

# Analiza proupalnog (IL-18) i protuupalnog (IL-10) citokina u bolesnika s juvenilnim idiopatskim artritismom

---

Jelušić, Marija

Doctoral thesis / Disertacija

2005

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:105:335373>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-03**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Medicinski fakultet

**Marija Jelušić**

**ANALIZA PROUPALNOG (IL-18) I PROTUUPALNOG (IL-10) CITOKINA U BOLESNIKA S JUVENILNIM IDIOPATSKIM ARTRITISOM**

**Doktorska disertacija**

**Zagreb, lipanj 2005. godine**

Klinički dio doktorske disertacije izrađen je u Klinici za pedijatriju, KBC Zagreb, a laboratorijski dio u Zavodu za imunologiju Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Zagreb i Laboratoriju za molekularnu imunologiju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga (Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu).

**Mentor rada je Prof. dr. sc. Ivan Malčić**

Doktorska disertacija sadrži: 107 stranica

10 slika

i 14 tablica.

---

## SADRŽAJ

---

|                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. POPIS OZNAKA I KRATICA                                                 | 1  |
| 2. UVOD                                                                   | 3  |
| 2.1. Reumatske bolesti u dječjoj dobi                                     | 3  |
| 2.2. Juvenilni idiopatski artritis (JIA)                                  | 3  |
| 2.2.1. Epidemiologija juvenilnog idiopatskog artritisa                    | 5  |
| 2.2.2. Oligoartikularni tip juvenilnog idiopatskog artritisa              | 6  |
| 2.2.3. Poliartikularni tip juvenilnog idiopatskog artritisa               | 8  |
| 2.2.4. Sistemske tip juvenilnog idiopatskog artritisa                     | 11 |
| 2.2.5. Etiologija i patogeneza juvenilnog idiopatskog artritisa           | 12 |
| 2.3. Imunotolerancija                                                     | 14 |
| 2.4. Regulacijski limfociti T                                             | 17 |
| 2.4.1. Prirođeni regulacijski limfociti T                                 | 17 |
| 2.4.2. Inducirani regulacijski limfociti T                                | 19 |
| 2.4.3. Indukcija i regulacija limfocita T nezrelim dendritičkim stanicama | 22 |
| 2.5. Profil citokina u JIA                                                | 25 |
| 2.5.1. Interleukin 10 (IL-10)                                             | 30 |
| 2.5.1.1. Biološki učinci IL-10                                            | 30 |
| 2.5.2. Interleukin 18 (IL-18)                                             | 32 |
| 2.5.2.1. Biološki učinci IL-18                                            | 33 |

|                                                                                                                                                                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA                                                                                                                                                                                         | 35  |
| 4. ISPITANICI I METODE                                                                                                                                                                                          | 36  |
| 4.1. Ispitanici                                                                                                                                                                                                 | 36  |
| 4.2. Metode rada                                                                                                                                                                                                | 38  |
| 4.2.1 Anamneza i fizikalni pregled                                                                                                                                                                              | 38  |
| 4.2.2. Laboratorijske pretrage                                                                                                                                                                                  | 38  |
| 4.2.3. Analiza citokina u serumu i kulturi podraženih limfocita in vitro                                                                                                                                        | 39  |
| 4.2.4. Postupak izravnog bojenja leukocita                                                                                                                                                                      | 41  |
| 4.3. Statistička analiza                                                                                                                                                                                        | 42  |
| 5. REZULTATI                                                                                                                                                                                                    | 43  |
| 5.1. Pregled osnovnih podataka ispitanika                                                                                                                                                                       | 43  |
| 5.2. Analiza laboratorijskih nalaza u bolesnika s JIA u aktivnoj fazi i u remisiji bolesti                                                                                                                      | 44  |
| 5.3. Primijenjeni lijekovi u bolesnika s JIA                                                                                                                                                                    | 48  |
| 5.4. Analiza IL-10 u serumu, sinovijalnoj tekućini i nadtalogu kultura nestimuliranih i stimuliranih limfocita                                                                                                  | 50  |
| 5.5. Analiza IL-18 u serumu, sinovijalnoj tekućini i nadtalogu kultura stimuliranih i nestimuliranih limfocita                                                                                                  | 53  |
| 5.6. Analiza CD4 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> i regulacijskih limfocita T (CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>++</sup> i CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>++</sup> CCR4 <sup>+</sup> ) u perifernoj krvi | 55  |
| 6. RASPRAVA                                                                                                                                                                                                     | 60  |
| 6.1. IL-18 i IL-10 u bolesnika s juvenilnim idiopatskim artritisom                                                                                                                                              | 60  |
| 6.2. Uloga regulacijskih limfocita T u juvenilnom idiopatskom artritisu                                                                                                                                         | 68  |
| 6.3. Nove smjernice u liječenju bolesnika s juvenilnim idiopatskim artritisom                                                                                                                                   | 72  |
| 7. ZAKLJUČCI                                                                                                                                                                                                    | 76  |
| 8. LITERATURA                                                                                                                                                                                                   | 78  |
| 9. SAŽETAK                                                                                                                                                                                                      | 102 |
| 10. SUMMARY                                                                                                                                                                                                     | 104 |
| 11. ŽIVOTOPIS                                                                                                                                                                                                   | 106 |

## 1. POPIS OZNAKA I KRATICA

---

|        |                                                                                                         |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ACR    | - Američko reumatološko društvo (engl. <i>American College of Rheumatology</i> );                       |
| ANF    | - antinuklearni faktor;                                                                                 |
| APC    | - antigen predočna stanica (engl. <i>antigen presenting cell</i> );                                     |
| AOSD   | - adultni tip Stillove bolesti (engl. <i>adult-onset Still' disease</i> );                              |
| CTLA-4 | - kostimulacijska molekula CTLA-4 (engl. <i>cytotoxic T lymphocyte antigen-4</i> );                     |
| DMARDs | - antireumatski lijekovi koji preinačuju bolest (engl. <i>disease modifying antihireumatic drugs</i> ); |
| ELISA  | - enzimski imunotest (engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )                                  |
| EULAR  | - Europska liga za borbu protiv reumatizma (engl. <i>European League Against Rheumatism</i> );          |

|                 |                                                                                                                                 |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| GM-CSF          | - čimbenik poticanja granulocitnih i makrofagnih kolonija (engl. <i>granulocyte - macrophage colony - stimulating factor</i> ); |
| HLA             | - glavni kompleks gena tkivne podudarnosti (engl. <i>human leukocyte antigens</i> );                                            |
| GITR            | - TNF receptor induciran glukokortikoidima (engl. <i>glucocorticocoid - induced TNF receptor</i> );                             |
| FOX P3          | - transkripcijski čimbenik FoxP3 (engl. <i>transcription factor forkhead box P3</i> ).                                          |
| JIA             | - juvenilni idiopatski artritis;                                                                                                |
| IFN             | - interferoni                                                                                                                   |
| IL              | - interleukini                                                                                                                  |
| IL-18BP         | - protein koji veže IL-18 (engl. <i>IL-18 binding protein</i> );                                                                |
| ILAR            | - Međunarodna liga reumatoloških udruženja (engl. <i>International League of Association for Rheumatology</i> );                |
| IL-1Ra          | - antagonist receptora za interleukin 1 (engl. <i>interleukin 1 receptor antagonist</i> )                                       |
| MHC             | - glavni kompleks gena tkivne podudarnosti u miša (engl. <i>main histocompatibility complex</i> )                               |
| NSAID           | - nesteoridni protuupalni lijekovi (engl. <i>non - steroidal antiinflammatory drugs</i> );                                      |
| RF              | - reumatoidni faktor;                                                                                                           |
| RA              | - reumatoidni artritis;                                                                                                         |
| STAT4           | - engl. <i>signal transducers and ativators of transcription</i> ;                                                              |
| TCR             | - antigenski receptor limfocita T (engl. <i>T-cell receptor</i> ),                                                              |
| TGF             | - čimbenik transformacije rasta (engl. <i>transforming growth factor</i> );                                                     |
| TNF             | - čimbenik tumorske nekroze (engl. <i>tumor necrosis factor</i> );                                                              |
| TR <sub>1</sub> | - inducirani regulacijski limfociti                                                                                             |

## 2. UVOD

---

### 2.1. Reumatske bolesti u dječjoj dobi

Reumatske bolesti u dječjoj dobi nisu tako rijetke, kako se to ranije pretpostavljalo, i obuhvaćaju najmanje 110 bolesti muskuloskeletnog sustava. To su kronične, višesustavne bolesti, a klinički se očituju akutnom ili kroničnom upalom tkiva muskuloskeletnog sustava, krvnih žila i kože.

Homo sapiens obolijeva od reumatizma već tisućama godina. Znaci kroničnog artritisa zamijećeni su još na kralježnici staroegipatskih mumija oko 8000 god. prije Krista.<sup>1</sup> Međutim, reumatoidni artritis smatra se ipak suvremenijom bolešću, barem u Europi, gdje je prvi put opisan u 19. stoljeću, iako je među starosjediocima Sjeverne Amerike vjerojatno postojao i ranije.<sup>2</sup> Isto tako spoznaje o reumatskim bolestima u djece potječu iz 19. stoljeća.<sup>3</sup>

Etiologija tih bolesti ostaje i dalje nepoznata, iako su u posljednje vrijeme istraživanja u području molekularne biologije i molekularne genetike omogućila veliki napredak u razumijevanju njihove patogeneze. Javljaju se bitni pomaci u liječenju, osobito posljednjih 10-15 godina, kada je uvođenjem preparata s ciljanim djelovanjem na određene sekvence autoimunskog upalnog procesa (biološki pripravci), počela novo razdoblje u liječenju reumatskih bolesti.

### 2.2. Juvenilni idiopatski artritis (JIA)

Naziv «juvenilni idiopatski artritis» (JIA) obuhvaća heterogenu skupinu kroničnih upalnih artritisa, koji počinju u dječjoj dobi i znatno se razlikuju od reumatoidnog artritisa (RA) odraslih.<sup>4</sup>



To je najčešća reumatska bolest u dječjoj dobi, a također jedna od najčešćih kroničnih bolesti djece, te važan uzrok invalidnosti djece. Iako su artritis prvi put opisani krajem 19. stoljeća,<sup>5</sup> etiologija bolesti još je nepoznata. Istraživanja vezana uz juvenilni idiopatski artritis prepuna su poteškoća bilo zbog nedostatka suglasnosti vezane uz klasifikaciju i sam naziv bolesti, bilo zbog raznolikosti u kliničkoj slici.

Sedamdesetih godina 20. stoljeća dva su reumatološka društva, Američko reumatološko društvo (ACR, engl. *American College of Rheumatology*) i Europska liga za borbu protiv reumatizma (EULAR, engl. *European League Against Rheumatism*), predložila dvije različite klasifikacije za kronični artritis u dječjoj dobi, koje su neovisne o klasifikacijama koje se rabe za odrasle. Naziv «juvenilni reumatoidni artritis» prihvatio je godine 1972. ACR, a sama je klasifikacija još nadopunjavana godine 1976. Bolest je definirana upalom jednog ili više zglobova koja traje najmanje 6 tjedana, a počinje prije navršene 16. godine.<sup>6,7</sup> Postoje tri glavna tipa bolesti: sistemski, oligoartikularni (ili pauciartikularni ili monoartikularni) i poliartrikularni (tablica 1). Godine 1977. EULAR predlaže novi naziv «juvenilni kronični artritis» koji se ponajprije rabi u Europi. Za postavljanje dijagnoze upala jednog ili više zglobova mora trajati najmanje 3 mjeseca, a bolest također mora početi prije navršene 16. godine. Klasifikacija EULAR u naziv juvenilni kronični artritis osim tri osnovna tipa artritisa, koji su prema ACR kriterijima definirani kao juvenilni reumatoidni artritis, uključuje još i juvenilni ankilozantni spondilitis, juvenilni psorijatični artritis te artropatije vezane uz upalne bolesti crijeva. Naziv «juvenilni reumatoidni artritis» odnosi se samo na IgM artritis s pozitivnim nalazom reumatoidnog faktora (RF) (tablica 1).<sup>8</sup> Kao odgovor na takva nesuglasja između klasifikacije ACR i EULAR, godine 1994. Međunarodna liga reumatoloških udruženja (ILAR, engl. *International League of Association for Rheumatology*) predlaže naziv «juvenilni idiopatski artritis» koji obuhvaća sedam bolesti koje počinju prije navršene 16. godine, a

upala zgloba traje najmanje 6 tjedana. Kriteriji su nadopunjavani godine 1997., te je dodana i osma bolest «drugi artritis», a odnosi se na bolesnike koji se ne mogu uvrstiti ni u jednu kategoriju ili koji se mogu uvrstiti u više kategorija. Izbjegavaju naziv “kronični” ili “reumatoidni”, jer je etiološki čimbenik još nepoznat (tablica 1).<sup>9</sup>

Tablica 1. Usporedba različitih klasifikacija artritisa u dječjoj dobi

| ACR                            | EULAR                              | ILAR                                                |
|--------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Juvenilni reumatoidni artritis | Juvenilni kronični artritis        | Juvenilni idiopatski artritis                       |
| Sistemiški<br>Poliartikularni  | Sistemiški<br>Poliartikularni      | Sistemiški<br>Poliartikularni tip RF-negativan      |
|                                | Juvenilni reumatoidni artritis     | Poliartikularni tip RF-pozitivan                    |
| Oligoartikularni               | Oligoartikularni                   | Oligoartikularni tip<br>Perzistirajući<br>Prošireni |
|                                | Juvenilni psorijatični artritis    | Psorijatični artritis                               |
|                                | Juvenilni ankilozantni spondilitis | Entezitisu pridruženi artritis                      |
|                                |                                    | Drugi artritis                                      |

ACR: Američko reumatološko društvo, EULAR: Europska liga za borbu protiv reumatizma, ILAR: Međunarodna liga reumatoloških udruženja, RF: reumatoidni faktor. (Preuzeto iz <sup>11</sup>)

### 2.2.1. Epidemiologija juvenilnog idiopatskog artritisa

Iako je JIA dosta učestala bolest, stvarna incidencija bolesti još je nepoznata. Prve epidemiološke studije iz 80-ih godina 20. stoljeća pokazale su prevalenciju od 0,16 do 1,10/10000 i incidenciju od 0 do 9,2/100000.<sup>10</sup> Nedavno provedene studije također pokazuju znatnu razliku u prevalenciji od 20 do 400/100000 i u incidenciji od 0,83 do 22,9/100000.<sup>4,11</sup> Također je pokazano da se prevalencija različitih tipova JIA razlikuje s obzirom na geografsku i etničku pripadnost. Tako je, na primjer, oligoartikularni tip najčešći u bijeloj rasi u Europi i Sjevernoj Americi, dok je poliartikularni tip najčešći u crnoj rasi.<sup>12,13</sup>

JIA je definiran kao bolest koja započinje prije navršene 16. godine. Rijetko se kada javlja prije šestog mjeseca života, a najučestaliji je između prve i treće godine. Dvaput je učestaliji u djevojčica. Tri su najčešća tipa: 1) oligoartikularni (javlja se približno u 56% do 60% bolesnika), 2) poliartrikularni (javlja se približno u 25% do 28% bolesnika), i 3) sistemski tip (javlja se približno u 10% do 12% bolesnika) (tablica 2).<sup>11</sup>

Tablica 2. Obilježja bolesnika s juvenilnim idiopatskim artritisom (JIA) ovisno o tipu bolesti

|                                | <b>POLIARTIKULARNI<br/>TIP</b>                  | <b>OLIGOARTIKULARNI<br/>TIP</b>        | <b>SISTEMSKI JIA</b>           |
|--------------------------------|-------------------------------------------------|----------------------------------------|--------------------------------|
| Učestalost                     | 30%                                             | 60%                                    | 10%                            |
| Broj zahvaćenih zglobova       | >5                                              | <4                                     | varijabilan                    |
| Dob pri postavljanju dijagnoze | za vrijeme djetinjstva, najčešće između 1-3 god | vrlo rano u djetinjstvu između 1-2 god | za vrijeme cijelog djetinjstva |
| Spol (Ž:M)                     | 3:1                                             | 5:1                                    | 1:1                            |
| Izvanzglobni simptomi          | rijetko                                         | nisu prisutni                          | glavni simptomi bolesti        |
| Pojava kroničnog uveitisa      | 5%                                              | 20%                                    | rijetko                        |
| RF +                           | 10% (povećava se s godinama)                    | rijetko                                | rijetko                        |
| ANF +                          | 40-50%                                          | 75-85%*                                | 10%                            |

\* U djevojčica s uveitisom

ANF: antinuklearni faktor, EULAR, RF: reumatoidni faktor (preuzeto iz <sup>11</sup>)

### 2.2.2. Oligoartikularni tip juvenilnog idiopatskog artritisa

Oligoartikularni tip JIA po definiciji je upala jednog do četiri zglobova tijekom prvih šest mjeseci bolesti. Razlikuju se dvije podskupine: a) perzistirajući oligoartikularni tip, kod kojeg su u daljnjem tijeku bolesti zahvaćena četiri zglobova (u 90-95% oboljelih), i b) prošireni oligoartikularni tip, gdje je nakon 6 mjeseci bolesti zahvaćeno pet ili više zglobova (u 5-10% oboljelih). Kriteriji koji isključuju dijagnozu oligoartikularnog tipa su: pozitivna obiteljska anamneza na psorijazu

u prvom ili drugom koljenu, pozitivna obiteljska anamneza bolesti povezanih s HLA-B27 antigenom u prvom ili drugom koljenu, pozitivni RF, prisutnost sistemskog artritisa i pojava artritisa u djevojčica poslije 8. godine života s pozitivnim HLA-B27 antigenom.<sup>9</sup>

Oligoartikularni tip u većini slučajeva zahvaća zglobove donjih ekstremiteta, i to najčešće koljeno.

U više od polovice djece zahvaćen je samo jedan zglob (monoartikularni tip) (slika 1).



