J, Ainsworth HC, Marion MC, Comeau ME i sur. Fine-mapping the MHC locus in juvenile idiopathic arthritis (JIA) reveals genetic heterogeneity corresponding to distinct adult inflammatory arthritic diseases. *Ann Rheum Dis.* 2017;76:765-72.
27. Ombrello MJ, Arthur VL, Remmers EF, Hinks A, Tachmazidou I, Grom AA i sur. Genetic architecture distinguishes systemic juvenile idiopathic arthritis from other forms of juvenile idiopathic arthritis: clinical and therapeutic implications. *Ann Rheum Dis.* 2017;76:906-13.
28. Thompson SD, Marion MC, Sudman M, Ryan M, Tsoras M, Howard TD i sur. Genome-wide association analysis of juvenile idiopathic arthritis identifies a new susceptibility locus at chromosomal region 3q13. *Arthritis Rheum.* 2012;64:2781-91.
29. Albers HM, Reinards TH, Brinkman DM, Kamphuis SS, van Rossum MA, Hoppenreijns EP i sur. Genetic variation in VTCN1 (B7-H4) is associated with course of disease in juvenile idiopathic arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2014;73:1198-201.

30. Hinks A, Cobb J, Marion MC, Prahalad S, Sudman M, Bowes J i sur. Dense genotyping of immune-related disease regions identifies 14 new susceptibility loci for juvenile idiopathic arthritis. *Nat Genet.* 2013;45:664–9.
31. Finkel TH, Li J, Wei Z, Wang W, Zhang H, Behrens EM i sur. Variants in CXCR4 associate with juvenile idiopathic arthritis susceptibility. *BMC Med Genet.* 2016;17:24.
32. Salmond RJ, Brownlie RJ, Zamoyska R. Multifunctional roles of the autoimmune disease-associated tyrosine phosphatase PTPN22 in regulating T cell homeostasis. *Cell Cycle.* 2015;14:705-11.
33. Li YR, Li J, Zhao SD, Bradfield JP, Mentch FD, Maggadottir SM i sur. Meta-analysis of shared genetic architecture across ten pediatric autoimmune diseases. *Nat Med.* 2015;21:1018-27.
34. Thompson SD, Sudman M, Ramos PS, Marion MC, Ryan M, Tsoras M i sur. The susceptibility loci juvenile idiopathic arthritis shares with other autoimmune diseases extend to PTPN2, COG6, and ANGPT1. *Arthritis Rheum.* 2010;62:3265-76.
35. Hou X, Qu H, Zhang S, Qi X, Hakonarson H, Xia Q i sur. The Multi-Omics Architecture of Juvenile Idiopathic Arthritis. *Cells.* 2020;9:2301.
36. Moncrieffe H, Prahalad S, Thompson SD. Genetics of JIA: New tools bring new approaches. *Curr Opin Rheumatol.* 2014; 26: 579–84.
37. Wong L, Jiang K, Chen Y, Jarvis JN. Genetic insights into juvenile idiopathic arthritis derived from deep whole genome sequencing. *Sci Rep.* 2017;7:2657.
38. Selvestrel D, Lucafò M, Pugnetti L, Pagarin S, Moressa V, Pastore S i sur. Responses of patients with juvenile idiopathic arthritis to methotrexate: a genomic outlook. *Expert Rev Clin Immunol.* 2021;17:1131-42.
39. Wei K, Jiang P, Zhao J, Jin Y, Zhang R, Chang C i sur. Biomarkers to Predict DMARDs Efficacy and Adverse Effect in Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol.* 2022;13:865267.
40. Horton DB, Shenoi S. Review of environmental factors and juvenile idiopathic arthritis. *Open Access Rheumatol.* 2019;11:253-67.
41. Vieira Borba V, Sharif K, Shoenfeld Y. Breastfeeding and autoimmunity: programming health from the beginning. *Am J Reprod Immunol.* 2018;79: E pub 2017 Oct 30.