Slika 1. Oteklina desnog koljenskog zgloba

Javlja se vrlo rano, između prve i treće godine života i to tri puta češće u djevojčica. Približno 20% bolesnika oboli i od kroničnog uveitisa, koji je u početku najčešće asimptomatski.<sup>14</sup> U tih bolesnika djevojčice obolijevaju 5 do 6 puta češće. U 60-80% bolesnika pozitivan je antinuklearni faktor (ANF). Uveitis se obično pojavi unutar prvih pet godina od postavljanja dijagnoze JIA, premda su zabilježeni i slučajevi pojave uveitisa 10 godina nakon postavljanja dijagnoze<sup>15</sup> (tablica 2). Oligoartikularni tip jest bolest obično blažeg tijeka, a trajna je invalidnost rijetka.<sup>11</sup>

### 2.2.3. Poliartikularni tip juvenilnog idiopatskog artritisa

Poliartikularni tip JIA po definiciji je upala 5 ili više zglobova tijekom prvih 6 mjeseci bolesti. Razlikuju se dva tipa: a) poliartikularni tip s pozitivnim nalazom RF (najmanje dva pozitivna RF testa unutar posljednja tri mjeseca bolesti) i b) poliartikularni tip s negativnim nalazom RF.<sup>9</sup>

Poliartikularni tip s negativnim nalazom RF najčešće se razvija kao samostalni tip, ali može nastati i iz sistemskog tipa JIA, a nerijetko nekontrolirani oligoartikularni tip, osobito proširen, može prijeći u poliartikularni tip. Bolest se klinički očituje simetričnom upalom zglobova, i to u početku velikih zglobova: koljena, gležnjeva, laktova i ručnih zglobova. Mali zglobovi šaka i stopala budu zahvaćeni u kasnijem tijeku bolesti, no ponekad su zahvaćeni i na početku bolesti (slika 2a i 2b).<sup>14</sup>. Na zglobovima šaka ponajprije su zahvaćeni proksimalni interfalangealni, te drugi i treći metakarpofalangealni zglobovi (slika 2a). Nerijetko je zahvaćen i temporomandibularni zglob, tako da je smanjena oralna higijena važan problem u te teško bolesne djece.<sup>17</sup> Katkad je već pri postavljanju dijagnoze prisutna atrofija mišića i kontraktura zahvaćenog zgloba.<sup>14</sup> Javlja se u svim dobnim skupinama, ali najčešće u predškolskoj i školskoj dobi. Češći je u djevojčica nego u dječaka (ž : m=2,8 : 1). Karakteristična je jutarnja ukočenost i slabost muskulature, koji se tijekom dana mogu smanjiti. Bez liječenja bolest je progresivna (tablica 2) (slika 3).

Poliartikularni tip s pozitivnim nalazom RF javlja se ponajprije u djevojčica, i to obično u kasnom djetinjstvu ili adolescenciji. Bolest se klinički očituje simetričnom upalom malih zglobova šaka i stopala (slika 2a i 2b). Razvija se vrlo slično kao RA, uz ranu pojavu erozivnog sinovitisa i subkutanih (reumatoidnih) čvorića. Obično se protegne u odraslu dob, te je uzrok težoj ometanosti zbog trajnog oštećenja zglobova.<sup>18</sup>



Slika 2a. Oteklina oba radiokarpalna zglobova, metakarpofalangealnih zglobova II-V prsta, proksimalnih interfalangealnih zglobova I-V prsta uz fleksijsku kontrakturu



Slika 2b. Oteklina oba talokruralna zglobova, te proksimalnih interfalangealnih zglobova II-V prsta, uz fleksijsku kontrakturu



Slika 3. Otekline oba koljena, skočnih zglobova uz prisutne fleksijske kontrakture u djevojčice koja je neadekvatno liječena i kod koje nije provedena fizikalna terapija. Poremećaj rasta ekstremiteta uslijed osnovne bolesti

U početku bolesti ili tijekom egzacerbacija mogu biti prisutni i izvanzglobni simptomi, kao što su: umjereno povišena tjelesna temperatura, hepatosplenomegalija i limfadenopatija. Moguća je pojava i malog perikardijalnog izljeva, dok su perikarditis i pleuritis vrlo rijetki. Kronični uveitis javlja se znatno rjeđe nego u oligoartikularnom obliku.

Zahvaćenost zgloba kuka javlja se približno u 50% djece. Nerijetko uzrokuje destrukciju ili poremećeni razvoj glave femura i acetabuluma, što je glavni uzrok teže ometanosti u bolesnika s JIA. Prema tome, zahvaćenost zgloba kuka predstavlja loš prognostički znak.<sup>19-21</sup>

#### 2.2.4. Sistemski tip juvenilnog idiopatskog artritisa

Sistemski tip JIA najrjeđi je tip koji se javlja podjednako u djevojčica i dječaka. Bolest se u početku očituje teškim općim i izvanzglobnim simptomima (tablica 2). Tipičan je početak visoka intermitentna vrućica (pseudoseptička temperatura - tipične temperaturne krivulje za sepsu, ali s negativnim hemokulturama), koja traje ponekad tjednima, a najmanje 2 tjedna prema ILAR kriterijima. Uz vrućicu redovito se javlja reumatoidni osip (eritematozne makule veličine 2 do 5 mm),<sup>22,23</sup> koji ne svrbi, a pojačava se i slabi zajedno s visinom vrućice. Većinom zahvaća vrat i gornje ekstremitete, a može se proširiti i na ostale dijelove tijela (slika 4). Što je dijete teže sistemski bolesno, to osip dulje perzistira i može se ponovno pojaviti pri svakoj egzacerbaciji bolesti.<sup>11</sup>



Slika 4. Osip kod sistemskog tipa JIA

Redoviti su izvanzglobni simptomi koji se u prvom redu očituju splenomegalijom, a zatim hepatomegalijom i generaliziranom limfadenopatijom. Bolesnici imaju i snažne reakcije seroznih



opni (pleuritis, perikarditis, rijetko peritonitis). Uz to se bolest očituje općim lošim stanjem, klonulošću, inapetencijom i gubitkom tjelesne mase sve do kaheksije ako se na vrijeme ne dijagnosticira bolest. Artritis se obično pojavi tek nakon nekoliko tjedana trajanja bolesti (tablica 2). Opisani su slučajevi u kojih se artritis pojavio tek 10 godina nakon prvi općih i izvanzglobnih simptoma.<sup>11</sup> Približno polovica djece sa sistemskim tipom JIA u potpunosti se oporavi. To su bolesnici u kojih se javlja oligoartikularni tip. Druga polovica bolesnika u kojoj dolazi do progresivnog zahvaćanja sve većeg broja zglobova, ima znatno lošiju prognozu i dovodi do teške ometanosti bolesnika.<sup>24-27</sup>

### 2.2.5. Etiologija i patogeneza juvenilnog idiopatskog artritisa

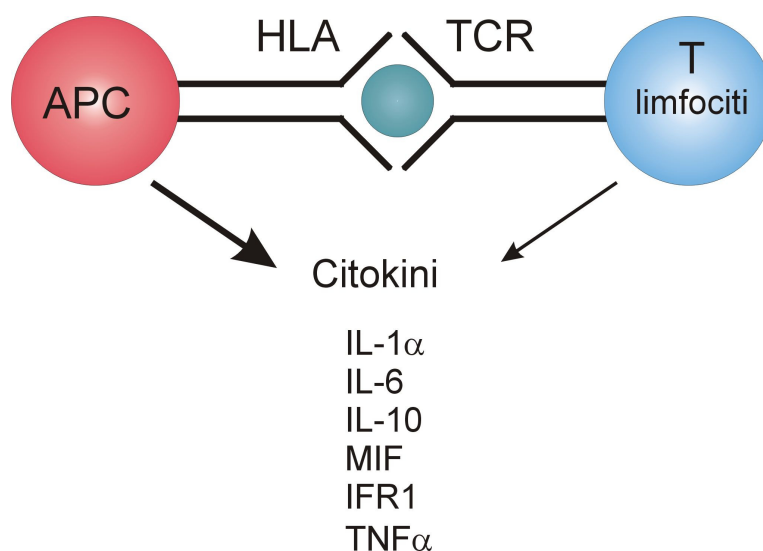
U razumijevanju patogeneze i etiologije JIA važne su dvije spoznaje. Prvo, JIA je kao i većina drugih reumatskih bolesti autoimunosna bolest. Poremećaj limfocita i patološke karakteristike kroničnog sinovitisa upućuju na moguću stanično posredovanu patogenezu.<sup>28,29</sup> S druge strane mnogobrojna autoantitijela, imunosni kompleksi i aktivacija komplementa govori u prilog mogućeg poremećaja humoralne imunosti. Drugo, u patogenezi bolesti važnu ulogu ima genetska predispozicija bolesnika.<sup>30</sup> Različiti tipovi JIA pokazuju ne-mendelski tip nasljeđivanja, pa je tako interakcija među brojnim genima važna u nastanku bolesti. Godine 1974. prvi je put utvrđena povezanost glavnog kompleksa gena tkivne podudarnost u čovjeka – HLA (engl. *human leukocyte antigens*) i to HLA-B27 i oligoartikularnog (pauciartikularnog) tipa JIA, u prvom redu u starijih dječaka u kojih se s vremenom razvije klinička slika spondiloartropatije.<sup>31</sup> Do danas je utvrđen veći broj alela HLA skupine I i II koji pokazuju povećanu učestalost javljanja u bolesnika s određenim tipom JIA, te imaju prognostičko značenje (tablica 3.)

Tablica 3. Povezanost alela glavnog kompleksa gena tkivne podudarnost (HLA) i juvenilnog idiopatskog artritisa (JIA)

| JIA                                | HLA geni                              |
|------------------------------------|---------------------------------------|
| Sistemski JIA                      | Skupina II (DR4)                      |
| Poliartikularni tip RF +           | Skupina II (DR4)                      |
| Poliartikularni tip RF-            | Skupina II (DR8, DQ4, DP3)            |
| Oligoartikularni tip               | Skupina I (A2)                        |
|                                    | Skupina II (DR8, DR5, DR6, DQ4, DP2)* |
| Juvenilni ankilozantni spondilitis | Skupina I (B27)                       |

\*DR4, DR7 imaju zaštitnu ulogu u oligoartikularnom tipu

Danas su osim antigena HLA, utvrđeni i drugi geni u području i izvan područja HLA regije koji su uključeni u patogenezu JIA (slika 5). Geni u području HLA regije su: niskomolekularni polipeptid – LMP (engl. *low molecular weight polypeptid*),<sup>33,34</sup> čimbenik tumorske nekroze – TNF (engl. *tumor necrosis factor*)<sup>35</sup>, i TAP (engl. *transporter associated with antigen processing*).<sup>32</sup> Geni izvan područja HLA regije jesu: antigenski receptor limfocita T – TCR (engl. *T-cell receptor*),<sup>36</sup> interleukin 1-alfa (IL-1 $\alpha$ )<sup>37</sup>, antagonist receptora za interleukin 1 (IL-1Ra)<sup>38</sup>, interleukin 6 (IL-6)<sup>39</sup>, interleukin 10 (IL-10)<sup>40</sup>, NRAMP1 (engl. *natural resistant-associated macrophage protein 1*)<sup>41</sup>, čimbenik inhibicije migracije makrofaga – MIF (engl. *macrophage migration inhibitory factor*)<sup>42</sup> i interferon regulirajući čimbenik-1 - IRF-1 (engl. *interferon regulatory factor 1*).<sup>43</sup>



Slika 5. Geni izvan regije glavnog kompleksa gena tkivne podudarnosti u čovjeka – HLA (engl. *human leukocyte antigens*) uključeni u patogenezu JIA. APC: antigen predočna stanica (engl. *antigen presenting cells*); IL-1 $\alpha$ : interleukin 1 $\alpha$ ; IL-6: interleukin 6, IL-10: interleukin 10; IRF-1: interferon regulirajući čimbenik-1 (engl. *interferon regulatory factor 1*); MIF: čimbenik inhibicije migracije makrofaga (engl. *macrophage migration inhibitory factor*), TCR: antigenski receptor limfocita T (engl. *T-cell receptor*); TNF $\alpha$ : čimbenik tumorske nekroze (engl. *T-cell receptor*) (preuzeto iz <sup>34</sup>).

## 2.3. Imunotolerancija

Imunotolerancija je specifična nereaktivnost organizma na određeni antigen. Ta nereaktivnost nije samo odsutnost reakcije na antigen, nego je stečeno stanje nastalo aktivnim procesom nakon dodira imunološkog sustava s antigenom. Pritom dolazi do promjena u specifičnom klonu reaktivnih limfocita, koje vode njegovu uklanjanju ili inaktivaciji. Tolerancija prema vlastitim antigenima zbiva se perinatalno u primarnim limfnim organima (tzv. centralna ili perinatalna tolerancija), u vrijeme kad je imunosni sustav nezreo. Na taj način nastaje tolerancija samo prema antigenima koji su predloženi na timusnim epitelnim i predložnim stanicama u dovoljnoj koncentraciji. Mnogi izvan timusni antigeni slabo se otpuštaju u cirkulaciju, tako da ne bivaju

predočeni u timusu u dovoljnoj koncentraciji, pa se na njih stvara tolerancija u perifernim limfnim organima, u reakciji sa zrelim imunokompetentnim stanicama (tzv. periferna tolerancija).<sup>44</sup> Mehanizmi kojima može nastati tolerancija jesu: delecija klonova, anergija klonova, imunološko zanemarivanje, imunodevijacija u imunoprivilegiranim mjestima, preusmjerenje imunoreakcije, djelovanje facilitacijskih protutijela i blokada čimbenika te djelovanje supresijskih mehanizama. Poremećaj tih mehanizama uzrokuje nastanak autoimunosne bolesti<sup>44</sup>. Do danas je poznato da približno 5% stanovništva boluje od neke autoimunosne bolesti<sup>45</sup>. Iako je etiologija autoimunosnih bolesti još nepoznata, mnoga istraživanja dokazala su da su upravo limfociti T ključni medijatori u autoimunosnim bolestima (o inzulinu ovisan dijabetes, autoimunosni tiroiditis i autoimunosni gastritis s pernicioznom anemijom)<sup>45</sup>. Dokazano je također, da se i u zdravoj osobi «skrivaju» potencijalno patogeni autoreaktivni limfociti T (engl. *self-reactive*). Na primjer, klonovi autoreaktivnih limfocita T, nakon *in vitro* podraživanja vlastitim molekulama, lako se mogu izolirati iz periferne krvi zdrave osobe<sup>45</sup>. Prema tome, jedno od trenutačno ključnih pitanja u imunologiji je razjašnjenje stvaranja potencijalno štetnih (ili katkad korisnih) autoreaktivnih limfocita T u fiziološkim zbivanjima i u bolestima, te njihovo «prilagođavanje» da se izbjegne nastanak autoimunosne bolesti.

Limfociti T, koji nastaju od nezrelih progenitorskih stanica koštane srži, sazrijevaju u timusu procesom genske preuredbe varijabilnog i konstantnog dijela antigenskog receptora limfocita T (TCR). Genska se preuredba, temelji na intenzivnom preslagivanju mnogo stotina gena zametne loze, na kombinacijama nastalim spajanjem tih gena, somatskoj mutaciji i dodatnoj varijabilnosti radi povezivanja dvaju polipeptidnih lanaca u jedinicu za prepoznavanje. Događa se vrlo rano u procesu sazrijevanja limfocita T, prije izlaganja antigenu, te dovodi do stvaranja goleme širine repertoara specifičnosti receptora za antigen (više od  $10^8$  T-limfocitnih receptora). Više od 95%

zrelih limfocita T ima na površini receptor izgrađen od  $\alpha$  i  $\beta$  lanaca (TCR- $\alpha\beta$ , TCR I), dok manji broj (<10%) ima receptor sastavljen od lanaca  $\gamma$  i  $\delta$  (TCR- $\gamma\delta$ , TCR II).<sup>46,47</sup>

Tijekom sazrijevanja limfocita T zbiva se pozitivna i negativna selekcija. Pozitivna selekcija podrazumijeva da će sazrijeti samo oni klonovi limfocita T kojih antigen specifični receptor prepoznaje i veže slabim afinitetom vlastite peptide u sprezi s vlastitim molekulama glavnog kompleksa gena tkivne podudarnosti - MHC (engl. *Main Histocompatibility Complex*) bilo klase I (CD8<sup>+</sup>) ili klase II (CD4<sup>+</sup>), dok će ostali limfociti odumrijeti. Negativna selekcija znači da će odumrijeti, procesom programirane stanične smrti (apoptoze), oni klonovi limfocita T koji u sklopu molekule MHC prepoznaju i vežu jakim afinitetom vlastite peptide, a preživjet će oni koji ne prepoznaju vlastiti peptid.<sup>45-48</sup> Na periferiju u obliku zrelih limfocita T odlazi manje od 5% stanica, a više od 95% odumire u timusu i to procesom apoptotičke smrti.<sup>49</sup> Međutim, ti su se mehanizmi selekcije pokazali nedovoljnim u kontroli autoreaktivnih limfocita T, tj. sprečavanja nastanka autoimunskih bolesti.

Do danas su provedena brojna istraživanja s ciljem otkrića mehanizma imunotolerancije koji bi «ako dođe do njegova poremećaja», izravno uzrokovao autoimunosnu bolest, odnosno koji bi «kada je pojačan» izravno spriječio nastanak autoimunosne bolesti. Eksperimentalni životinjski modeli pokazali su da odstranjenje ili inaktivacija regulacijskih limfocita T (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) uzrokuje gubitak imunotolerancije i time nastanak brojnih autoimunskih bolesti, dok s druge strane obnavljanje te populacije stanica sprječava nastanak tih procesa.<sup>45, 50-57</sup>

## 2.4. Regulacijski limfociti T

Regulacijski limfociti T kontroliraju imunološki odgovor na vlastite i strane antigene. Prvi su put opisani krajem sedamdesetih godina 20. stoljeća<sup>58</sup>, ali zbog nemogućnosti da se do kraja objasni mehanizam kojim dovode do regulacije/supresije zaboravljeni su do kraja osamdesetih godina 20. stoljeća<sup>59</sup>. Tek su nedavno regulacijski limfociti T ponovno probudili veliko zanimanje mnogobrojnih znanstvenika, budući da se smatra da te stanice imaju ključnu ulogu u regulaciji autoimunosti.<sup>45,48,56,60,61</sup> Samo mali dio, približno 6-15%, CD4<sup>+</sup> limfocita T čine regulacijski limfociti T, tj. CD4<sup>+</sup> limfociti koji na površini imaju receptor za IL-2 (IL-2R) alfa-lanac (CD 25).<sup>48,56,60,61</sup> Postoje dvije grupe regulacijskih limfocita T: prirođeni (engl. *naturally occuring*) i inducirani. Prirođeni su regulacijski limfociti T (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) antigen nespecifični, djeluju izravno na druge limfocite T (limfocit T-limfocit T interakcija) i na taj način inhibiraju njihovu aktivaciju. Inducirani regulacijski limfociti T (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ili CD8<sup>+</sup>) stvaraju imunosupresivne citokine, kao što je IL-10, te na taj način djeluju na druge limfocite T ili antigen predodne stanice, a u pojedinim su slučajevima antigen specifični<sup>48</sup> (tablica 4).