42. Rook GA. Hygiene hypothesis and autoimmune diseases. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2012;42:5–15.
43. Rosenbaum JT, Davey MP. Time for a gut check: evidence for the hypothesis that HLA-B27 predisposes to ankylosing spondylitis by altering the microbiome. *Arthritis Rheum.* 2011;63:3195–8.
44. Sandall J, Tribe RM, Avery L, Mola G, Visser GH, Homer CS i sur. Short-term and long-term effects of caesarean section on the health of women and children. *Lancet.* 2018;392:1349–57.
45. Majumder S, Aggarwal A. Juvenile idiopathic arthritis and the gut microbiome: Where are we now? *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2019;33:101496.
46. de Jager W, Hoppenreijns EP, Wulffraat NM, Wedderburn LR, Kuis W, Prakken BJ. Blood and synovial fluid cytokine signatures in patients with juvenile idiopathic arthritis: a cross-sectional study. *Ann Rheum Dis.* 2007;66:589-98.
47. Ruprecht CR, Gattorno M, Ferlito F, Gregorio A, Martini A, Lanzavecchia A i sur. Coexpression of CD25 and CD27 identifies FoxP3+ regulatory T cells in inflamed synovia. *J Exp Med.* 2005;201:1793-803.
48. Rossetti M, Spreafico R, Consolaro A, Leong JY, Chua C, Massa M i sur. TCR repertoire sequencing identifies synovial Treg cell clonotypes in the bloodstream during active inflammation in human arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2017;76:435-41.
49. Mahendra A, Misra R, Aggarwal A. Th1 and Th17 Predominance in the Enthesitis-related Arthritis Form of Juvenile Idiopathic Arthritis. *J Rheumatol.* 2009;36:1730-6.
50. Swart JF, de Roock S, Prakken BJ. Understanding inflammation in juvenile idiopathic arthritis: How immune biomarkers guide clinical strategies in the systemic onset subtype. *Eur J Immunol.* 2016;46:2068-77.
51. Yasin S, Fall N, Brown RA, Henderlight M, Canna SW, Girard-Guyonvarc'h C i sur. IL-18 as a biomarker linking systemic juvenile idiopathic arthritis and macrophage activation syndrome. *Rheumatology (Oxford).* 2020;59:361-6.
52. Crayne CB, Beukelman T. Juvenile Idiopathic Arthritis: Oligoarthritis and Polyarthritis. *Pediatr Clin North Am.* 2018;65:657-74.

53. Castagna I, Roszkowska AM, Alessandrello F, Oliverio GW, Tumminello G, Gallizzi R i sur. Juvenile idiopathic arthritis-associated uveitis: a retrospective analysis from a centre of South Italy. *Int Ophthalmol.* 2020;40:335-42.
54. Martini A, Lovell DJ, Albani S, Brunner HI, Hyrich KL, Thompson SD i sur. Juvenile idiopathic arthritis. *Nat Rev Dis Primers.* 2022;8:5.
55. Shenoi S, Wallace CA. Diagnosis and Treatment of Systemic Juvenile Idiopathic Arthritis. *J Pediatr.* 2016;177:19-26.
56. Boyarchuk O, Kovalchuk T, Kovalchuk N, Chubata O. Clinical variability of the systemic juvenile idiopathic arthritis course: literature review based on case series. *Reumatologia.* 2020;58:436-43.
57. Stoll ML, Punaro M. Psoriatic juvenile idiopathic arthritis: a tale of two subgroups. *Curr Opin Rheumatol.* 2011;23:437-43.
58. Stoll ML, Mellins ED. Psoriatic arthritis in childhood: A commentary on the controversy. *Clin Immunol.* 2020;214:108396.
59. Mistry RR, Patro P, Agarwal V, Misra DP. Enthesitis-related arthritis: current perspectives. *Open Access Rheumatol.* 2019;11:19-31.
60. Higgins GC. Complications of Treatments for Pediatric Rheumatic Diseases. *Pediatr Clin North Am.* 2018;65:827-54.
61. An Q, Jin MW, An XJ, Xu SM, Wang L. Macrophage activation syndrome as a complication of juvenile rheumatoid arthritis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2017;21:4322-6.
62. Ravelli A, Minoia F, Davì S, Horne A, Bovis F, Pistorio A i sur. Paediatric Rheumatology International Trials Organisation; Childhood Arthritis and Rheumatology Research Alliance; Pediatric Rheumatology Collaborative Study Group; Histiocyte Society. 2016 Classification Criteria for Macrophage Activation Syndrome Complicating Systemic Juvenile Idiopathic Arthritis: A European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology/Paediatric Rheumatology International Trials Organisation Collaborative Initiative. *Arthritis Rheumatol.* 2016;68:566-76.
63. Weiss PF, Colbert RA. Juvenile Spondyloarthritis: A Distinct Form of Juvenile Arthritis. *Pediatr Clin North Am.* 2018;65:675-90.
64. Viswanathan V, Murray KJ. Management of Children with Juvenile Idiopathic Arthritis. *Indian J Pediatr.* 2016;83:63-70.