### 2.4.1. Prirođeni regulacijski limfociti T

Prirođeni regulacijski limfociti T (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) da bi počeli supresivno/regulacijsko djelovanje, potrebno je da budu aktivirani putem svojega receptora - TCR, ali kad su jedanput aktivirani, oni dalje suprimiraju aktivaciju limfocita T neovisno o antigenu i ponovnoj reaktivaciji receptora TCR.<sup>52</sup> Nastaju u timusu i to u području timusnog epitela (tablica 4).<sup>52,55,62,63</sup> Dio su normalne diferencijacije limfocita u timusu jer se izražaj CD25 pojavljuje za vrijeme sazrijevanja

limfocita kada timociti, koji su dvostruko pozitivne stanice ( $CD4^+CD8^+$ ), gube jednu od koreceptorskih molekula i postaju jednostruko pozitivne stanice ( $CD4^+CD8^-$ ). Smatra se da do izražaja CD25 dolazi u trenutku aktivacije tih stanica za vrijeme procesa koji se zove promijenjena (engl. *altered*) negativna selekcija.  $CD4^+$  limfociti T koji su sazrijeli u  $CD25^+$  limfocite T na svojoj površini imaju receptor TCR koji ima srednji afinitet za vlastite antigene. Taj je afinitet nedovoljan za negativnu selekciju, ali s druge strane i prejak da bi dopustio da ti limfociti dođu na periferiju. Kao rezultat aktivacije tih stanica u timusu,  $CD4^+CD25^+$  limfociti T supresivni su i anergični. Iako su anergični, što znači da u *in vitro* za vrijeme stimulacije antigenom ne dolazi do njihove proliferacije, oni suprimiraju aktivaciju i proliferaciju drugih  $CD4^+CD25^-$  ili  $CD8^+$  limfocita T na antigen nespecifični način putem limfocit T - limfocit T interakcije (tj. izravnog dodira s ciljnim limfocitima).<sup>50-57</sup> Prirođeni regulacijski limfociti T osim jakog izražaja CD25 molekule, imaju također i izražaj drugih kostimulacijskih molekula: CD103, CD122, CD152 (prijašnji naziv CTLA-4, engl. *cytotoxic T lymphocyte antigen-4*), TNF receptora induciranog glukokortikoidima - GITR (engl. *glucocorticocoid-induced TNF receptor*) i transkripcijskog čimbenika FOX P3 (engl. *transcription factor forkhead box P3*).<sup>45,48</sup> Izražaj CCR4 osnovno je obilježje regulacijskih limfocita T,<sup>64</sup> te se već od prije smatra da limfociti T koji izražavaju CCR4 u sinovijalnoj tekućini bolesnika s JIA mogu imati protuupalno djelovanje.<sup>65</sup>

Tablica 4. Karakteristike regulacijskih limfocita T

|                       | Prirođeni regulacijski limfociti T<br>(TR) | Inducirani regulacijski limfociti<br>T (TR <sub>1</sub> ). |
|-----------------------|--------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| Karakteristike        |                                            |                                                            |
| Fenotip               | CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>         | CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>                         |
| Anergičnost           | +                                          | +                                                          |
| Mehanizam djelovanja  |                                            |                                                            |
| limfocit T-limfocit T | +                                          | +                                                          |
| limfocit T-APS*       | -                                          | ?                                                          |
| putem citokina        | -                                          | +                                                          |
| antigena specifičnost | -                                          | -                                                          |

\*APS: antigen predočna stanica

#### 2.4.2. Inducirani regulacijski limfociti T

Aktivacija, *in vitro* ili *in vivo*, mišjih ili humanih CD4<sup>+</sup> limfocita T u prisutnosti IL-10 uzrokuje nastanak specifičnih klonova limfocita T koji proizvode značajnu količinu IL-10, IFN- $\gamma$ , čimbenika transformacije rasta - TGF- $\beta$  (engl. *transforming growth factor*) i IL-5.<sup>66,67</sup> Groux i suradnici pokazali su da ti specifični klonovi limfocita T, koji se nazivaju regulacijski limfociti tipa 1 (TR<sub>1</sub>), inhibiraju antigen-specifični imunološki odgovor putem lučenja IL-10 i TGF- $\beta$  (tablica 4).<sup>66</sup> Inducirani regulacijski limfociti T opisani su u nekoliko eksperimentalnih modela transplantacije i autoimunskih bolesti kao što su: složena teška imunodeficijencija, upalne crijevne bolesti, autoimunosni dijabetes i autoimunosni encefalomijelitis.<sup>66-71</sup>

Levings i suradnici otkrili su utjecaj i drugih citokina na diferencijaciju naivnih limfocita T u inducirane regulacijske limfocite T. Pokazali su, da su za diferencijaciju naivnih CD4<sup>+</sup> limfocita T iz periferne krvi, koji su stimulirani putem njihovih receptora - TCR u odsutnosti antigen predočnih stanica, potrebni i IL-10 i IFN- $\gamma$ , ali ne i TGF- $\beta$ .<sup>72</sup> Barrot i suradnici dokazali su da je moguća diferencijacija CD4<sup>+</sup> limfocita T u inducirane regulacijske limfocite T nakon ponovljene stimulacije



antigenom ili nespecifične anti-CD3 stimulacije *in vitro*, uz prisutnost deksametazona, vitamina D3, anti-IL-12, IFN- $\gamma$  i IL-4 antitijela.<sup>73</sup>

Još uvijek nije poznato koji je to stanični dodir ili topljivi čimbenik potreban da inducirani regulacijski limfocit T suprimira aktivnost pomoćničkih limfocita. Dieckmann i suradnici govore o «katalitičkoj» ulozi regulacijskih limfocita T. Pokazali su da pod utjecajem regulacijskih limfocita T, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> limfociti postaju anergični. Također regulacijski limfociti T potiču i sintezu IL-10 u tim limfocitima. Ti anergični CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> limfociti dovode zatim do supresije proliferacije singeničnih CD4<sup>+</sup> limfocita T putem IL-10, koji je neovisan o izravnom staničnom dodiru. Prema tome, smatra se da se supresija događa u dva uzastopna koraka: prvi je o staničnom dodiru ovisna «transmisija» anergije iz regulacijskih limfocita T na druge limfocite T, drugi je neovisan o staničnom dodiru, a supresija drugih pomoćničkih limfocita posredovana je citokinima.<sup>74,75</sup>

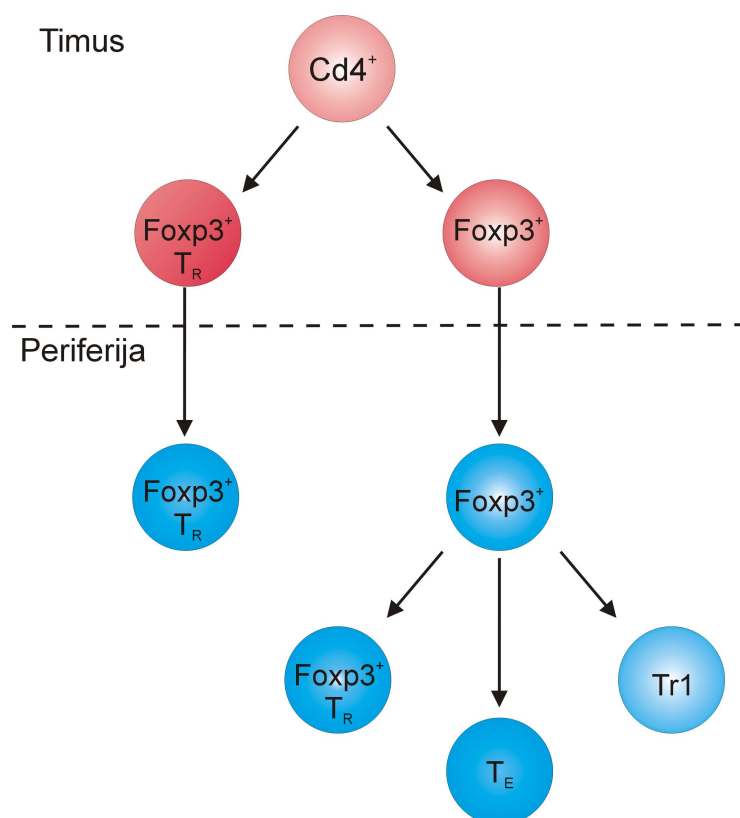
Obje populacije regulacijskih limfocita, prirođeni i inducirani, djeluju inhibitorno na druge limfocite T putem limfocit T - limfocit T interakcije (dodira s ciljnim limfocitima) i/ili putem imunosupresivnih citokina, anergični su, ne luče IL-2, za vlastitu aktivaciju potreban im je TCR, mogu nastati bez prisutnosti profesionalnih antigen predložnih stanica, te potiču antigen-nespecifičnu supresiju drugih limfocita T (tablica 4).<sup>48,76</sup>

Do danas se vrlo malo zna o molekularnim mehanizmima nastanka regulacijskih limfocita. McHugh i suradnici uspoređivali su, tehnologijom *DNA microarray*, različit izražaj gena između CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> i CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> limfocita T. Otkrili su da je 29 gena različito izraženo u stanju mirovanja između tih dviju populacija, dok je 77 gena različito izraženo za vrijeme aktivacije. Većina gena koji pokazuju pojačan izražaj u populaciji CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> limfocita T upućuju na prijašnji aktivirani fenotip (CD45RB<sup>low</sup> (CD45R0), CD152 (CTLA-4), CD103, OX-40 i 4-1BB (CD137)). Također, dokazali su pojačan izražaj kemokina CC (MIP-1 $\alpha$  i MIP-1 $\beta$ ), proupalnog proteina IL-17 i

imunosupresivnog citokina IL-10. No ipak, smatra se da ni jedan od tih gena nije presudan za nastanak i djelovanje regulacijskih limfocita T. Mnogi su stanični i površinski receptori pojačano izraženi na  $CD4^+CD25^+$  limfocitima T, uključujući i GITR, člana obitelji TNF receptora. Pokazano je da su protutijela na GITR spriječila supresijsko djelovanje regulacijskih limfocita T, pa se smatra da GITR ima kostimulacijsku ulogu u aktivaciji supresijskog djelovanja regulacijskih limfocita T.<sup>77</sup>

Nedavnim otkrićem da je transkripcijski čimbenik Foxp3, obvezatan za razvoj i djelovanje regulacijskih limfocita T, učinjen je velik iskorak u razumijevanju molekularne osnove tih stanica (slika 6).<sup>78-81</sup> Pokazano je da u miša i ljudi izražaj mRNA za Foxp3 znatno povišen unutar regulacijskih limfocita T u timusu i na periferiji<sup>82</sup>, te da je retroviralna transdukcija naivnih  $CD4^+CD25^-$  limfocita T s Foxp3 dovoljna da potakne nastanak regulacijskih limfocita T ( $CD4^+CD25^+$ ).<sup>80,81</sup> Oštećenje gena za Foxp3 sprječava nastanak regulacijskih limfocita T, te se u miša razvija smrtonosna autoimunosna bolest.<sup>81</sup> Mutacije gena za *Foxp3* odgovorne su za nastanak limfoproliferativnih bolesti u miša, te za poliendokrinopatiju, enteropatiju i X-vezani nasljedni sindrom u ljudi.<sup>83</sup>

Pokazano je da je TGF- $\beta$  glavni čimbenik koji potiče Foxp3 na promjenu perifernih naivnih limfocita T ( $CD4^+CD25^-$ ) u regulacijske limfocite T ( $CD4^+CD25^+$ ) (slika 6).<sup>84-86</sup>



Slika 6. Povezanost različitih populacija regulacijskih limfocita T.

CD4<sup>+</sup> limfociti T koji izražavaju Foxp3 napuštaju timus kao funkcionalno potpuno zreli regulacijski limfociti T. Na periferiji se, u dodiru s antigenom, CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> limfociti T, diferenciraju ili u efektorske limfocite T (T<sub>E</sub>) ili u regulacijske limfocite T (T<sub>R</sub>). Nastanak induciranih regulacijskih limfocita T (Tr<sub>1</sub>) potpomognut je IL-10, dok TGF-β pojačava djelovanje Foxp3 (preuzeto iz <sup>78</sup>).

#### 2.4.3. Indukcija i regulacija limfocita T nezrelim dendritičkim stanicama

Budući da se centralna tolerancija, koja odstranjuje potencijalno štetne autoreaktivne limfocite T, pokazala nedovoljna, periferni mehanizmi preuzeli su važnu ulogu supresije autoreaktivnih limfocita. Dendritičke su stanice profesionalne antigen predodčne stanice, koje imaju izvanrednu sposobnost stimulacije nezrelih limfocita T i započinjanja primarnog imunološkog odgovora.<sup>87</sup> Najnovija istraživanja dokazala su da dendritičke stanice imaju jednu od ključnih uloga u imunološkom sustavu: a) djeluju kao efektorske stanice u prirođenoj imunosti prema mikrobima, b) reguliraju T - limfocitni odgovor, i c) potiču perifernu toleranciju tako što ili dovode do anergije

efektorskih  $CD4^+$  i  $CD8^+$  limfocita ili potiču diferencijaciju nezrelih limfocita T u regulacijske limfocite T koji luče IL-10.<sup>87-90</sup> Različite uloge dendritičkih stanica ovise o njihovoj subpopulaciji, podrijetlu i stadiju zrelosti. Postoje dvije subpopulacije: a) mijeloične (M-DC) i b) plazmocitoidne dendritičke stanice (P-DC).<sup>74,91,92</sup> Mijeloična subpopulacija, u kojoj morfološki prevladavaju monociti, okarakterizirana je izražajem mijeloičnih biljega CD13, CD33,  $\beta$ -2 integrina CD11c, ILT 1 (engl. *the activatory immunoglobulin-like trnascript receptors*), niskom razinom CD123 (receptor za IL-3), sposobnošću lučenja IL-12.<sup>74,91,93,94</sup> Plazmocitoidna subpolacija nema mijeloičnih biljega, a morfološki je okarakterizirana plazma stanicama, te izražajem CD4 (inhibitorni ILT3 receptor), CD62L, CD123, lučenjem INF- $\gamma$ .<sup>74,91,93,95-97</sup> S obzirom na svoju sposobnost da induciraju ili Th1 ili Th2, mijeloične i plazmacitoidne dendritičke stanice se dijele na DC1 i DC2.<sup>94</sup>

Jonuleit i suradnici pokazali su da djelovanje dendritičkih stanica ovisi o stadiju zrelosti, odnosno da nezrele i zrele dendritičke stanice potiču stvaranje potpuno različitog fenotipa limfocita T. Proupalni Th1 odgovor potaknut je zrelim dendritičkim stanicama, dok je s druge strane, polarizacija prema neproliferativnim, induciranim regulacijskim limfocitima T potaknuta nezrelim dendritičkim stanicama. U radu su stimulirali nezrele (naivne) alogenične  $CD4^+$  limfocite zrelim ( $CD83^+$ ) i nezrelim ( $CD83^-$ ) dendritičkim stanicama. Ponovljena stimulacija zrelim dendritičkim stanicama rezultirala je jakom ekspanzijom aloreaktivnih limfocita T i nastankom isključivo Th1. S druge stane, nakon ponovljene stimulacije nezrelim dendritičkim stanicama nastaju inducirani regulacijski limfociti T ( $TR_1$ ). Vrlo nizak proliferativni odgovor tih limfocita ne može se poboljšati ni ponovnom stimulacijom zrelim dendritičkim stanicama, ni IL-2. Stimulacija  $CD4^+$  limfocita zrelim dendritičkim stanicama dovodi do pojačanog izražaja CD154 (CD40 ligand), CD69 i CD70, te lučenja velikih količina INF- $\gamma$  i IL-2, odnosno tipičnog Th1 citokinskog profila.  $CD4^+$  limfociti koji su aktivirani nezrelim dendritičkim stanicama pojačavaju izražaj CD152 (CTLA-4). Nakon

prve stimulacije ti limfociti pokazuju Th0 citokinski profil (stvaraju umjerene količine i INF- $\gamma$  i IL-4), no nakon ponovljene stimulacije zrelim dendritičkim stanicama, ti limfociti gube sposobnost sinteze INF- $\gamma$ , IL-2 i IL-4, ali luče znatno veće količine IL-10, i time imaju karakterističan TR<sub>1</sub> citokinski profil. U ko-kulturi induciranih regulacijskih limfocita T i aloreaktivnih Th1, pokazano je da inducirani regulacijski limfociti T gotovo u potpunosti inhibiraju antigenom potaknutu proliferaciju Th1 i to izravnim dodiranjem između Th1 i TR<sub>1</sub> (TR<sub>1</sub>/Th1 interakcija preko površine ili topljivih molekula - o dodiru ovisna supresija). Na osnovi provedenih eksperimenata nije se mogla isključiti ni uloga IL-10, TGF- $\beta$  i CTLA-4 u supresiji Th1, no uporaba neutralizirajućih monoklonskih protutijela na IL-10, TGF- $\beta$  i CTLA-4 nije zaustavila inhibitorni učinak induciranih regulacijskih limfocita T. Također, dokazano je da inhibicijski učinak induciranih regulacijskih limfocita T antigen-nespecifičan i može se djelomice (približno 70%) spriječiti velikim količinama IL-2.<sup>98</sup>