65. Conrad K, Röber N, Andrade LE, Mahler M. The Clinical Relevance of Anti-DFS70 Autoantibodies. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2017;52:202-16.
66. Mahler M, Andrade LE, Casiano CA, Malyavantham K, Fritzler MJ. Anti-DFS70 antibodies: an update on our current understanding and their clinical usefulness. *Expert Rev Clin Immunol*. 2019;15:241-50.
67. Tadiotto E, Mansoldo C, Bellisola G, Caldonazzi F, Aiello G, Melotti G i sur. Anti-DFS70 autoantibodies, juvenile idiopathic arthritis (JIA) and uveitis: are anti-DFS70 a predictive marker of uveitis risk in JIA patients? *Ann. Rheum. Dis*. 2020;79:1794-5.
68. Giancane G, Consolaro A, Lanni S, Davì S, Schiappapietra B, Ravelli A. Juvenile Idiopathic Arthritis: Diagnosis and Treatment. *Rheumatol Ther*. 2016;3:187-207.
69. Basra HAS, Humphries PD. Juvenile idiopathic arthritis: what is the utility of ultrasound? *Br J Radiol*. 2017;90:20160920.
70. Ravelli A. The time has come to include assessment of radiographic progression in juvenile idiopathic arthritis clinical trials. *J Rheumatol*. 2008;35:553–7.
71. Pedersen TK, Kuseler A, Gelineck J, Herlin T. A prospective study of magnetic resonance and radiographic imaging in relation to symptoms and clinical findings of the temporomandibular joint in children with juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol*. 2008;35:1668–75.
72. Roth J, Bechtold S, Borte G, Dressler F, Girschick HJ, Borte M. Osteoporosis in juvenile idiopathic arthritis--a practical approach to diagnosis and therapy. *Eur J Pediatr*. 2007;166:775-84.
73. Passo MH, Taylor J. Quality improvement in pediatric rheumatology: what do we need to do? *Curr Opin Rheumatol*. 2008;20:625–30.
74. Filocamo G, Consolaro A, Solari N, Palmisani E, Dalprà S, Suffia C i sur. Recent advances in quantitative assessment of juvenile idiopathic arthritis. *Ann Paediatr Rheumatol*. 2012;1:84–96.
75. Consolaro A, Ruperto N, Bazso A, Pistorio A, Magni-Manzoni S, Filocamo G i sur. Development and validation of a composite disease activity score for juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum*. 2009;61:658–66.

76. Consolaro A, Giancane G, Schiappapietra B, Davì S, Calandra S, Lanni S i sur. Clinical outcome measures in juvenile idiopathic arthritis. *Pediatr Rheumatol Online J.* 2016;14:23.
77. Nordal EB, Zak M, Aalto K, Berntson L, Fasth A, Herlin T i sur. Validity and predictive ability of the juvenile arthritis disease activity score based on CRP versus ESR in a Nordic population-based setting. *Ann Rheum Dis.* 2012;71:1122–7.
78. McErlane F, Beresford MW, Baidam EM, Chieng SE, Davidson JE, Foster HE i sur. Childhood Arthritis Prospective Study (CAPS). Validity of a three-variable Juvenile Arthritis Disease Activity Score in children with new-onset juvenile idiopathic arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2013;72:1983–8.
79. Weiss PF, Colbert RA, Xiao R, Feudtner C, Beukelman T, DeWitt EM i sur. Development and retrospective validation of the juvenile spondyloarthritis disease activity index. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2014;66:1775–82.
80. Aletaha D, Ward MM, Machold KP, Nell VP, Stamm T, Smolen JS. Remission and active disease in rheumatoid arthritis: defining criteria for disease activity states. *Arthritis Rheum.* 2005;52:2625–36.
81. Berard R, Laxer RM. Improving the quality of care in children with juvenile idiopathic arthritis: a step in the right direction. *J Rheumatol.* 2011;38:789–90.
82. Filocamo G, Consolaro A, Schiappapietra B, Dalprà S, Lattanzi B, Magni-Manzoni S i sur. A new approach to clinical care of juvenile idiopathic arthritis: the Juvenile Arthritis Multidimensional Assessment Report. *J Rheumatol.* 2011;38:938–53.
83. Magni-Manzoni S, Ruperto N, Pistorio A, Sala E, Solari N, Palmisani E i sur. Development and validation of a preliminary definition of minimal disease activity in patients with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.* 2008;59:1120–7.
84. Wells G, Boers M, Shea B, Anderson J, Felson D, Johnson K i sur. MCID/Low Disease Activity State Workshop: low disease activity state in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2003;30:1110–1.
85. Ravelli A, Consolaro A, Horneff G, Laxer RM, Lovell DJ, Wulffraat NM i sur. Treating juvenile idiopathic arthritis to target: recommendations of an international task force. *Ann Rheum Dis.* 2018; 77:819-28.