Dhodapkar i suradnici pokazali su da nakon subkutane aplikacije nezrelih mijeloidnih dendritičkih stanica zajedno s influenza matrix peptidom dolazi do stvaranja antigen specifičnih CD8<sup>+</sup> regulacijskih limfocita T koji proizvode IL-10 i inhibiraju CD4<sup>+</sup>Th.<sup>99</sup>

Za razliku od mijeloidnih dendritičkih stanica koje, isključivo ovisno o stadiju zrelosti, potiču stvaranje regulacijskih limfocita, CD11c-plazmocitoidne dendritičke stanice, aktivirane IL-3 i CD40-ligandom, potiču diferencijaciju CD8<sup>+</sup> limfocita T u CD8<sup>+</sup> regulacijske limfocite T koji luče IL-10. Ti CD8<sup>+</sup> regulacijski limfociti T, slično kao i inducirani regulacijski limfociti T, anergični su i suprimiraju primarni T - limfocitni odgovor putem IL-10.<sup>100</sup>

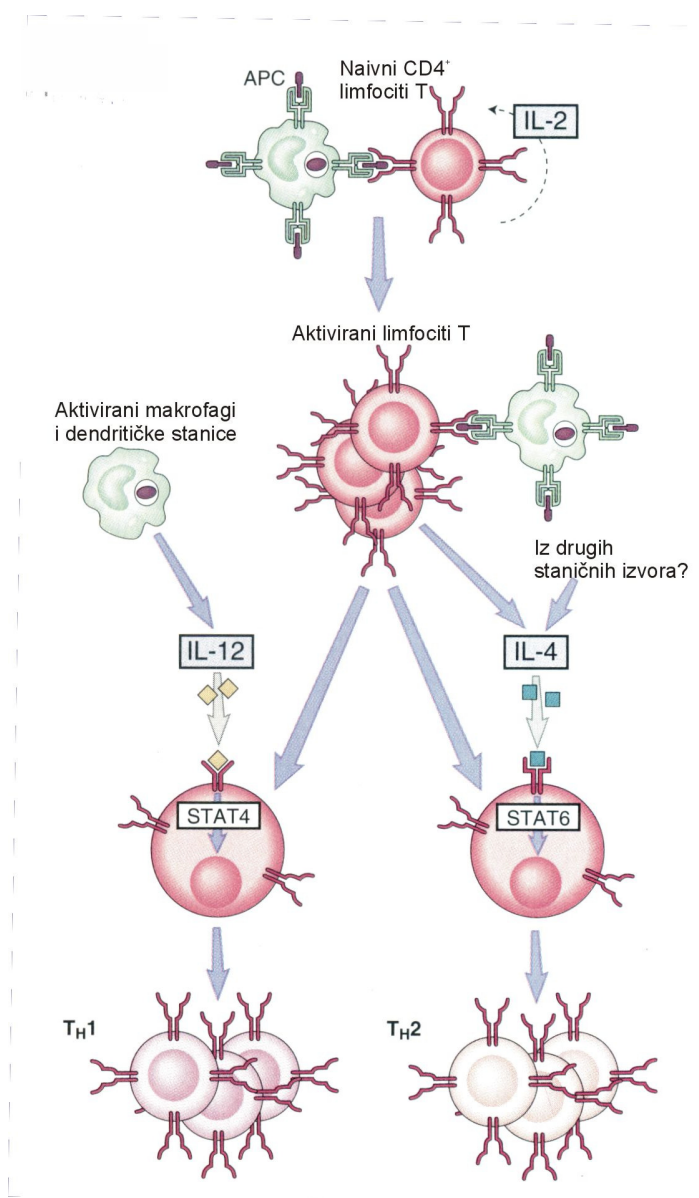
Danas se vjeruje da upravo nezrele mijeloidne dendritičke stanice imaju važnu ulogu u održavanju periferne tolerancije. Naime, u odsutnosti "opasnog signala" (upale), te stanice migriraju u regionalne limfne čvorove gdje mogu učiniti snošljivim limfocite T tako što potiču njihovu

diferencijaciju u regulacijske limfocite T. Prema toj hipotezi, nezrele mijeloične dendritičke stanice djeluju poput “policajaca” u imunološkom sustavu koji održava toleranciju prema vlastitim antigenima.<sup>101,102</sup>

## 2.5. Profil citokina u JIA

Suvremena se istraživanja JIA usredotočuju na mrežu citokina koja je uključena u imunološki odgovor.<sup>103-110</sup> U središtu su zanimanja citokini koje luče limfociti T, a mogu se razvrstati u dvije osnovne skupine – Th1 i Th2, ovisno o tome koji ih razred pomoćničkih stanica luči.<sup>111,112</sup> Limfociti Th1 i Th2 nastaju od zajedničke prethodničke stanice Th0, koja luči IL-2 potreban za njihovu diferencijaciju. Diferencijaciju Th0 u Th1 potiče IL-12, dok diferencijaciju Th0 u Th2 potiče IL-4 (slika 7). S druge strane IL-4 koči prijelaz Th0 u Th1, a INF- $\gamma$  koči prijelaz Th0 u Th2. Unutarstanične bakterije i njihovi proizvodi, te unutarstanični paraziti aktiviraju makrofage koji su glavni izvor IL-12. Neki mikrobi izravno potiču makrofage na lučenje IL-12, dok drugi potiču lučenje IL-12 neizravno; na primjer, virusi i neke bakterije stimuliraju NK-stanice (engl. *natural killer cells*) da pojačano luče INF- $\gamma$ , koji potiče makrofage na lučenje IL-12. IL-12 se veže za receptor na aktiviranim limfocitima T, aktivira prijenos signala preko specifične signalne molekule STAT4 (engl. *signal transducers and activators of transcription*) i time potiče diferencijaciju Th0 u Th1 (slika 7). Sam IL-12 također potiče sintezu INF- $\gamma$  u limfocitima T, NK-stanicama, makrofazima i limfocitima B. Danas je poznato da još jedan citokin, IL-18, stimulira sintezu INF- $\gamma$  u limfocitima T i NK-stanicama. Prema tome mreža citokina pozitivnom povratnom spregom usmjeruje imunoreakciju u Th1-smjeru.<sup>113-118</sup>

IL-4 potiče diferencijaciju Th0 u Th2, preko signalne molekule STAT6. Budući da su, prema današnjim spoznajama, Th2 limfociti glavni izvor IL-4, još se istražuje koji je to zapravo drugi izvor IL-4 koji potiče diferencijaciju Th0 u Th2. Istraživanja su pokazala da aktivirani limfociti T luče manju količinu IL-4 za vrijeme početne aktivacije. Druge stanice, kao što su mastociti, bazofili, eozinofili i NK1<sup>+</sup> T-limfociti, također luče IL-4. Pokazano je da čak i male razine IL-4 u početku imunološkog odgovora, mogu nadjačati signal za Th1 diferencijaciju, i biti dovoljne za prijelaz Th0 u Th2 (slika 7).<sup>113-118</sup>



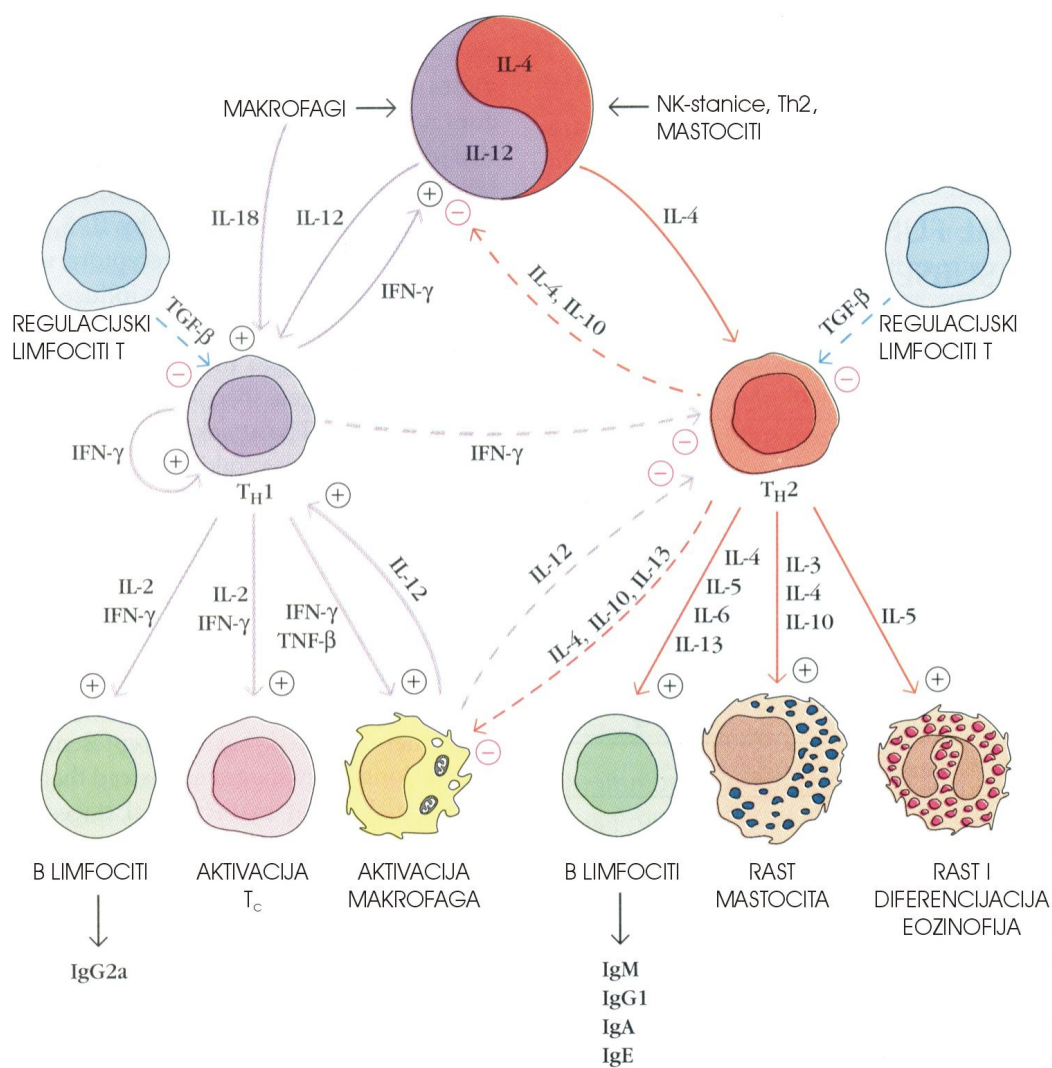
Slika 7. Diferencijacija Th0 u Th1 i Th2. Preuzeto iz <sup>113</sup>

Glavni citokini Th1, koje luči razred pomoćničkih limfocita Th1, jesu: IL-2, IFN- $\gamma$  i TNF- $\beta$ . Oni djeluju proupalno i potiču stvaranje staničnog efekorskog kraka imunosne reakcije, tj. aktivaciju makrofaga i efekorskih CD8<sup>+</sup> citotoksičnih limfocita T (slika 8). Tome nasuprot, citokini Th2-skupine, u koje ubrajamo IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 i TGF- $\beta$ , imaju protuupalno djelovanje te



poticajno djelovanje na limfocite B što znači da promiču humoralni oblik imunosti (slika 8).<sup>111, 119-</sup>

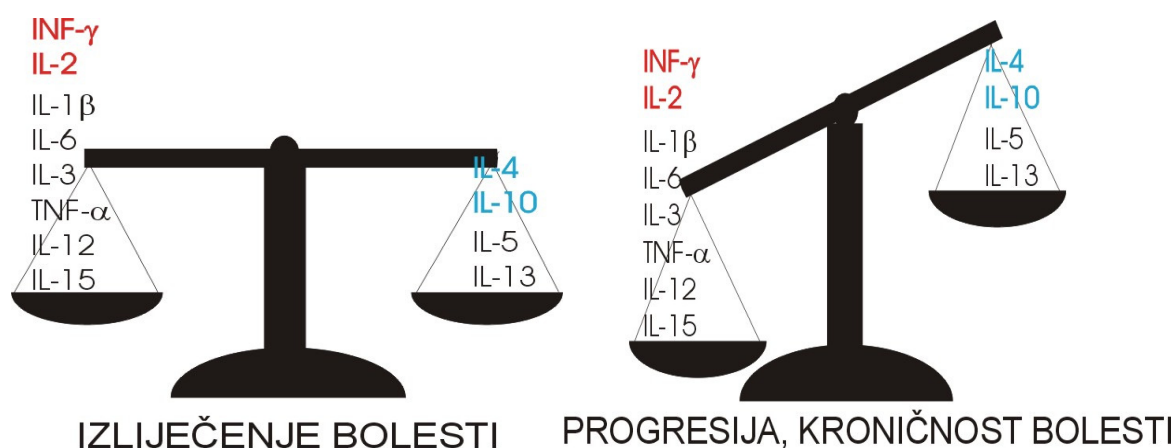
124



Slika 8. Djelovanje citokina Th1 i Th2. Pune strelice označavaju stimulacijski učinak (+); isprekidane strelice inhibitorni učinak (-). Ljubičaste strelice označavaju citokine Th1, a crvene Th2. Preuzeto iz.<sup>114</sup>

U dosadašnjim istraživanjima došlo se do pretpostavke da ravnoteža, odnosno neravnoteža između proupalnih i protuupalnih citokina ima važnu ulogu u izlječenju, odnosno daljnjoj progresiji i kroničnosti RA i JIA (slika 9).<sup>121,122,125</sup>

Povišene razine citokina Th1 i manjak citokina Th2 (posebice IL-4) u serumu, sinovijalnoj tekućini i sinoviji, opisane su u zadnjim istraživanjima RA i JIA (slika 9).<sup>120, 122, 126</sup>



Slika 9. Ravnoteža/neravnoteža citokina u juvenilnom idiopatskom artritisu (JIA)

No, u pojedinim tipova JIA identificiran je i suprotan profil citokina, odnosno povišene razine citokina Th2.<sup>119,127</sup> Na primjer, Murray i suradnici češće su detektirali mRNA IL-4 u bolesnika s oligoartikularnim tipom u usporedbi s bolesnicima s poliartrikularnim tipom JIA. Također su češće detektirali mRNA IL-4 i IL-10 u ne-erozivnom tipu bolesti u usporedbi s erozivnim tipom. Na temelju tih rezultata zaključili su da se IL-4, vjerojatno u kombinaciji s IL-10, odnosno citokini Th2 češće detektiraju u sinoviji bolesnika s ograničenom destrukcijom zgloba.<sup>119,127</sup> Raziuddin i suradnici pokazali su da je u sistemskom tipu bolesti jače izlučivanje citokina IL-4 i IL-10, ali ne i citokina IFN- $\gamma$  i IL-2 iz stimuliranih mononuklearnih stanica periferne krvi.<sup>125</sup>

### 2.5.1. Interleukin 10 (IL-10)

Interleukin-10 prvi je put opisan kao proizvod mišjih Th2 limfocita nakon stimulacije s lecitinom. U miša glavni izvor IL-10 unutar B-limfocitne populacije su oni limfociti B koji izražavaju CD5 (B1) i CD11 (Mac-1). Mišji keratinociti također proizvode IL-10.<sup>128</sup>

Humani IL-10 proizvode Th2 limfociti, CD8<sup>+</sup> limfociti, B-stanični limfomi, monociti nakon stanične aktivacije potaknute bakterijskim lipopolisaharidima i mastocitima (slika 8). Sintezu IL-10 u monocitima inhibiraju IL-4 i sam IL-10.<sup>113-118</sup>

Gen za humani IL-10 nalazi se na kromosomu 1, građen je od 4 eksona, a proizvod je toga gena protein u obliku homodimera veličine 160 aminokiselina, molekulske mase 18 kDa. Humani i mišji IL-10 u potpunosti su istovjetni u 73% aminokiselina.<sup>128</sup>

Do danas je kloniran mišji receptor za IL-10. To je protein veličine približno 110 kDa, na koji se specifično veže IL-10. Po građi sliči receptorima za interferon. CD nomenklatura za receptor je CDw210.<sup>113-118,128</sup>

**2.5.1.1. Biološki učinci IL-10.** IL-10 inhibira kostimulacijske aktivnosti mnogih antigen predodnih stanica (makrofaga, B-limfocita i dendritičkih stanica), smanjuje aktivaciju limfocita T i izlučivanje IL-2, INF- $\gamma$  i TNF- $\beta$ . Iako pojačava sintezu imunoglobulina, on djeluje i kao imunosupresivni citokin na makrofage (smanjuje izlučivanje IL-1, TNF i IL-6) i staničnu imunost. Smanjujući izlučivanje INF- $\gamma$  od strane makrofaga, on blokira diferencijaciju limfocita Th0 u Th1 te proliferaciju CD8<sup>+</sup> limfocita, dok ne ometa diferencijaciju Th2 (slika 8). Potrebno je istaknuti da je taj utjecaj IL-10 na diferenciranje citokinskog profila limfocita T posredan jer se događa preko antigen predodne stanice i to neovisno o tome je li antigen procesiran ili je u intaktnom obliku. Dakle, IL-10 svoje selektivno djelovanje na Th1 limfocite i na CD8<sup>+</sup> limfocite ostvaruje preko

određenog tipa antigen predočnih stanica potrebnih za odgovarajuću stimulaciju tih limfocitnih subpopulacija.<sup>128</sup>

Limfociti B koji izražavaju molekulu CD5 glavni su izvor IL-10 unutar B-limfocitne populacije. To je neobična skupina stanica koja se u miša nalazi u peritonejskoj šupljini. Smatra se da predstavljaju samoobnavljajuću populaciju stanica čiju ulogu regulira upravo IL-10.<sup>113-118,128</sup>

IL-10 inhibira *in vivo* i sekreciju TNF- $\alpha$  i na taj način zaštićuje organizam od smrtonosnog djelovanja endotoksina u septičkom šoku.<sup>128</sup> On djeluje poput «kostimulatora» u procesu proliferacije mastocita (u prisutnosti IL-3 i/ili IL-4) i limfocita. Sam nema utjecaja na proliferaciju mastocita, dok u kombinaciji s IL-4 ima isti utjecaj kao i sam IL-3. Optimalan razvoj mastocita postignut je zajedničkim djelovanjem IL-3, IL-4 i IL-10. Smatra se da IL-10 ima određenu ulogu u nastanku mastocitoze, koja se često zamjećuje nakon infekcije parazitima, tako što pojačava učinak IL-3 i IL-4.<sup>128</sup> IL-10, također, djeluje kao «kostimulator» u procesu razvoja zrelih i nezrelih timocita (zajedno s IL-2, IL-4 i IL-7).<sup>128</sup> Ima važnu ulogu i u regulacijskim limfocitima T, odnosno inducirani regulacijski limfociti T luče imunosupresivne citokine, kao što je IL-10, te na taj način djeluju na druge limfocite T ili antigen predočne stanice.<sup>48</sup>

Gen koji kodira jedan od proteina Epstein - Barrova virusa, BCRF1, vrlo je sličan genu za IL-10. Na razini proteina istovjetnost je nešto manja (84%), pa je i specifična aktivnost tzv. virusnog IL-10 niža u usporedbi s humanim IL-10. Jedan od načina kojim Epstein-Barr virus interferira s obranom domaćina od infekcije tim virusom objašnjava se upravo preko proizvodnje virusnog IL-10. Naime, virusni IL-10 proizvodi se u EBV-inficiranim B-limfocitima za vrijeme produktivne faze EBV proliferacije. Smatra se da taj virusni IL-10 suprimira antivirusnu imunoreakciju specifično inhibirajući sintezu INF- $\gamma$  i ostalih citokina koji bi inače ubili virusom zaraženu stanicu.<sup>118,128</sup>

### 2.5.2. Interleukin 18 (IL-18)

Sekrecija citokina Th1 i Th2, tj. usmjerenje limfocita T u Th1 ili Th2 oblik, ovisi ponajprije o razini IL-12 i INF- $\gamma$  (Th1), odnosno IL-4 (Th2), no potrebno je također istražiti i druge citokine koji su uključeni u njihovo lučenje, regulaciju i diferencijaciju imunološkog odgovora. Nedavno je pokazano da citokin IL-18 stimulira sintezu INF- $\gamma$  i time pojačava Th1-imunosni odgovor (slika 8).<sup>129,130</sup>

IL-18 opisan je kao čimbenik indukcije sinteze IFN- $\gamma$ .<sup>129,130</sup> Gen za humani IL-18 nalazi se na kromosomu 11, a proizvod toga gena je neglikolizirani protein veličine 193 aminokiselina, molekulske mase 24 kDa. Humani i mišji IL-18 u potpunosti su istovjetni u 65% aminokiselina, dok je istovjetnost sa zečjim IL-18 puno veća i iznosi 91%.<sup>128</sup>

Aktivni IL-18 nastaje, slično kao IL-1 $\beta$ , iz veće molekule tzv. pro-IL-18, cijepanjem IL-1 $\beta$ -konvertazom u makrofagima, monocitima, Kupfferovim stanicama, dendritičkim stanicama, keratinocitima, sinovijskim fibroblastima, stanicama kore nadbubrežne žlijezde, osteoblastima, hondroцитima i astroцитima.<sup>128-132</sup>

Receptor za IL-18 je heterodimer čiji jedan lanac veže IL-18, a drugi prenosi signal u stanicu preko nekoliko signalnih molekula: za IL-1R vezane kinaze (IRAK), za TNFR-vezanog faktora 6, NF- $\kappa$ B i MyD88.<sup>128</sup>

Protein koji veže IL-18 (IL-18BP, prema engl. *IL-18 binding protein*) nedavno je identificiran kao specifični inhibitor bioaktivnosti IL-18. Iako se IL-18BP ne podudara s membranskim receptorom za IL-18, on pokazuje jak afinitet za IL-18, te se ponaša kao topivi receptor.<sup>130,132</sup> Dokazano je da IL-18BP selektivno i učinkovito smanjuje indukciju INF- $\gamma$  i IL-8 potaknutu s IL-18, a *in vitro* smanjuje aktivaciju transkripcijskog čimbenika nuklearnog faktora  $\kappa$ B (NK- $\kappa$ B).<sup>130,132,133</sup> Stoga, čini

se da je imunološki odgovor posredovan s IL-18 određen, zapravo, ravnotežom između IL-18 i IL-18BP.

**2.5.2.1. Biološki učinci IL-18.** Danas je poznato da IL-18 ima širok raspon bioloških aktivnosti, posebice na limfocitima. IL-18 stimulira sintezu INF- $\gamma$  u T-limfocitima i NK-stanicama, sintezu IL-2 i GM-CSF (čimbenik poticanja granulocitnih i makrofagnih kolonija, engl. *granulocyte - macrophage colony-stimulating factor*) i posljedičnu proliferaciju aktiviranih T-limfocita, pojačava citotoksičnu aktivnost NK-stanica i usmjeruje, zajedno s IL-12, imunosnu reakciju prema proupalnom (Th1) odgovoru (slika 8).<sup>128</sup> Nedavno je otkriveno da djeluje kao okidač (engl. *trigger*) u kaskadi upalnih citokina, uključujući IL-1 $\beta$  i kemokine, tako što potiče limfocite T i NK-stanice na izlučivanje TNF- $\alpha$ .<sup>128,130,132</sup> Također, inhibira proizvodnju IL-10 u stimuliranim (konkanavalinom) perifernim mononuklearnim stanicama. Od velike je važnosti istraživanje uloge IL-18 u mnogim patološkim stanjima. Na primjer, u zaraznim bolestima ima odlučujuću ulogu u poticanju upalnog odgovora za vrijeme bakterijske sepse, koji može uzrokovati oštećenja jetara i zatajenje mnogobrojnih organa.<sup>134</sup> S druge strane, kao i drugi proupalni citokini, ima važnu ulogu u obrani domaćina, što je i pokazano na životinjskom eksperimentalnom modelu u kome je preventivno davanje IL-18 spriječilo eksperimentalno izazvanu bakterijsku infekciju (plućnu i diseminiranu infekciju izazvanu *Cryptococcus neoformans*).<sup>135</sup> Pokazao se važan i u supresiji alergije budući da potiče aktivirane limfocite B na lučenje INF- $\gamma$  koji inhibira stvaranje IgE.<sup>136</sup> Njegov abnormalni izražaj povezan je s razvojem dijabetesa tipa 1.<sup>137</sup> Pojačano lučenje IL-18 nađeno je u bolesnika s Crohnovom bolešću.<sup>138</sup> Ima zaštitnu ulogu u nastanku kroničnog GVHD (engl. *graft versus host disease*), a pokazano je da njegova inhibicija povećava smrtnost izazvanu akutnim GVHD nakon transplantacije koštane srži.<sup>128</sup>

Uz navedena djelovanja smatra se da ima važnu ulogu u RA. On sinergistički s IL-12 i IL-15 potiče lučenje INF- $\gamma$  u sinoviji, a također i sebe samoga. Pri tome važno je poznavati tri činjenice. Prvo, lučenje GM-CSF i NO (dušičnog oksida) iz makrofaga potaknuto je IL-18 i nije ovisno o IL-12 i IL-15, što je u suprotnosti s njihovim sinergističkim djelovanjem na lučenje TNF- $\alpha$ . Drugo, NO inhibira IL-1 $\beta$ -konvertazu, čime je blokiran nastanak aktivnog IL-18. Prema tome IL-18, na taj način što potiče lučenje NO, smanjuje svoju aktivnost. Treće, lučenje IL-18 iz sinovijalnih fibroblasta pojačavaju IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$ .<sup>139-142</sup>

Lokalna aktivacija makrofaga dovodi do lučenja IL-1, TNF- $\alpha$  i metaloproteinaza u upalnoj leziji. Ta je aktivacija posredovana citokinima i imunosnim kompleksima, ali u prvom redu ovisi o staničnom dodiru aktiviranih limfocita T ili sinoviocita.<sup>140-142</sup> Kao i IL-15, IL-18 pojačava stanični dodir u upalnom tkivu, na primjer, u sinoviji u RA. Također povećava izražavanje adhezivnih molekula, aktivnost ciklooksigenaze te otpuštanje glikozaminoglikana.<sup>139</sup>

Saha i suradnici dokazali su aktivnu IL-1 $\beta$ -konvertazu u ljudskoj zgloboj hrskavici.<sup>143</sup> IL-1 $\beta$ -konvertaza značajno je povišena u bolesnika s osteoartritisom, a dovodi do lučenja i aktivnog IL-1 $\beta$  i IL-18. U sinovijalnoj tekućini bolesnika s RA nađena je značajno povišena razina IL-18.<sup>129,130</sup> U nedavno provedenoj studiji, Olee i suradnici pokazali su da IL-18 potiče proupalni i katabolički odgovor u normalnoj ljudskoj hrskavici.<sup>131</sup> Prema ovom istraživanju, blokada IL-18 bila bi vrlo obećavajuća u liječenju RA, no to treba uzeti s velikim oprezom. Treba uzeti u obzir da IL-18 potiče lučenje NO koji blokira aktivnost IL-1 $\beta$ -konvertaze. Prema tome, njegova blokada pojačala bi aktivnosti IL-1 $\beta$ -konvertaze i time sazrijevanje IL-18 i IL-1 $\beta$ , što sve potiče upalu i destrukciju tkiva. Također, on inhibira osteoklastnu formaciju,<sup>144</sup> tako da blokiranje aktivnosti IL-18 može imati dugotrajan učinak na metabolizam kosti, i možda čak uzrokovati osteoporozi.

### 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

---

Temeljni ciljevi istraživanja bili su sljedeći:

1. ispitati razinu proupalnog IL-18 i protuupalnog IL-10 citokina u serumu i nadtalogu podraženih limfocita, te udio i broj regulacijskih limfocita T u perifernoj krvi bolesnika s JIA u usporedbi s kontrolnom skupinom djece;
2. ispitati razinu citokina IL-10 i IL-18 te udio i broj regulacijskih limfocita T u bolesnika s JIA ovisno o fazi i tipu bolesti (oligoartikularni tip, poliartikularni tip i sistemski tip);
3. ispitati razliku u profilu secerniranih citokina i razliku u udjelu i broju regulacijskih limfocita T između pojedinih tipova JIA ovisno o fazi bolesti;
4. ispitati odnos razine proupalnog i protuupalnog citokina, te broja i udjela regulacijskih limfocita T u aktivnoj fazi i remisiji JIA u odnosu prema laboratorijskim nalazima koji u praksi služe za ocjenu upalne aktivnosti bolesti (brzina sedimentacije eritrocita, razina C-reaktivnog proteina, anemiji, trombocitozi, disproteinemiji s povišenom razinom  $\gamma$ -globulina i  $\alpha_2$ -globulina);
5. usporediti profil secerniranih citokina iz seruma i sinovijalne tekućine u manjoj skupini bolesnika u kojoj je učinjena dijagnostička i terapijska punkcija zgloba.



## 4. ISPITANICI I METODE RADA

---

### 4.1. Ispitanici

U istraživanje je uključeno 50-ero djece s dijagnozom JIA koja su primljena na liječenje u Kliniku za pedijatriju, KBC Zagreb, u vremenu od prosinca 2002. do prosinca 2004. godine, a u kojih je dijagnoza postavljena na temelju ILAR kriterija iz godine 1997.<sup>9</sup> Bolesnici su podijeljeni u tri skupine ovisno o tri najčešća tipa JIA: 1) oligoartikularni tip; 2) poliartikularni tip; i 3) sistemski tip JIA. U svih je bolesnika učinjena analiza proupalnog (IL-18) i protuupalnog (IL-10) citokina u serumu i u nadtalogu kultura podraženih limfocita. U njih 16 (16/50, 32%) s oligoartikularnim tipom učinjena je i dijagnostička i terapijska punkcija zgloba, čime je omogućena istodobna analiza razine citokina u sinovijalnoj tekućini (slika 10a i 10b). U 34-ero djece učinjena je još i analiza broja regulacijskih limfocita T (definiranih kao  $CD4^+CD25^{++}$  i  $CD4^+CD25^{++}CCR4^+$ )<sup>50-53,55-56,64</sup> u perifernoj krvi. Kontrolnu skupinu činilo je 23-oje djece, koja nisu imala kliničko-laboratorijskih znakova upale, a kojima se zbog drugih (neupalnih) bolesti uzimala venska krv za dijagnostiku.

U svih bolesnika uzeta je venska krv u aktivnoj fazi bolesti i u remisiji, odnosno u fazi mirovanja. Aktivna faza bolesti definirana je bolnim, otečenim i toplim zglobovima s ograničenim opsegom kretanja u zglobovima, te povišenom tjelesnom temperaturom u sistemskom tipu (uz isključenje moguće infekcije).



Slika 10a. Dijagnostička punkcija koljenskog zgloba



Slika 10b. Terapijska punkcija koljenskog zgloba (intraartikularno davanje kortikosteroida)

Analiza citokina i regulacijskih ( $CD4^+CD25^{++}$  i  $CD4^+CD25^{++}CCR4^+$ ) limfocita T učinjena je u Zavodu za imunologiju Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Zagreb i Laboratoriju

za molekularnu imunologiju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga (Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu).

## **4.2. Metode rada**

### **4.2.1. Anamneza i fizikalni pregled**

U svih je bolesnika učinjena rutinska reumatološka obrada (anamneza, fizikalni pregled i laboratorijske pretrage) na osnovi koje je postavljena dijagnoza. U anamnezi je osobita pozornost bila usmjerena na tegobe (bol, oteklina, toplina, poremećena funkcija) i vrijeme njihove pojave (npr. jutarnja ukočenost karakteristična je za JIA), te podatke vezane za tjelesnu temperaturu (u reumatskim bolestima povišena tjelesna temperatura nastupa obično u prijedpodnevnim satima, temperature nisu kontinuirane, već pseudosepične ili povremene i njihova je pojava vezana i uz pogoršanje osnovne bolesti, odnosno egzacerbacije). Potanka obiteljska anamneza uzeta je u svih bolesnika. U fizikalnom pregledu osobita pozornost bila je usmjerena na sustav organa za kretanje.

### **4.2.2. Laboratorijske pretrage**

U svih bolesnika analizirani su sljedeći laboratorijski pokazatelji:

- brzina sedimentacije eritrocita (SE);
- hematokrit (Htc), hemoglobin (Hb), broj trombocita (Trc) i broj leukocita (L) u perifernoj krvi;
- elektroforeza serumskih proteina (frakcije  $\gamma$ -globulin i  $\alpha_2$ -globulin);

- serumska razina imunoglobulinskih razreda (IgG, IgA i IgM);
- serumska razina C-reaktivnog proteina (CRP) (turbidimetrijski);
- hepatogram (aspartat transaminaza (AST), alanin transaminaza (ALT),  $\gamma$ -glutamil-transpeptidaza ( $\gamma$ -GT) i alkalna fosfataza (AF);
- serumska razina reumatoidnog faktora (RF) (turbidimetrijski);
- titar anti-nuklearnih protutijela (ANF) (indirektnom imunofluorescencijom);
- te razina citokina u serumu i nadtalogu kultura podraženih limfocita *in vitro* (*vide infra*).

Navedeni pokazatelji izmjereni su prilikom postavljanja dijagnoze bolesti (aktivna bolest) i u remisiji bolesti. Svi uzorci analizirani su na isti način, s pomoću postupaka uobičajenih u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Zagreb.

#### **4.2.3. Analiza citokina u serumu i kulturi podraženih limfocita *in vitro***

Venska krv vađena je u kušalice koje kao antikoagulans sadržavaju natrijev EDTA, uvijek između 9 i 10 sati prije podne. Sinovijalna tekućina dobivena je punkcijom zgloba i potom prebačena u kušalice s natrijevim EDTA.

Uzorci periferne krvi i sinovijalne tekućine centrifugirani su brzinom 3500 okretaja u minuti tijekom 5 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega je nadtalog (plazma, odnosno bistra sinovijalna tekućina) aspiriran i pohranjen u kriotube (Nunc, Danska) za pohranu na  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Za koncentracije citokina u nadtalogu kultura podraženih limfocita rabljene su mononuklearne stanice periferne krvi izdvojene na gradijentu fikola (Histopaque-1077, Sigma, St.Louis, SAD). Puna je krv razrijeđena hranjivim medijem RPMI 1640 u omjeru 1:1, a nakon toga nadslojena na fikol u omjeru fikol/razrijeđena krv – 2:3. Uzorak je potom centrifugiran na 2000 okretaja u minuti,

tijekom 20 minuta, na sobnoj temperaturi. S pomoću Pasteurove pipete pokupljen je mononuklearni prsten. Nakon toga su mononuklearne stanice dva puta isprane medijem RPMI1640 centrifugiranjem tijekom 5 minuta na 2000 okretaja u minuti i zatim resuspendirane u kompletnom mediju RPMI1640 koji je sadržavao 10% fetalnog telećeg seruma, 100 U/mL penicilina i 0,1 mg/mL streptomicina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Stanice su zatim izbrojene u Buerker-Tuerckovoj komorici, a udio živih stanica određen je s pomoću tripanskog modrila. Koncentracija živih stanica postavljena je na  $2,5 \times 10^5/\text{mL}$ , a po 1 mL suspenzije prenesen je u pojedini bunarić ploče koja sadržava 24 bunarića (24-well plate, Corning, Corning, NY, SAD). Pri tome je uzorak svakog bolesnika bio zasijan u ukupno četiri bunarića: u dva je dodan forbol-ester u obliku forbol-miristat-acetata (PMA, Sigma) u konačnoj koncentraciji 0,5  $\mu\text{g/mL}$ , a dva su bunarića stanice uzgojene bez dodatka PMA. Stanice su inkubirane tijekom 48 sati na temperaturi od 37 °C u atmosferi s 5% CO<sub>2</sub>. Nakon isteka inkubacije, nadtalog kultura izdvojen je centrifugiranjem (1000×g tijekom 5 minuta) i čuvan u kriotubama na –70 °C do analize.