86. Wallace CA. Current management of juvenile idiopathic arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2006;20:279-300.
87. Kerrigan SA, McInnes IB. JAK Inhibitors in Rheumatology: Implications for Paediatric Syndromes? *Curr Rheumatol Rep*. 2018;20:83.
88. Lanni S, Bertamino M, Consolaro A, Pistorio A, Magni-Manzoni S, Galasso R i sur. Outcome and predicting factors of single and multiple intra-articular corticosteroid injections in children with juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2011;50:1627-34.
89. Habib GS, Saliba W, Nashashibi M. Local effects of intra-articular corticosteroids. *Clin Rheumatol*. 2010;29:347-56.
90. Hamuro LL, Kishnani NS. Metabolism of biologics: biotherapeutic proteins. *Bioanalysis*. 2012;4:189-95.
91. Ezan E. Pharmacokinetic studies of protein drugs: past, present and future. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65:1065-73.
92. Tornero-Molina J, Alperi-López M, Castellví I, de Agustín-de Oro JJ, Escudero A, García-Vicuña R i sur. Experts document on methotrexate use in combined therapy with biological or targeted synthetic disease modifying drugs in patients with rheumatoid arthritis. *Reumatol Clin (Engl Ed)*. 2020:S1699-258X(20)30200-X. English, Spanish.
93. Clarke SLN, Ramanan AV. Tofacitinib in juvenile idiopathic arthritis. *Lancet*. 2021;398:1943-5.
94. Packham JC, Hall MA. Long-term follow-up of 246 adults with juvenile idiopathic arthritis: functional outcome. *Rheumatology (Oxford)*. 2002;41:1428-35.
95. Glerup M, Herlin T, Twilt M. Clinical outcome and long-term remission in JIA. *Curr Rheumatol Rep*. 2017;19:75.
96. Glerup M, Rypdal V, Arnstad ED, Ekelund M, Peltoniemi S, Aalto K i sur. Nordic Study Group of Pediatric Rheumatology. Long-Term Outcomes in Juvenile Idiopathic Arthritis: Eighteen Years of Follow-Up in the Population-Based Nordic Juvenile Idiopathic Arthritis Cohort. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2020;72:507-16.
97. Friedman B, Cronstein B. Methotrexate mechanism in treatment of rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*. 2019;86:301-7.

98. Chan ES, Cronstein BN. Methotrexate--how does it really work? *Nat Rev Rheumatol.* 2010;6:175-8.
99. Marks M, Marks JL. Viral arthritis. *Clin Med (Lond).* 2016;16:129-34.
100. Tian H, Cronstein BN. Understanding the mechanisms of action of methotrexate: implications for the treatment of rheumatoid arthritis. *Bull NYU Hosp Jt Dis.* 2007;65:168-73.
101. Farber S, Diamond LK. Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid. *N Engl J Med.* 1948; 238:787-93.
102. Gubner R, August S, Ginsberg V. Therapeutic suppression of tissue reactivity. II. Effect of aminopterin in rheumatoid arthritis and psoriasis. *Am J Med Sci.* 1951;221:176-82.
103. Weinblatt ME, Coblyn JS, Fox DA, Fraser PA, Holdsworth DE, Glass DN i sur. Efficacy of low-dose methotrexate in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 1985;312:818-22.
104. Bedoui Y, Guillot X, Sélambarom J, Guiraud P, Giry C, Jaffar-Bandjee MC i sur. Methotrexate an Old Drug with New Tricks. *Int J Mol Sci.* 2019;20:5023.
105. Tambić-Bukovac L, Malčić I, Prohić A. [Personal experience with methotrexate in the treatment of idiopathic juvenile arthritis]. *Reumatizam.* 2002;49:20-4. Croatian.
106. Hoekstra M, Haagsma C, Neef C, Proost J, Knuif A, van de Laar M. Bioavailability of higher dose methotrexate comparing oral and subcutaneous administration in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2004;31:645-8.
107. Schiff MH, Jaffe JS, Freundlich B. Head-to-head, randomised, crossover study of oral versus subcutaneous methotrexate in patients with rheumatoid arthritis: drug-exposure limitations of oral methotrexate at doses ≥ 15 mg may be overcome with subcutaneous administration. *Ann Rheum Dis.* 2014;73:1549-51.
108. Tuková J, Chládek J, Nemcová D, Chládková J, Dolezalová P. Methotrexate bioavailability after oral and subcutaneous administration in children with juvenile idiopathic arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2009;27:1047-53.

109. Alsufyani K, Ortiz-Alvarez O, Cabral DA, Tucker LB, Petty RE, Malleson PN. The role of subcutaneous administration of methotrexate in children with juvenile idiopathic arthritis who have failed oral methotrexate. *J Rheumatol.* 2004;31:179-82.
110. Žuber Z, Turowska-Heydel D, Sobczyk M, Banach-Górnicka M, Rusnak K, Piszczek A i sur. Methotrexate efficacy and tolerability after switching from oral to subcutaneous route of administration in juvenile idiopathic arthritis. *Reumatologia.* 2016;54:19-23.
111. Herman RA, Veng-Pedersen P, Hoffman J, Koehnke R, Furst DE. Pharmacokinetics of low-dose methotrexate in rheumatoid arthritis patients. *J Pharm Sci.* 1989;78:165-71.
112. Bulatović M, Heijstek MW, Verkaaik M, van Dijkhuizen EH, Armbrust W, Hoppenreijns EP i sur. High prevalence of methotrexate intolerance in juvenile idiopathic arthritis: development and validation of a methotrexate intolerance severity score. *Arthritis Rheum.* 2011;63:2007-13.
113. Desmoulin SK, Hou Z, Gangjee A, Matherly LH. The human proton-coupled folate transporter: Biology and therapeutic applications to cancer. *Cancer Biol Ther.* 2012;13:1355-73.
114. Grim J, Chládek J, Martínková J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of methotrexate in non-neoplastic diseases. *Clin Pharmacokinet.* 2003;42:139-51.
115. Stamp LK, O'Donnell JL, Chapman PT, Zhang M, Frampton C, James J i sur. Determinants of red blood cell methotrexate polyglutamate concentrations in rheumatoid arthritis patients receiving long-term methotrexate treatment. *Arthritis Rheum.* 2009;60:2248-56.
116. Chan ES, Cronstein BN. Molecular action of methotrexate in inflammatory diseases. *Arthritis Res Ther.* 2002;4:266-73.
117. Prey S, Paul C. Effect of folic or folinic acid supplementation on methotrexate-associated safety and efficacy in inflammatory disease: a systematic review. *Br J Dermatol.* 2009;160:622-8.
118. Lucas CJ, Dimmitt SB, Martin JH. Optimising low-dose methotrexate for rheumatoid arthritis-A review. *Br J Clin Pharmacol.* 2019;85:2228-34.

119. Cronstein BN, Haskó G. Regulation of Inflammation by Adenosine. *Front. Immunol.* 2013;4:85.
120. Baggott JE, Vaughn WH, Hudson BB. Inhibition of 5 aminoimidazole-4-carboxamide ribotide transformylase, adenosine deaminase and 5-adenylate deaminase by polyglutamates of methotrexate and oxidized folates and by 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside and ribotide. *Biochem J.* 1986; 236:193–200.
121. Riksen NP, Barrera P, van den Broek PH, van Riel PL, Smits P, Rongen GA. Methotrexate modulates the kinetics of adenosine in humans in vivo. *Ann Rheum Dis.* 2006;65:465-70.
122. Neshar G, Mates M, Zevin S. Effect of caffeine consumption on efficacy of methotrexate in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003;48:571-2.
123. Benito-Garcia E, Heller JE, Chibnik LB, Maher NE, Matthews HM, Bilics JA i sur. Dietary caffeine intake does not affect methotrexate efficacy in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2006;33:1275-81.
124. Thomas S, Fisher KH, Snowden JA, Danson SJ, Brown S, Zeidler MP. Methotrexate Is a JAK/STAT Pathway Inhibitor. *PLoS One.* 2015;10:e0130078.
125. Seif F, Khoshmirsafa M, Aazami H, Mohsenzadegan M, Sedighi G, Bahar M i sur. The role of JAK-STAT signaling pathway and its regulators in the fate of T helper cells. *Cell Commun Signal.* 2017;15:23.
126. Fleischmann R, Wollenhaupt J, Takiya L, Maniccia A, Kwok K, Wang L i sur. Safety and maintenance of response for tofacitinib monotherapy and combination therapy in rheumatoid arthritis: an analysis of pooled data from open-label long-term extension studies. *RMD Open.* 2017;3:e000491.
127. Chatzidionysiou K. Beyond Methotrexate and Biologics in RA - Efficacy of JAK Inhibitors and their Place in the Current Treatment Armamentarium. *Mediterr J Rheumatol.* 2020;31:120-8.
128. Li YB, Xu P, Xu K, Cai YS, Sun MY, Yang L i sur. Methotrexate affects HMGB1 expression in rheumatoid arthritis, and the downregulation of HMGB1 prevents rheumatoid arthritis progression. *Mol Cell Biochem.* 2016;420:161-70.