Koncentracije citokina IL-10 i IL-18 u uzorcima seruma, sinovijalne tekućine i nadtaloga kultura podraženih limfocita izmjerene su pomoću enzimskog imunotesta (ELISA) (Human IL-10 Immunoassay, R&D Systems, Minneapolis, MN, SAD; Human IL-18 ELISA Kit, Medical & Biological Laboratories Co., Naka-ku Nagoya, Japan). Osjetljivost testa ELISA iznosila je 0,5 pg/mL za IL-10 i 12,5 pg/mL za IL-18. Postupci su provedeni u skladu s naputcima proizvođača absorbancije očitane na spektrofotometru za mikrotitarske pločice (Bio-Rad 680; Bio-Rad, Hercules (CA), SAD).

#### 4.2.4. Postupak izravnog bojenja leukocita

Za analizu izražaja staničnih biljega protočnom citometrijom uzeto je po 100  $\mu$ L pune krvi od svakog uzorka. Rabljena su monoklonska protutijela, miš-anti-čovjek, konjugirana s fluorescentnim bojama, a usmjerena na sljedeće biljege: anti-CD4/FITC (PharMingen, San Diego, CA, USA), anti-CD25/PE-Cy5 (PharMingen), CCR4/PE (PharMingen). Korištena su i sljedeća izotipska kontrolna protutijela: IgG1/FITC (PharMingen), IgG1/PE-Cy5 (PharMingen), IgG1/PE (PharMingen). Stanice u uzorku obojene su sljedećim volumenima protutijela: 20  $\mu$ L CD4/FITC, 20  $\mu$ L CD25/PE-Cy5, 5  $\mu$ L CCR4/PE). Uzorak je zatim prodrman na drmalici, a potom inkubiran 15 minuta na sobnoj temperaturi u mraku. Nakon inkubacije u uzorak je dodano 2 mL komercijalno dostupne otopine za liziranje eritorcita (FACS lysing solution, Becton Dickinson) te je uzorak inkubiran tijekom 10 minuta, na sobnoj temperaturi, u mraku. Krv je potom centrifugirana (900 $\times$ g tijekom 3 minute), nadtalog odliven, a stanični talog resuspendiran u 2 mL PBS-a (engl. *phosphate buffered saline*) i centrifugiran na 900 $\times$ g tijekom 3 minute. Nadtalog je ponovno bačen, a stanice su resuspendirane u 0,5 ml PBS-a, te odmah analizirane na protočnom citometru (FACSCalibur, BD Biosciences) s pomoću računalnog programa CellQuest (BD). Prikupljeno je 200 000 događaja od svakog uzorka, a tijekom analize stanične su populacije ograničavane u odnosu na ne-obojene uzorke te na signal izotipskih kontrolnih protutijela.

### 4.3. Statistička analiza

Podaci su najprije obrađeni deskriptivnim metodama, prikazani tablično i grafički, a distribucije kvantitativnih obilježja testirane na normalnost Kolmogorov-Smirnovljevim testom (razina  $p < 0,05$  smatrana je značajnom) i na homogenost varijanci različitih grupa. Za prikaz podataka rabile su se mjere centralne tendencije i raspršenosti primjerene nađenim raspodjelama (medijan i raspon te centilne vrijednosti u slučaju raspodjela koje nisu normalne, a aritmetička sredina i standardna devijacija u slučaju normalnih raspodjela).

Za testiranje razlike kvantitativnih varijabli između dviju (više) skupina ispitanika upotrijebljen je Studentov t-test (analiza varijance), a u slučaju da raspodjele nisu normalne, rabio se neparametrijski Mann-Whitneyjev U test (Kruskall-Wallis ANOVA). Za testiranje razlike zavisnih skupova podataka rabio se Studentov t-test za zavisne uzorke ili neparametrijski Wilcoxonov test za zavisne uzorke.

Za statističku obradu podataka upotrijebljen je statistički paket STATISTICA.<sup>145</sup>

## 5. REZULTATI

### 5.1. Pregled osnovnih podataka ispitanika

Analiza proupalnog (IL-18) i protuupalnog (IL-10) citokina učinjena je u 50-ero djece s JIA, prosječne dobi 5,5 godina (1 – 18); 31 djevojčica i 19 dječaka. Dvadesetpetero djece (25/50, 50%) imalo je oligoartikularni tip, 15-ero (15/50, 30%) poliartikularni tip i desetero djece (10/50, 20%) sistemski tip JIA (tablica 5). U njih 34 (20 s oligoartikularnim tipom, devet s poliartikularnim tipom i pet sa sistemskim tipom JIA), 23 djevojčica i 11 dječaka, učinjena je još i analiza broja regulacijskih limfocita T ( $CD4^+CD25^{++}$  i  $CD4^+CD25^{++}CCR4^+$ ) u perifernoj krvi. Kontrolnu skupinu činilo je 23-oje djece, prosječne dobi 7 godina (2 – 16); 14 djevojčica i 9 dječaka. Kontrolna skupina statistički se nije razlikovala prema spolu i dobi od skupine bolesnika.

Tablica 5. Osnovni podaci o 50-ero bolesnika s juvenilnim idiopatskim artritismom (JIA)

| Skupine                   | Broj ispitanika | Spol        | Dob bolesnika u vrijeme postavljanja dijagnoze u godinama |
|---------------------------|-----------------|-------------|-----------------------------------------------------------|
| Oligoartikularni tip JIA* | 25              | 16 ž : 9 m  | 4 (1 - 13)                                                |
| Poliartikularni tip JIA   | 15              | 13 ž : 2 m  | 7 (2 - 18)                                                |
| Sistemski tip JIA         | 10              | 2 ž : 8 m   | 7 (2 - 11)                                                |
| Ukupno                    | 50              | 31 ž : 19 m | 5,5 (1 - 18)                                              |



## 5.2. Analiza laboratorijskih nalaza u bolesnika s JIA u aktivnoj fazi i u remisiji bolesti

Osnovi laboratorijski nalazi aktivne bolesti: sedimentacija eritrocita, C-reaktivni protein i broj trombocita bili su statistički značajno viši u bolesnika s JIA aktivnoj fazi u odnosu prema kontrolnoj skupini, dok su koncentracije hemoglobina i hematokrita bile značajno niže u odnosu prema kontrolnoj skupini (ANOVA;  $P < 0.05$ ) (tablica 6).

Uspoređujući laboratorijske nalaze između tipova JIA u aktivnoj fazi dobili smo da su razina C-reaktivnog proteina, brzina sedimentacije eritrocita, broj leukocita, broj trombocita i razina IgG bili značajno viši, dok su koncentracije hemoglobina i hematokrita bile značajno niže, u sistemskom tipu u odnosu prema oligoartikularnom i poliartikularnom tip JIA (ANOVA i Student-Newman-Keulsov *post hoc* test;  $P < 0.05$ ) (tablica 6). Razina  $\gamma$ -globulina bila je značajno viša u poliartikularnom tipu u odnosu prema oligoartikularnom i sistemskom tip JIA (ANOVA i Student-Newman-Keulsov *post hoc* test;  $P = 0,032$ ). Koncentracija željeza i razina kreatin fosfokinaze (CK) bile su značajno najniže u sistemskom tipu (ANOVA i Student-Newman-Keulsov *post hoc* test;  $P = 0,004$ ). Nije nađena razlika između tipova JIA u hepatogramu (aspartat transaminazi, alanin transaminazi,  $\gamma$ -glutamil-transpeptidazi i alkalnoj fosfatazi) (tablica 6).

Reumatoidni faktor (RF) bio je pozitivan u petero djece (5/25, 20%) s oligoartikularnim tipom, sedmero djece (7/15, 46,6%) s poliartikularnim i u dva djeteta (2/10, 20%) sa sistemskim tipom JIA, dok je antinuklearni faktor (ANF) bio pozitivan u 13-ero djece (13/25, 52%) s oligoartikularnim tipom, devetero djece (9/15, 60%) s poliartikularnim i samo u jednog djeteta (1/10, 10%) sa sistemskim tipom JIA. Pozitivna oba faktora (ANF i RF) nađena su u troje djece (3/25, 8%) s

oligoartikularnim tipom i u sedmero djece (7/15, 46,6%) s poliartikularnim tipom JIA, tj. u sve djece u koje je bio pozitivan RF (tablica 6).

U remisiji bolesti nije nađena razlika u laboratorijskim nalazima između bolesnika (neovisno o tipu) i kontrolne skupine, dok su u sistemskom tipu JIA brzina sedimentacije eritrocita, broj leukocita i broj trombocita bili značajno viši u odnosu prema oligoartikularnom i poliartikularnom tipu (ANOVA i Student-Newman-Keulsov *post hoc* test;  $P < 0.05$ ) (tablica 6 i 7).

Tablica 6. Osnovni laboratorijski nalazi u 50 bolesnika s juvenilnim idiopatskim artritismom (JIA) u aktivnoj fazi bolesti i u kontrolnoj skupini (prikazani kao medijan (raspon), osim  $\gamma$ -globulina i  $\alpha$ 2-globulina koji su prikazani aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom (SD))

|                            | <b>KONTROLNA<br/>SKUPINA</b> | <b>OLIGO<br/>JIA</b>  | <b>POLI<br/>JIA</b>   | <b>SISTEMSKI<br/>JIA</b> | <b>SVI<br/>BOLESNICI<br/>S JIA</b> |
|----------------------------|------------------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------|------------------------------------|
| CRP (mg/L)                 | 10<br>(2 – 18)               | 7,8<br>(0 – 41)       | 50<br>(1 – 239)       | 94,5<br>(25,1- 249,5)    | 32,7<br>(0 – 249,5)                |
| SE (mm/h)                  | 2,9 (0 – 21,8)               | 23 (4 – 75)           | 35 (21-117)           | 89 (76 – 156)            | 23 (3-156)                         |
| Htc (L/L)                  | 0,37<br>(0,34 – 0,40)        | 0,35<br>(0,32 – 0,41) | 0,30<br>(0,19 – 0,39) | 0,28<br>(0,28 – 0,33)    | 0,34<br>(0,19 – 0,41)              |
| Hb (g/dL)                  | 129 (118 – 139)              | 119 (96 – 138)        | 107 (56-133)          | 95 (89-112)              | 114 (56-133)                       |
| L (x 10 <sup>9</sup> /L)   | 6,7<br>(4,1 – 13)            | 6<br>(4 – 8)          | 7,2<br>(3,4 – 9,6)    | 19<br>(14,8 – 30,6)      | 7,7<br>(3,4 – 30,6)                |
| Trc (x 10 <sup>9</sup> /L) | 276<br>(143 – 445)           | 368<br>(282 – 465)    | 233<br>(171 – 547)    | 608<br>(400 – 689)       | 326<br>(171 – 689)                 |
| $\gamma$ - globulin (%)    | n.o.                         | 18 $\pm$ 4            | 21 $\pm$ 5            | 17 $\pm$ 3               | 19 $\pm$ 5                         |
| $\alpha$ - globulin (%)    | n.o.                         | 10 $\pm$ 2            | 10 $\pm$ 2            | 15 $\pm$ 2               | 11 $\pm$ 3                         |
| IgG (g/L)                  | n.o.                         | 12,3<br>(9,1 – 17,6)  | 20,1<br>(14,5 – 23,1) | 16,4<br>(5,83 – 26,8)    | 15,8<br>(5,83-26,8)                |
| IgA (g/L)                  | n.o.                         | 0,91<br>(0,48 – 2,26) | 1,91<br>(1,16 -3,56)  | 1,13<br>(0,80- 1,74)     | 1,13<br>(0,48-3,56)                |
| IgM (g/L)                  | n.o.                         | 0,98<br>(0,85 – 1,98) | 0,90<br>(0,79 – 1,98) | 0,95<br>(0,31 – 2,52)    | 0,98<br>(0,31-2,52)                |
| AST (U/L)                  | n.o.                         | 33 (20 – 158)         | 22 (17 – 308)         | 15 (14 – 25)             | 24,5 (14 – 308)                    |
| ALT (U/L)                  | n.o.                         | 21 (9 – 117)          | 16 (9 – 437)          | 10 (9 – 29)              | 15 (9 – 437)                       |
| AF (U/L)                   | n.o.                         | 188 (117 – 236)       | 122 (53 – 186)        | 178 (62 – 318)           | 152 (53 – 318)                     |
| Ukupni bilirubin (U/L)     | n.o.                         | 8,4 (4,2 – 20,3)      | 7,5 (7 – 12,6)        | 9 (7 – 21,5)             | 8,4 (4,9 – 21,5)                   |
| Y-GT (U/L)                 | n.o.                         | 11 (8 – 34)           | 10 (8 – 58)           | 12 (10 – 17)             | 12 (8 – 58)                        |
| CK (U/L)                   | n.o.                         | 136 (64 – 344)        | 56 (21 – 96)          | 26 (16 – 125)            | 78 (16 – 344)                      |
| LDH (U/L)                  | n.o.                         | 477 (358 – 609)       | 363 (315 – 558)       | 447 (433–636)            | 432 (233 – 636)                    |
| Fe ( $\mu$ mol/L)          | n.o.                         | 8 (4 – 24)            | 5 (1 – 20)            | 3 (2 – 3)                | 4 (1 – 24)                         |
| RF + , broj bolesnika (%)  | n.o.                         | 5 (20%)               | 7 (46,6%)             | 2 (20%)                  | 14 (28%)                           |
| ANF + , broj bolesnika (%) | n.o.                         | 13 (52%)              | 9 (60%)               | 1 (10%)                  | 23 (46%)                           |

AF: alkalna fosfataza, ANF: antinuklearni faktor, ALT: alanin transaminaza, AST: aspartat transaminaza, CK: kreatin fosfokinaza, CRP: C-reaktivni protein, Htc: hematokrit, Hb: hemoglobin, L: leukociti, LDH: laktat dehidrogenaza, n.o.: nije određeno, RF: reumatoidni faktor, SE: sedimentacija eritrocita, Trc: trombociti, Y-GT: y-glutamil-transpeptidaza.

Tablica 7. Osnovni laboratorijski nalazi u 50 bolesnika s juvenilnim idiopatskim artritismom (JIA) u remisiji bolesti (prikazani kao medijan (raspon), osim  $\gamma$ -globulina i  $\alpha$ 2-globulina koji su prikazani aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom (SD))

|                               | <b>OLIGO JIA</b>   | <b>POLI JIA</b>    | <b>SISTEMSKI JIA</b> | <b>SVI BOLESNICI S JIA</b> |
|-------------------------------|--------------------|--------------------|----------------------|----------------------------|
| CRP (mg/L)                    | 1,5 (0 - 15)       | 1,9 (0 – 6,2)      | 3 (1 – 7,8)          | 2 (0 - 15)                 |
| SE (mm/h)                     | 9 (3 – 20)         | 8 (8 -23)          | 15 (7 – 45)          | 10 (3 - 45)                |
| Htc (L/L)                     | 0,35 (0,28 – 0,47) | 0,37 (0,24 – 0,39) | 0,36 (0,29 – 0,38)   | 0,36 (0,24 - 0,47)         |
| Hb (g/dL)                     | 122 (89 – 139)     | 125 (95 – 135)     | 128 (94 – 132)       | 114 (95 - 139)             |
| L (x 10 <sup>9</sup> /L)      | 5,4 (3,3 – 11,7)   | 6,2 (4,1 – 13,9)   | 8 (5,6 – 17)         | 6,7 (3,3 - 17)             |
| Trc (x 10 <sup>9</sup> /L)    | 272 (205 – 532)    | 250 (145 – 674)    | 393 (323 – 644)      | 312 (145 - 674)            |
| Y - globulin (%)<br>(normala) | 14 ± 2             | 19 ± 6             | 13 ± 2               | 15 ± 3                     |
| $\alpha$ - globulin (%)       | 11 ± 1             | 9 ± 1              | 13 ± 2               | 11 ± 1                     |
| AST (U/L)                     | 29 (15 – 128)      | 22 (20 – 30)       | 24 (15 – 28)         | 24 (15 - 128)              |
| ALT (U/L)                     | 17 (11 – 107)      | 40 (10 – 56)       | 13 (9 – 30)          | 20 (6 - 107)               |
| AF (U/L)                      | 157 (118 – 239)    | 122 (63 – 204)     | 82 (60 – 318)        | 143 (60 - 318)             |
| Y-GT (U/L)                    | 12 (9 – 20)        | 11 (8 - 35)        | 13 (11 – 40)         | 13 (8 - 40)                |
| Ukupni bilirubin (U/L)        | 8,5 (4,9 – 20,3)   | 6 (5,4 – 10,6)     | 8,5 (5,6 – 11,1)     | 8,4 (4,9 - 20,3)           |
| CK (U/L)                      | 52,5 (44 – 101)    | 63 (12 – 96)       | 93,5 (14 – 200)      | 62,5 (12 - 200)            |
| LDH (U/L)                     | 368 (217 – 460)    | 386 (324 – 694)    | 411 (345 – 489)      | 402 (217 - 694)            |

AF: alkalna fosfataza, ALT: alanin transaminaza, AST: aspartat transaminaza, CK: kreatin fosfokinaza, CRP: C-reaktivni protein, Htc: hematokrit, Hb: hemoglobin, L: leukociti, LDH: laktatdehidrogenaza, SE: sedimentacija eritrocita, Trc: trombociti, Y-GT: y-glutamil-transpeptidaza.