129. Hawwa AF, AlBawad A, Ronney M, Wedderburn LR, Beresford MW, McElnay JC. Methotrexate polyglutamates as a potential marker of adherence to long-term therapy in children with juvenile idiopathic arthritis and juvenile dermatomyositis: an observational, cross-sectional study. *Arthritis Res Ther.* 2015;17:295.
130. Bulatović M, Heijstek MW, Van Dijkhuizen EH, Wulffraat NM, Pluijm SM, de Jonge R. Prediction of clinical non-response to methotrexate treatment in juvenile idiopathic arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2012;71:1484-9.
131. Vilc I, Munitis PG, Pistorio A, Ravelli A, Buoncompagni A, Bica B i sur. Predictors of poor response to methotrexate in polyarticular-course juvenile idiopathic arthritis: analysis of the PRINTO methotrexate trial. *Ann Rheum Dis.* 2010;69:1479-83.
132. Schmeling H, Horneff G, Benseler SM, Fritzler MJ. Pharmacogenetics: can genes determine treatment efficacy and safety in JIA? *Nat Rev Rheumatol.* 2014;10:682-90.
133. Jiang K, Sawle AD, Frank MB, Chen Y, Wallace CA, Jarvis JN. Whole Blood Gene Expression Profiling Predicts Therapeutic Response at Six Months in Patients With Polyarticular Juvenile Idiopathic Arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 2014;66:1363-71.
134. de Rotte MC, Bulatovic M, Heijstek MW, Jansen G, Heil SG, van Schaik RH i sur. ABCB1 and ABCC3 gene polymorphisms are associated with first-year response to methotrexate in juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol.* 2012;39:2032-40.
135. Cobb J, Cule E, Moncrieffe H, Hinks A, Ursu S, Patrick F i sur. Genome-Wide Data reveals Novel Gene for Methotrexate Response in a Large Cohort of Juvenile Idiopathic Arthritis Cases. *Pharmacogenomics J.* 2014;14:356-65.
136. Vugmeyster Y, Harrold J, Xu X. Absorption, distribution, metabolism, and excretion (ADME) studies of biotherapeutics for autoimmune and inflammatory conditions. *AAPS J.* 2012;14:714-27.
137. Dervieux T, Kremer JM, Weinblatt ME. Differing contribution of methotrexate polyglutamates to adalimumab blood levels as compared with etanercept. *Ann Rheum Dis.* 2019;78:1285-6.

138. Ternant D, Mulleman D, Lauféron F, Vignault C, Ducourau E, Wendling D i sur. Influence of methotrexate on infliximab pharmacokinetics and pharmacodynamics in ankylosing spondylitis. *Br J Clin Pharmacol.* 2012;73:55-65.
139. Deng Y, Liu L, Qiang W, Hu L, Wang L, Cheng Z. Methotrexate Reduces the Clearance of Adalimumab by Increasing the Concentration of Neonatal Fc Receptor in Tissues. *Pharm Res.* 2019;36:157.
140. <https://go.drugbank.com/drugs>, pristupljeno 25.11.2021.
141. Mercantepe T, Tümkaya L, Mercantepe F. Effects of Infliximab against Methotrexate Toxicity in Splenic Tissue via the Regulation of CD3, CD68, and C200R in Rats. *Cells Tissues Organs.* 2018;206:308-16.
142. Shoop-Worrall SJW, Wu Q, Davies R, Hyrich KL, Wedderburn LR. Predicting disease outcomes in juvenile idiopathic arthritis: challenges, evidence, and new directions. *Lancet Child Adolesc Health.* 2019;3:725-33.
143. Julià A, Ferrándiz C, Dauden E, Fonseca E, Fernández-López E, Sanchez-Carazo JL i sur. Association of the PDE3A-SLCO1C1 locus with the response to anti-TNF agents in psoriasis. *Pharmacogenomics J.* 2015;15:322–5.
144. Choy EH. Clinical significance of Janus Kinase inhibitor selectivity. *Rheumatology (Oxford).* 2019;58:953-62.
145. Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J.* 2001;360:1-16.
146. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2005;45:51-88.
147. Allocati N, Masulli M, Di Ilio C, Federici L. Glutathione transferases: substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases. *Oncogenesis.* 2018;7:8.
148. Oakley A. Glutathione transferases: a structural perspective. *Drug Metab Rev.* 2011;43:138-51.
149. Wu B, Dong D. Human cytosolic glutathione transferases: structure, function, and drug discovery. *Trends Pharmacol Sci.* 2012;33:656-68.
150. Eaton DL, Bammler TK. Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicol Sci.* 1999;49:156–64.

151. Jancova P, Anzenbacher P, Anzenbacherova E. Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2010;154:103-16.
152. Leaver MJ, George SG. A piscine glutathione S-transferase which efficiently conjugates the end-products of lipid peroxidation. *Mar. Environ. Res.* 1998;46:71–4.
153. Litwack G, Ketterer B, Arias IM. Ligandin: a hepatic protein which binds steroids, bilirubin, carcinogens and a number of exogenous organic anion. *Nature.* 1971;234:466–7.
154. Mikstacki A, Zakerska-Banaszak O, Skrzypczak-Zielinska M, Tamowicz B, Szalata M, Slomski R. Glutathione S-transferase as a toxicity indicator in general anesthesia: genetics and biochemical function. *J Clin Anesth.* 2015;27:73-9.
155. Beckett GJ, Hayes JD. Glutathione S-transferase measurements and liver disease in man. *J Clin Biochem Nutr.* 1987;2:1–24.
156. Beckett GJ, Chapman BJ, Dyson EH, Hayes JD. Plasma glutathione S-transferase measurements after paracetamol overdose: evidence for early hepatocellular damage. *Gut.* 1985;26:26-31.
157. Harrison DJ, Kharbanda R, Cunningham DS, McLellan LI, Hayes JD. Distribution of glutathione S-transferase isoenzymes in human kidney: basis for possible markers of renal injury. *J Clin Pathol.* 1989;42:624–8.
158. Sundberg AG, Appelkvist EL, Bäckman L, Dallner G. Urinary pi-class glutathione transferase as an indicator of tubular damage in the human kidney. *Nephron.* 1994;67:308–16.
159. Wormhoudt LW, Commandeur JN, Vermeulen NP. Genetic polymorphisms of human N-acetyltransferase, cytochrome P450, glutathione-S-transferase, and epoxide hydrolase enzymes: relevance to xenobiotic metabolism and toxicity. *Crit Rev Toxicol.* 1999;29:59-124.
160. Board PG, Menon D. Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1830:3267-88.
161. Strange RC, Jones PW, Fryer AA. Glutathione S-transferase: genetics and role in toxicology. *Toxicol Lett.* 2000;112-113:357-63.

162. Ellegren H, Galtier N. Determinants of genetic diversity. *Nat Rev Genet.* 2016;17:422-33.
163. Chikezie PC. Glutathione S-transferase Activity in Diagnostic Pathology. *Metabolomics.* 2015;5:153.
164. Suvakov S, Damjanovic T, Stefanovic A, Pekmezovic T, Savic-Radojevic A, Pljesa-Ercegovac M i sur. Glutathione S-transferase A1, M1, P1 and T1 null or low-activity genotypes are associated with enhanced oxidative damage among haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2013;28:202-12.
165. Whalen R, Boyer TD. Human glutathione S-transferases. *Semin Liver Dis.* 1998;18:345-58.
166. Bocedi A, Noce A, Rovella V, Marrone G, Cattani G, Iappelli M i sur. Erythrocyte glutathione transferase in kidney transplantation: a probe for kidney detoxification efficiency. *Cell Death Dis.* 2018;9:288.
167. Josephy PD. Genetic variations in human glutathione transferase enzymes: significance for pharmacology and toxicology. *Hum Genomics Proteomics.* 2010: 876940.
168. Beutler E, Gelbart T, Pegelow C. Erythrocyte glutathione synthetase deficiency leads not only to glutathione but also to glutathione-S-transferase deficiency. *J Clin Invest.* 1986;77:38-41.
169. Broekman MM, Bos C, Te Morsche RH, Hoentjen F, Roelofs HM, Peters WH i sur. GST Theta null genotype is associated with an increased risk for ulcerative colitis: a case-control study and meta-analysis of GST Mu and GST Theta polymorphisms in inflammatory bowel disease. *J Hum Genet.* 2014;59:575-80.
170. Strange RC, Spiteri MA, Ramachandran S, Fryer AA. Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutat Res.* 2001;482:21-6.
171. Rohr P, Veit TD, Scheibel I, Xavier RM, Brenol JC, Chies JA i sur. GSTT1, GSTM1 and GSTP1 polymorphisms and susceptibility to juvenile idiopathic arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2008;26:151-5.
172. Seidegard J, Vorachek WR, Pero RW, Pearson WR. Hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on trans-stilbene oxide are due to a gene deletion. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988;85:7293-7.

173. Pemble S, Schroeder KR, Spencer SR, Meyer DJ, Hallier E, Bolt HM i sur. Human glutathione S-transferase theta (GSTT1):cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J.* 1994;300:271-6.
174. Salimi S, Nakhaee A, Jafari M, Jahantigh D, Sandooghi M, Zakeri Z i sur. Combination Effect of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 Polymorphisms and Risk of Systemic Lupus Erythematosus. *Iran J Public Health.* 2015;44:814-21.
175. İnal EE, Görükmez O, Eroğlu S, Görükmez Ö, Solak Ö, Topak A i sur. Association of GSTM1, GSTT1, GSTP1-ILE105VAL and ACE I/D polymorphisms with ankylosing spondylitis. *Rheumatol Int.* 2016;36:17-23.
176. Bohanec Grabar P, Logar D, Tomsic M, Rozman B, Dolzan V. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferases and disease activity of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2009;27:229-36.
177. Chen J, Huang F, Liu M, Duan X, Xiang Z. Genetic polymorphism of glutathione S-transferase T1 and the risk of rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Clin Exp Rheumatol.* 2012;30:741-7.
178. Layton MA, Jones PW, Alldresea JE, Strange RC, Fryer AA, Dawes PT i sur. The therapeutic response to D-penicillamine in rheumatoid arthritis: influence of glutathione S-transferase polymorphisms. *Rheumatology.* 1999;38:43-7.
179. Audemard-Verger A, Martin Silva N, Verstuyft C, Costedoat-Chalumeau N, Hummel A, Le Guern V i sur. Glutathione S Transferases Polymorphisms Are Independent Prognostic Factors in Lupus Nephritis Treated with Cyclophosphamide. *PLoS One.* 2016;11:e0151696.
180. Rupasree Y, Naushad SM, Rajasekhar L, Kutala VK. Association of genetic variants of xenobiotic metabolic pathway with systemic lupus erythematosus. *Indian J Biochem Biophys.* 2013;50:447-52.
181. Al-Judaibi B, Schwarz UI, Huda N, Dresser GK, Gregor JC, Ponich T i sur. Genetic Predictors of Azathioprine Toxicity and Clinical Response in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *J Popul Ther Clin Pharmacol.* 2016;23:26-36.
182. Stocco G, Pelin M, Franca R, De Iudicibus S, Cuzzoni E, Favretto D i sur. Pharmacogenetics of azathioprine in inflammatory bowel disease: a role for glutathione-S-transferase? *World J Gastroenterol.* 2014;20:3534-41.