### 5.3. Primijenjeni lijekovi u bolesnika s JIA

U četvero djece s JIA (dvoje s oligoartikularnim tipom i dvoje s poliartikularnim tipom JIA) uzeta je periferna krv pri samom postavljanju dijagnoze prije početka liječenja, dok su samo dva bolesnika, i to sa sistemskim tipom JIA u remisiji bolesti bili bez ikakvih lijekova. Nesteroidni protuupalni lijekovi (NSAID od engl. *non-steroidal antiinflammatory drugs*) u većini slučajeva ibuprofen u dozi od 30 mg/kg, najčešće su primjenjivani lijekovi, bilo sami, bilo u kombinaciji s drugima lijekovima. Sedamnaestero bolesnika (17/50, 34%) u aktivnoj fazi i 20-ero (20/50, 40%) u remisiji je uzimalo samo nesteroidne protuupalne lijekove, dok je četvero bolesnika (4/50, 9%) u aktivnoj fazi uz nesteroidne protuupalne lijekove uzimalo kortikosteroide, tzv. “veznu” terapiju (metilprednizolon u dozi od 1-2 mg/kg, uz polagano smanjivanje doze) u intervalu dok se ne očituje učinak antireumatskih lijekova koji preinačuju bolest (DMARDs od engl. *disease modifying antihreumatic drugs*) (tablica 8a). Dvanaestero bolesnika u aktivnoj fazi (12/50, 24%) i 13-ero bolesnika u remisiji bolesti (13/50, 26%) uzimalo je kombinaciju NSAID i DMARDs (methotrexate u dozi od 5-30 mg/m<sup>2</sup>/tjedan ili 0,3-1,0 mg/kg/tjedan) (tablica 8a). Bolesnici sa sistemskim tipom, te jedan bolesnik s vrlo teškim poliartikularnim tipom JIA, u liječenju su uzimali još i imunosupresivne lijekove (azathioprine, cyclosporine) u dozi od 2-3 mg/kg (tablica 8b).

Tablica 8a. Primijenjeni lijekovi u bolesnika s juvenilnim idiopatskim artritisom (JIA) u aktivnoj fazi i u remisiji bolesti

| Tipovi JIA      | Primijenjeni lijekovi (broj bolesnika) |          |              |          |              |          |              |          |
|-----------------|----------------------------------------|----------|--------------|----------|--------------|----------|--------------|----------|
|                 | Bez terapije                           |          | NSAID        |          | NSAID + MP   |          | NSAID + MTX  |          |
|                 | Aktivna faza                           | Remisija | Aktivna faza | Remisija | Aktivna faza | Remisija | Aktivna faza | Remisija |
| Oligo JIA       | 2                                      | -        | 13           | 13       | 2            | -        | 8            | 8        |
| Poli JIA        | 2                                      | -        | 4            | 5        | 2            | -        | 4            | 4        |
| Sistemijski JIA | -                                      | 2        | -            | 2        | -            | -        | -            | 2        |
| Ukupno          | 4                                      | 2        | 17           | 20       | 4            | -        | 12           | 14       |

\*NSAID: nesteroidni protuupalni lijek, MP: metilprednizolon, MTX: methotrexate

Tablica 8b. Primijenjeni lijekovi u bolesnika s juvenilnim idiopatskim artritisom (JIA) u aktivnoj fazi i u remisiji bolesti

| Tipovi JIA      | Primijenjeni lijekovi (broj bolesnika) |          |               |          |                |          |                   |          |
|-----------------|----------------------------------------|----------|---------------|----------|----------------|----------|-------------------|----------|
|                 | NSAID + MP+MTX                         |          | NSAID + MP+IS |          | NSAID + MTX+IS |          | NSAID + MTX+MP+IS |          |
|                 | Aktivna faza                           | Remisija | Aktivna faza  | Remisija | Aktivna faza   | Remisija | Aktivna faza      | Remisija |
| Oligo JIA       | -                                      | 4        | -             | -        | -              | -        | -                 | -        |
| Poli JIA        | 3                                      | 5        |               | 1        | 1              | -        | -                 | -        |
| Sistemijski JIA | 4                                      | -        | 5             | 3        | -              | -        | 1                 | 1        |
| Ukupno          | 7                                      | 9        | 5             | 4        | 1              | -        | 1                 | 1        |

\*NSAID: nesteroidni protuupalni lijek, MP: metilprednizolon, MTX: methotrexate, IS: imunosupresivni lijek

#### 5.4. Analiza IL-10 u serumu, sinovijalnoj tekućini i nadtalogu kultura nestimuliranih i stimuliranih limfocita

Razina IL-10 u serumu bolesnika s JIA (neovisno o tipu bolesti) u remisiji bolesti bila je značajno viša od kontrolne skupine (Wilcoxonov test;  $P = 0,004$ ), dok je i razina u aktivnoj fazi bila znatno viša, ali ne statistički značajna. U nadtalogu kultura nestimuliranih i stimuliranih limfocita razina IL-10 u svih bolesnika bila je viša u odnosu prema kontrolnoj skupini, i u aktivnoj fazi i u remisiji bolesti. (Wilcoxonov test;  $P < 0,001$ ) (tablica 9).

Nije nađena značajna razlika između aktivne faze i remisije bolesti u razini IL-10 u serumu bolesnika s JIA, kao ni u nadtalogu kultura nestimuliranih i stimuliranih limfocita. Razina IL-10 u nadtalogu kultura nestimuliranih i stimuliranih limfocita bila je značajno viša od razine IL-10 u serumu svih bolesnika, i u aktivnoj fazi i u remisiji bolesti (Wilcoxonov test za zavisne uzorke;  $P < 0,001$ ). U remisiji bolesti razina IL-10 u nadtalogu kultura stimuliranih limfocita bila je značajno viša nego u nadtalogu kultura nestimuliranih limfocita (Wilcoxonov test za zavisne uzorke;  $P < 0,001$ ), dok nije bilo razlike u aktivnoj fazi (tablica 9).

Tablica 9. Razina IL-10 u serumu i nadtalogu kultura stimuliranih i nestimuliranih limfocita u 50 bolesnika s juvenilnim idiopatskim artritismom (JIA) i u kontrolnoj skupini

| Skupine           | IL-10 [pg/mL] u serumu |                     | IL-10 [pg/mL] u nadtalogu kultura stimuliranih limfocita |                      | IL-10 [pg/mL] u nadtalogu kultura nestimuliranih limfocita |                     |
|-------------------|------------------------|---------------------|----------------------------------------------------------|----------------------|------------------------------------------------------------|---------------------|
|                   | Aktivna faza           | Remisija            | Aktivna faza                                             | Remisija             | Aktivna faza                                               | Remisija            |
| Kontrolna skupina | n.o.*                  | 1,9<br>(0,6 – 2,8)  | n.o.*                                                    | 2,8<br>(2,0 – 9,4)   | n.o.*                                                      | 2,2<br>(1,2 – 3,1)  |
| Bolesnici s JIA   | 3,2<br>(0 – 32,7)      | 3,9<br>(0,4 – 16,3) | 7,5<br>(1,1 – 12,2)                                      | 15,6<br>(3,5 – 68,8) | 6,4<br>(0,1 – 39,4)                                        | 9,9<br>(1,1 – 57,0) |

n.o.: nije određena

Bolesnici sa sistemskim tipom JIA u remisiji bolesti imali su značajno višu razinu IL-10 u serumu u odnosu prema drugim tipovima JIA i kontrolnoj skupini (ANOVA i Student-Newman-Keulsov *post hoc* test;  $P = 0,003$ ), dok nije bilo razlike u aktivnoj fazi bolesti (tablica 10). U nadialogu kultura stimuliranih limfocita razina IL-10 u remisiji bolesti bila je značajno viša u bolesnika s poliartrikularnim tipom JIA u odnosu prema drugim tipovima JIA i kontrolnoj skupini (ANOVA i Student-Newman-Keulsov *post hoc* test;  $P = 0,027$ ), dok u aktivnoj fazi nije nađena razlika. U nadialogu kultura nestimuliranih limfocita bolesnici sa sistemskim tipom JIA u aktivnoj fazi imali su značajno višu razinu IL-10 u odnosu prema drugim tipovima JIA i kontrolnoj skupini (ANOVA i Student-Newman-Keulsov *post hoc* test;  $P = 0,002$ ), dok u remisiji nije bilo razlike (tablica 10).

U sinovijalnoj tekućini bolesnika s oligoartrikularnim tipom JIA razina IL-10 (18,55 (1,64 – 67,64) pg/mL) bila je značajno viša od razine IL-10 u serumu (Wilcoxonov test za zavisne uzorke;  $P = 0,001$ ) i u nadialogu kultura nestimuliranih limfocita (Wilcoxonov test za zavisne uzorke;  $P = 0,043$ ), dok nije bilo razlike između razine IL-10 u sinovijalnoj tekućini i u nadialogu kultura stimuliranih limfocita (Wilcoxonov test za zavisne uzorke;  $P = 0,581$ ) (tablica 10).



Tablica 10. Razina IL-10 u serumu i nadtalogu kultura stimuliranih i nestimuliranih limfocita u 50 bolesnika s juvenilnim idiopatskim artritismom (JIA) (ovisno o tipu bolesti) i u kontrolnoj skupini

| Skupine                  | IL-10 [pg/mL] u serumu |                     | IL-10 [pg/mL] u nadtalogu kultura stimuliranih limfocita |                      | IL-10 [pg/mL] u nadtalogu kultura nestimuliranih limfocita |                      |
|--------------------------|------------------------|---------------------|----------------------------------------------------------|----------------------|------------------------------------------------------------|----------------------|
|                          | Aktivna faza           | Remisija            | Aktivna faza                                             | Remisija             | Aktivna faza                                               | Remisija             |
| Kontrolna skupina*       | n.o.*                  | 1,9<br>(0,6 – 2,8)  | n.o.*                                                    | 2,8<br>(2,0 – 9,4)   | n.o.*                                                      | 2,17 ± 0,63          |
| Oligoartikularni tip JIA | 3,1<br>(0 – 32,7)      | 4,7<br>(0,4 – 16,3) | 7,6<br>(1,9 – 56,4)                                      | 14,8<br>(3,5 – 68,8) | 4,7<br>(0,1 – 39,4)                                        | 9,6<br>(1,2 – 57)    |
| Poliartikularni tip JIA  | 2,9<br>(0 – 15,5)      | 3,1<br>(0,5 – 10)   | 6,3<br>(1,1 – 22,2)                                      | 18,7<br>(7,2 – 54,7) | 3,4<br>(2,3 – 17,5)                                        | 9,9<br>(2,8 – 30,3)  |
| Sistemska tip JIA        | 5,5<br>(0 – 11,7)      | 7,1<br>(2,3 – 15,6) | 9,7<br>(2,4 – 27,7)                                      | 14,4<br>(3,6 – 34,8) | 17,8<br>(6,7 – 38,5)                                       | 16,1<br>(1,7 – 31,2) |

\* n.o.: nije određena

Nije nađena povezanost između razine IL-10 u serumu, kao ni u nadtalogu kultura stimuliranih i nestimuliranih limfocita, i laboratorijskih nalaza aktivne bolesti (sedimentacije eritrocita, C-reaktivnog proteina, anemije, trombocitoze, disproteinemije s povišenom razinom  $\gamma$ -globulina i  $\alpha$ 2-globulina).

Ispitivanjem odnosa razine IL-10 i titra ANF nađena je povezanost pozitivnog titra ANF i razine IL-10 u serumu bolesnika s JIA u aktivnoj fazi, odnosno bolesnici s pozitivnim titrom ANF imali su više razine IL-10 u serumu u odnosu prema bolesnicima u kojih titar ANF nije bio pozitivan (Mann-Whitneyjev U test;  $P = 0,031$ ), dok u remisiji nije nađena povezanost (Mann-Whitneyjev U test;  $P = 0,386$ ). U nadtalogu kultura nestimuliranih i stimuliranih limfocita nije nađena povezanost razine IL-10 s titrom ANF ni u aktivnoj fazi, ni u remisiji bolesti. Također nije nađena povezanost razine IL-10 u serumu i nadtalogu kultura nestimuliranih i stimuliranih limfocita s RF, ni u aktivnoj fazi ni u remisiji bolesti.

## 5.5. Analiza IL-18 u serumu, sinovijalnoj tekućini i nadtalogu kultura stimuliranih i nestimuliranih limfocita

Razina IL-18 u serumu bolesnika s JIA (neovisno o tipu bolesti) nije se razlikovala od kontrolne skupine, ni u aktivnoj fazi (Mann-Whitneyjev U test;  $P = 0,535$ ), ni u remisiji bolesti (Mann-Whitneyjev U test;  $P = 0,258$ ). U aktivnoj fazi bolesti razina IL-18 u serumu svih bolesnika bila je značajno viša nego u remisiji bolesti (Wilcoxonov test za zavisne uzorke;  $P < 0,001$ ) (tablica 11). Razina IL-18 u nadtalogu kultura stimuliranih i nestimuliranih limfocita bila je ispod praga detekcije kita.

Tablica 11. Razina IL-18 u serumu 50 bolesnika s juvenilnim idiopatskim artritisom (JIA) i u kontrolnoj skupini

| Skupine            | IL-18 [pg/mL]<br>u serumu |                 |
|--------------------|---------------------------|-----------------|
|                    | Aktivna faza              | Remisija        |
| Kontrolna skupina* | n.o.*                     | 321 (199 – 392) |
| Bolesnici s JIA    | 268 (89 – 9081)           | 224 (75 – 4430) |

\* n.o.: nije određena

Razina IL-18 u serumu bolesnika sa sistemskim tipom JIA bila je značajno viša nego u bolesnika s drugim tipovima JIA, i u aktivnoj fazi i u remisiji (ANOVA i Student-Newman-Keulsov *post hoc* test;  $P < 0,001$ ), dok nije nađena značajna razlika u razini IL-18 između oligoartikularnog tipa JIA, poliartikularnog tipa JIA i kontrolne skupine (tablica 12). Iako se razina IL-18 u bolesnika sa sistemskim tipom JIA značajno smanjila u remisiji bolesti (Studentov t-test za zavisne uzorke;  $P =$

0,004), i dalje je ostala nekoliko puta viša u usporedbi s drugim tipovima JIA (ANOVA i Student-Newman-Keulsov *post hoc* test;  $P < 0,001$ ) (tablica 12).

Razina IL-18 u sinovijalnoj tekućini (247 (23 – 832) pg/mL) nije se razlikovala od razine IL-18 u serumu bolesnika s oligoartikularnim tipom JIA (Studentov t-test;  $P = 0,995$ ) (tablica 12).

Tablica 12. Razina IL-18 u serumu u 50 bolesnika s juvenilnim idiopatskim artritismom (JIA) (ovisno o tipu bolesti) i u kontrolnoj skupini

| Skupine                  | IL-18 [pg/mL] u serumu |                   |
|--------------------------|------------------------|-------------------|
|                          | Aktivna faza           | Remisija          |
| Kontrolna skupina*       | n.o.*                  | 321 (199 – 392)   |
| Oligoartikularni tip JIA | 255 (89 – 4342)        | 201 (76 – 842)    |
| Poliartikularni tip JIA  | 263 (126 – 3027)       | 249 (85 – 962)    |
| Sistemijski tip JIA      | 5323 (3628 – 9081)     | 2647 (557 – 4430) |

\*n.o.: nije određena

Treba istaknuti dva zasebna nalaza. Prvo, od 10 bolesnika sa sistemskim JIA, samo je jedan imao i izvanzglobne simptome (hepatosplenomegaliju i limfadenopatiju), te su u njega izmjerene i bitno više razine IL-18 u aktivnoj fazi bolesti (9081 pg/mL) (Tablica 12).

Drugo, u dva bolesnika, jednog s poliartikularnim tipom s pozitivnim RF (uz pozitivan titar ANF), te drugog s oligoartikularnim perzistirajućim tipom JIA, razine IL-18 u serumu nisu se razlikovale od bolesnika sa sistemskim tipom JIA (3027 pg/mL (oligoartikularni tip) i 4342 pg/mL (poliartikularni tip) (Tablica 12).

Razina IL-18 u serumu bolesnika bila je proporcionalna brzini sedimentacije eritrocita (Pearsonov test;  $r = 0,55$ ;  $P < 0,001$ ), razini C-reaktivnog proteina (Pearsonov test;  $r = 0,49$ ;  $P < 0,001$ ), broju

trombocita (Pearsonov test;  $r = 0,47$ ;  $P < 0,01$ ), broju leukocita (Pearsonov test;  $r = 0,73$ ;  $P < 0,001$ ) i razini  $\alpha_2$ -globulina (Pearsonov test;  $r = 0,52$ ;  $P < 0,001$ ), dok je bila obrnuto proporcionalna koncentraciji hemoglobina (Pearsonov test;  $r = -0,47$ ;  $P < 0,001$ ), koncentraciji hematokrita (Pearsonov test;  $r = -0,38$ ;  $P = 0,006$ ) i koncentraciji IgG (Pearsonov test;  $r = -0,28$ ;  $P = 0,042$ ). Nije nađena povezanost između razine IL-18 i razine  $\gamma$ -globulina (Pearsonov test;  $r = -0,11$ ;  $P = 0,455$ ). Nije nađena povezanost razine IL-18 s titrom ANF u aktivnoj fazi (Mann-Whitneyjev U test;  $P = 0,307$ ), ni u remisiji bolesti (Mann-Whitneyjev U test;  $P = 0,449$ ), kao ni s RF u aktivnoj fazi (Mann-Whitneyjev U test;  $P = 0,289$ ), niti u remisiji bolesti (Mann-Whitneyjev U test;  $P = 0,087$ ).

## **5.6. Analiza $CD4^+$ , $CD4^+CD25^+$ i regulacijskih limfocita T ( $CD4^+CD25^{++}$ i $CD4^+CD25^{++}CCR4^+$ ) u perifernoj krvi**

Limfociti  $CD4^+$ ,  $CD4^+CD25^+$  i regulacijski ( $CD4^+CD25^{++}$  i  $CD4^+CD25^{++}CCR4^+$ ) limfociti T izraženi su kao udio (postotak od ukupnog broja limfocita) i kao broj ( $/mm^3$ ).

Kontrolna skupina imala je značajno viši broj i udio  $CD4^+CD25^{++}$  i  $CD4^+CD25^{++}CCR4^+$  limfocita T u odnosu prema bolesnicima s JIA (neovisno o tipu) u remisiji bolesti (Mann-Whitneyjev U test;  $P < 0,001$ ), dok u aktivnoj fazi nije bilo razlike (tablica 13a i 13b). Nije nađena razlika u broju i udjelu  $CD4^+$  i  $CD4^+CD25^+$  između bolesnika i kontrolne skupine, ni u aktivnoj fazi, ni u remisiji bolesti (tablica 13a i 13b). Također, u bolesnika s JIA nije nađena razlika u broju i udjelu  $CD4^+$ ,  $CD4^+CD25^+$ , i  $CD4^+CD25^{++}$  i  $CD4^+CD25^{++}CCR4^+$  između aktivne faze i remisije bolesti (tablica 13a i 13b).