183. Di Pietro G, Magno LA, Rios-Santos F. Glutathione S-transferases: an overview in cancer research. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2010;6:153-70.
184. Mostafavi SS, Ebrahimi A, Sadat SM, Davari Tanha F, Aghasadeghi MR i sur. Impact of null genotypes of GSTT1 and GSTM1 with uterine leiomyoma risk in Iranian population. *J Obstet Gynaecol Res.* 2016;42:434-9.
185. Weich N, Ferri C, Moiraghi B, Bengió R, Giere I, Pavlovsky C i sur. GSTM1 and GSTP1, but not GSTT1 genetic polymorphisms are associated with chronic myeloid leukemia risk and treatment response. *Cancer Epidemiol.* 2016;44:16-21.
186. Shiota M, Fujimoto N, Itsumi M, Takeuchi A, Inokuchi J, Tatsugami K i sur. Gene polymorphisms in antioxidant enzymes correlate with the efficacy of androgen-deprivation therapy for prostate cancer with implications of oxidative stress. *Ann Oncol.* 2017;28:569-75.
187. Kalyan Kolli V, Abraham P, Isaac B. Alteration in antioxidant defense mechanisms in the small intestines of methotrexate treated rat may contribute to its gastrointestinal toxicity. *Cancer Therapy.* 2007;5:501-10.
188. Shen H, Kauvar L, Tew KS. Importance of glutathione and associated enzymes in drug response. *Oncol Res.* 1997;9:295-302.
189. Meissner B, Stanulla M, Ludwig WD, Harbott J, Möricke A, Welte K i sur. The GSTT1 deletion polymorphism is associated with initial response to glucocorticoids in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2004;18:1920-3.
190. Stanulla M, Schrappe M, Muller Brechlin A, Zimmermann M, Welte K. Polymorphisms within glutathione S-transferase genes (GSTM1, GSTT1, GSTP1) and risk of relapse in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: a case control study. *Blood.* 2000;95:1222-8.
191. Abdel-Rahman SZ, el-Zein RA, Anwar WA, Au WW. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. *Cancer Lett.* 1996;107:229-33.
192. Simeunovic D, Odanovic N, Pljesa-Ercegovac M, Radic T, Radovanovic S, Coric V i sur. Glutathione Transferase P1 Polymorphism Might Be a Risk Determinant in Heart Failure. *Dis Markers.* 2019;2019:6984845.

11. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 14. rujna 1972. u Šibeniku.

Diplomirala sam 1997. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Specijalistički ispit iz pedijatrije položila sam 2007. godine. Subspecijalistički ispit iz medicinske genetike položila sam 2014. godine. Završila sam stručni poslijediplomski studij „Klinička pedijatrija“ te znanstveni poslijediplomski studij „Biomedicina i zdravstvo“.

Od 2002. zaposlena sam u Klinici za pedijatriju KBC-a Zagreb. Od 2016. godine zaposlena sam kao asistent na Katedri za pedijatriju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Koautor sam poglavlja u knjigama „Pedijatrija“, „Genetičko informiranje u praksi“, te poglavlja u knjigama u pripremi "Epilepsija u djece i adolescenata" i „Medicinska genetika u kliničkoj praksi“. Koautor sam nekoliko izvornih znanstvenih članaka indeksiranih u CC, izvornih znanstvenih članaka indeksiranih u drugim bazama, nastavnih tekstova te međunarodnih i domaćih znanstvenih sažetaka.

Dugogodišnji sam aktivni član Europskog društva za humanu genetiku, Hrvatskog pedijatrijskog društva, Hrvatskog društva za humanu genetiku i Hrvatskog društva za kliničku genetiku u kojem sam ujedno i član Upravnog odbora.