Tablica 13a. Udio limfocitnih subpopulacija u perifernoj krvi 34 bolesnika s juvenilnim idiopatskim artritisom (JIA) i u kontrolnoj skupini

| Skupine         | CD4 <sup>+</sup> |                       | CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> |                  | CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>++</sup> |                       | CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>++</sup> CCR4 <sup>+</sup> |                       |
|-----------------|------------------|-----------------------|------------------------------------|------------------|-------------------------------------|-----------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------|
|                 | Aktivna faza     | Remisija              | Aktivna faza                       | Remisija         | Aktivna faza                        | Remisija              | Aktivna faza                                          | Remisija              |
| Kontrolna       | n.o.*            | 39,3<br>(25,3 – 46,8) | n.o.*                              | 6,1 (3,4 – 9,4)  | n.o.*                               | 0,26<br>(0,13 – 1,01) | n.o.                                                  | 0,24<br>(0,11 – 0,88) |
| Bolesnici s JIA | 38,3 (18 – 51,9) | 37,4<br>(13,2 – 54,4) | 6,9 (2 – 17,2)                     | 6,6 (1,9 – 16,4) | 0,31<br>(0,01 – 0,97)               | 0,17<br>(0,02 – 0,69) | 0,27<br>(0,01 – 0,96)                                 | 0,16<br>(0,02 – 0,58) |

\* n.o.: nije određen

Tablica 13b. Broj limfocitnih subpopulacija (/mm<sup>3</sup>) u perifernoj krvi 34 bolesnika s juvenilnim idiopatskim artritisom (JIA) i u kontrolnoj skupini

| Skupine         | CD4 <sup>+</sup>     |                  | CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> |                | CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>++</sup> |                  | CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>++</sup> CCR4 <sup>+</sup> |                  |
|-----------------|----------------------|------------------|------------------------------------|----------------|-------------------------------------|------------------|-------------------------------------------------------|------------------|
|                 | Aktivna faza         | Remisija         | Aktivna faza                       | Remisija       | Aktivna faza                        | Remisija         | Aktivna faza                                          | Remisija         |
| Kontrolna       | n.o.*                | 1022 (55 – 2111) | n.o.*                              | 147 (12 – 295) | n.o.*                               | 8,8 (0,8 – 24,8) | n.o.*                                                 | 7,8 (0,7 – 23,9) |
| Bolesnici s JIA | 1120<br>(189 – 3234) | 990 (55 – 2726)  | 210 (29 – 776)                     | 180 (36 – 757) | 8,4 (0,2 – 35,1)                    | 5,6 (0,3 – 51,8) | 7,8 (0,2 – 33,7)                                      | 5,1 (0,3 – 46,3) |

\* n.o.: nije određen

Broj CD4<sup>+</sup> limfocita u remisiji bolesti bio je značajno viši u bolesnika sa sistemskim tipom JIA u odnosu prema drugim tipovima JIA i kontrolnoj skupini (ANOVA i Student-Newman-Keulsov *post hoc* test;  $P = 0,005$ ), dok u remisiji bolesti nije nađena razlika (tablica 14b). Također, bolesnici sa sistemskim tipom JIA imali su značajno viši broj i udio CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> limfocita u usporedbi s djecom s oligoartikularnim i poliartrikularnim tipom JIA i kontrolnom skupinom, u aktivnoj fazi i u remisiji (ANOVA i Student-Newman-Keulsov *post hoc* test;  $P < 0,001$ ) (tablica 14a i 14b). Udio CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> limfocita u djece s poliartrikularnim tipom JIA u remisiji bolesti bio je značajno viši nego u djece s oligoartikularnim tipom i kontrolne skupine (ANOVA i Student-Newman-Keulsov

*post hoc* test;  $P < 0,001$ ), dok u aktivnoj fazi nije nađena razlika. Udio  $CD4^+CD25^{++}$  i  $CD4^+CD25^{++}CCR4^+$  u oligoartikularnom i poliartrikularnom tipu JIA u remisiji bolesti bio je značajno snižen u odnosu prema kontrolnoj skupini (ANOVA i Student-Newman-Keulsov *post hoc* test;  $P = 0,009$ ), dok za vrijeme aktivne faze bolesti nije bilo značajne razlike (tablica 14a i 14b). Broj  $CD4^+CD25^{++}$  limfocita u remisiji bolesti bio je povišen u djece sa sistemskim tipom JIA u odnosu prema djeci s oligoartikularnim i poliartrikularni tipom (ANOVA i Student-Newman-Keulsov *post hoc* test;  $P = 0,042$ ), dok u aktivnoj fazi nije nađena razlika (tablica 14b).

Budući da su broj  $CD4^+CD25^{++}$  limfocita i razina IL-10 u serumu bolesnika sa sistemskim tipom JIA u remisiji bolesti bili povišeni u odnosu na druge tipove, a osim populacije prirodnih regulacijskih limfocita T, postoji i populacija induciranih regulacijskih limfocita T, koji luče IL-10, analizirana je povezanost broja regulacijskih ( $CD4^+CD25^{++}$ ) limfocita i razine IL-10 u serumu, koja je statistički značajna (Pearsonov test;  $r = 0,34$ ;  $P = 0,039$ ). Na osnovi tih rezultata možemo pretpostaviti da su to inducirani regulacijski limfociti čija je razina, prema tome, povišena u remisiji bolesti u bolesnika sa sistemskim tipom JIA.

Tablica 14a. Udio limfocitnih subpopulacija u perifernoj krvi 34 bolesnika s juvenilnim idiopatskim artritismom (JIA) (ovisno o tipu bolesti ) i u kontrolnoj skupini

| Skupine           | CD4 <sup>+</sup>      |                       | CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> |                  | CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>++</sup> |                       | CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>++</sup> CCR4 <sup>+</sup> |                       |
|-------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------------------|------------------|-------------------------------------|-----------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------|
|                   | Aktivna faza          | Remisija              | Aktivna faza                       | Remisija         | Aktivna faza                        | Remisija              | Aktivna faza                                          | Remisija              |
| Kontrolna         | n.o.*                 | 39,3<br>(25,3 – 46,8) | n.o.*                              | 6,1 (3,4 – 9,4)  | n.o.*                               | 0,26<br>(0,13 – 1,01) | n.o.                                                  | 0,24<br>(0,11 – 0,88) |
| Oligo JIA         | 40,3<br>(18,2 – 51,9) | 38,5<br>(13,2 – 50)   | 5,5 (2 – 9,5)                      | 5,4 (1,9 – 10,5) | 0,15<br>(0,01 – 0,97)               | 0,11<br>(0,03 – 0,69) | 0,15<br>(0,01 – 0,96)                                 | 0,10<br>(0,03 – 0,58) |
| Poli JIA          | 41,3<br>(28,1 – 49,5) | 31,5<br>(23,8 – 50,2) | 6,7 (4,6 – 14,1)                   | 7,7 (3,8 – 12,9) | 0,29<br>(0,05 – 0,78)               | 0,11<br>(0,02 – 0,58) | 0,23<br>(0,05 – 0,61)                                 | 0,11<br>(0,02 – 0,52) |
| Sistemska tip JIA | 40,2 (18 – 45,3)      | 36,4<br>(24,7 – 54,4) | 10,4 (4,9 – 17,2)                  | 8,4 (4,4 – 16,4) | 0,23<br>(0,02 – 0,76)               | 0,18<br>(0,02 – 0,47) | 0,23<br>(0,02 – 0,73)                                 | 0,16<br>(0,02 – 0,42) |

\* n.o.: nije određen

Tablica 14b. Broj limfocitnih subpopulacija (/mm<sup>3</sup>) u perifernoj krvi 34 bolesnika s juvenilnim idiopatskim artritismom (JIA) (ovisno o tipu bolesti) i u kontrolnoj skupini

| Skupine           | CD4 <sup>+</sup>  |                  | CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> |                 | CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>++</sup> |                  | CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>++</sup> CCR4 <sup>+</sup> |                  |
|-------------------|-------------------|------------------|------------------------------------|-----------------|-------------------------------------|------------------|-------------------------------------------------------|------------------|
|                   | Aktivna faza      | Remisija         | Aktivna faza                       | Remisija        | Aktivna faza                        | Remisija         | Aktivna faza                                          | Remisija         |
| Kontrolna         | n.o.*             | 1022 (55 – 2111) | n.o.*                              | 147 (12 – 295)  | n.o.*                               | 8,8 (0,8 – 24,8) | n.o.*                                                 | 7,8 (0,7 – 23,9) |
| Oligo JIA         | 913 (189 – 3234)  | 898 (487 – 1731) | 123 (29 – 367)                     | 146 (36 – 279)  | 4 (0,2 – 33)                        | 2,7 (0,4 – 16,6) | 4 (0,2 – 32,7)                                        | 2,6 (0,4 – 14)   |
| Poli JIA          | 889 (358 – 2617)  | 693 (129 – 1087) | 147 (65 – 611)                     | 120 (33 – 406)  | 6,2 (1,2 – 19,7)                    | 1,5 (0,3 – 23)   | 5,8 (1,2 – 18,1)                                      | 1,5 (0,3 – 20,6) |
| Sistemska tip JIA | 1678 (831 – 2738) | 985 (55 – 2726)  | 412 (228 – 776)                    | 473 (123 – 757) | 9,7 (0,9 – 35,1)                    | 5 (0,6 – 51,8)   | 9,7 (0,9 – 33,7)                                      | 4,5 (0,6 – 46,3) |

\* n.o.: nije određen

Ispitivanjem odnosa broja i udjela CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>++</sup> i CD4<sup>+</sup>CD25<sup>++</sup>CCR4<sup>+</sup> u aktivnoj fazi i remisiji bolesti, u odnosu prema laboratorijskim nalazima aktivne bolesti (brzini sedimentacije eritrocita, razini C-reaktivnog proteina, anemiji, trombocitozi, disproteinemiji s povišenom razinom

$\gamma$ -globulina i  $\alpha$ 2-globulina), nađena je jedino povezanost  $CD4^+CD25^+$  s razinom C-reaktivnog proteina (Pearsonov test;  $r = 0,55$ ;  $P < 0,001$ ).

Nije nađena povezanost broja i udjela  $CD4^+CD25^+$ ,  $CD4^+CD25^{++}$  i  $CD4^+CD25^{++}CCR4^+$  s titrom ANF i RF, ni u aktivnoj fazi ni u remisiji bolesti.



## 6. RASPRAVA

---

### 6.1. IL-18 i IL-10 u bolesnika s juvenilnim idiopatskim artritisom

JIA predstavlja grupu klinički heterogenih poremećaja, čija je točna etiologija još nepoznata. Imunopatogeneza ove bolesti nastoji se razjasniti već duže vrijeme, a prema novim spoznajama važnu ulogu u imunopatogenezi imaju citokini, odnosno njihovo poremećeno lučenje. Još uvijek nije poznat ključni medijator (citokin) za određene tipove JIA koji bi bio pokazatelj aktivnosti bolesti, te utjecao na izlječenje, to jest daljnju progresiju i kroničnost bolesti.

U istraživanje je bilo uključeno 50-ero djece s JIA (25 s oligoartikularnim tipom, 15 s poliartikularnim tipom i 10 sa sistemskim tipom), prosječne dobi 5,5 godina (1 – 18); 31 djevojčica i 19 dječaka, te 23-oje djece u kontrolnoj skupini (prosječne dobi 7 godina (2 – 16). U svih je analizirana razina proupalnog (IL-18) i protuupalnog citokina (IL-10) u perifernoj krvi i u nadtalogu kultura podraženih limfocita. U 16 bolesnika s oligoartikularnim tipom JIA učinjena je i istodobna analiza citokina u sinovijalnoj tekućini.

Na osnovi naših rezultata možemo zaključiti:

Serumske razine IL-18 u bolesnika sa sistemskim tipom JIA bile su značajno povišene u odnosu prema bolesnicima s oligoartikularnim i poliartikularnim tipom, u aktivnoj fazi i u remisiji bolesti, dok nije nađena statistički značajna razlika između bolesnika s oligoartikularnim i poliartikularnim tipom JIA i kontrolne skupine. Naši su rezultati u skladu s nedavno objavljenim radovima gdje je značajno povišena razina IL-18 u serumu također nađena samo u sistemskom tipu JIA,<sup>146</sup> te u adultnom tipu sistemskog JIA ili Stillove bolesti (AOSD, od engl *adult-onset Still'*

disease).<sup>147,148</sup> Od ukupno analiziranih 10 bolesnika sa sistemskim JIA, samo je jedan imao i izvanzglobne simptome: hepatosplenomegaliju i limfadenopatiju, te su u njega izmjerene i bitno više razine IL-18. Maeno i suradnici također su pokazali da je razina IL-18 u serumu bolesnika sa sistemskim JIA viša u onih bolesnika koji imaju hepatosplenomegaliju, perikarditis, pleuritis i povišene vrijednosti feritina, nego u bolesnika sa sistemskim JIA kojima je artritis glavno obilježje. Za vrijeme njihove studije dva su bolesnika umrla od diseminirane intravaskularne koagulacije i sindroma aktivacije makrofaga (MAS, engl. *macrophage activation syndrome*). U oba bolesnika izmjerene su ekstremno povišene razine IL-18 (200.000 pg/mL), što upućuje na to, da takve razine IL-18 mogu biti povezane s povećanim rizikom smrti.<sup>146</sup>

U mišjem modelu endotoksičnog šoka povišene razine IL-18, većinom podrijetla iz Kupfferovih stanica i aktiviranih makrofaga, bile su povezane s teškim oštećenjem jetara.<sup>149</sup> U bolesnika s hemofagocitnom limfohistiocitozom, obilježenom hiperaktivacijom makrofaga i limfocita T uz pojačano lučenje citokina INF- $\gamma$ , TNF, IL-2, IL-12, IL-1, IL-6 i čimbenika poticanja granulocitno-makrofagnih kolonija (M-CSF, od engl. *macrophage-colony stimulating factor*), razine IL-18 u serumu bile su značajno povišene u odnosu prema zdravim ispitanicima, dok je izražaj mRNA IL-18 bio pojačan samo u slezeni, ali ne na mononuklearnim stanicama periferne krvi, koštanoj srži niti jetrima.<sup>150</sup> Uzimajući u obzir ta dva rada, a znajući da se sistemski tip JIA u početku bolesti većinom očituje teškim općim i izvanzglobnim simptomima, kao što su splenomegalija, hepatomegalija i generalizirana limfadenopatija, moguće je da monociti iz periferne krvi budu raspodijeljeni u retikuloendotelni sustav (slezenu, jetra i limfne čvorove), u kojem funkcionalno sazrijevaju u zrele makrofage koji produciraju IL-18. Na taj bismo način mogli objasniti izrazito povećanu serumsku razinu IL-18 u našeg bolesnika sa sistemskim tipom JIA i izvanzglobnim simptomima.

U istraživanju smo dokazali povezanost razine IL-18 i laboratorijskih pokazatelja aktivne bolesti, tj. brzine sedimentacije eritrocita, razine C-reaktivnog proteina, anemije, trombocitoze i razine  $\alpha$ 2-globulina, a nismo uspjeli dokazati povezanost s titrom ANF i RF.

Razina IL-18 u bolesnika sa sistemskim tipom JIA značajno se smanjuje za vrijeme remisije bolesti, no još je nekoliko puta viša u odnosu prema drugim tipovima JIA. Stoga, dok su laboratorijski pokazatelji aktivnosti bolesti u remisiji u granicama referentnih vrijednosti, razina IL-18 u serumu bolesnika sa sistemskim tipom JIA još je značajno povišena u odnosu prema kontrolnoj skupini. To pokazuje da je za vrijeme klinički «mirne» faze bolesti još uvijek prisutna upalna aktivnost. Navedeni rezultati upućuju na to da je serumska razina IL-18 znatno bolji i informativniji «marker» aktivnosti bolesti u bolesnika sa sistemskim tipom JIA.

U radu Maena i suradnika razina IL-18 u serumu bolesnika sa sistemskim tipom JIA povezana je jedino s razinom feritina u serumu, ali ne i s razinom C-reaktivnog proteina, ni s brojem bolnih i otečenih zglobova.<sup>146</sup> U nekoliko do danas objavljenih radova o ulozi IL-18 u bolesnika s RA, nađena je značajna povezanost razine IL-18 i laboratorijskih pokazatelja aktivne bolesti (brzine sedimentacije eritrocita i razine C-reaktivnog proteina),<sup>129,151</sup> dok Bresnihan i suradnici u svojem radu to nisu uspjeli dokazati.<sup>152</sup>

U dva bolesnika s artikularnim tipom bolesti (u jednog s oligoartikularnim perzistirajućim tipom i u drugog s poliartikularnim tipom s pozitivnim RF) nađene su izrazito povišene razine IL-18 u perifernoj krvi, jednake onima u sistemskom tipu JIA. Oba su bolesnika imala pozitivan titar ANF. Kliničkim praćenjem bolesnika uvidjeli smo da u vrlo kratkim razdobljima dolazi do relapsa osnovne bolesti. Prema tome, povišene razine IL-18 u perifernoj krvi u bolesnika s oligoartikularnim i poliartikularnim tipom JIA mogle bi biti pokazatelj težeg tijeka bolesti i time

lošije prognoze. Da bismo potvrdili ovu hipotezu, bit će potrebno daljnje praćenje bolesnika, odnosno praćenje tijeka njihove osnovne bolesti.

Općenito se smatra da cirkulirajući citokini ne odražavaju stvarnu razinu citokina u zahvaćenim organima ili tkivima.<sup>104,121,126,153</sup> Tako je, na primjer, pokazano da je u bolesnika s RA nađena značajno povišena razina IL-18 u sinovijalnoj tekućini, te mRNA IL-18 u sinoviji, u odnosu prema razini u serumu, te da je bioaktivnost IL-18 u zahvaćenim zglobovima bolesnika povezana s aktivnošću bolesti.<sup>129</sup> U suprotnosti s navedenim radovima je naš rad u kojem se razina IL-18 u sinovijalnoj tekućini nije razlikovala od razine IL-18 u serumu bolesnika s oligoartikularnim tipom JIA.

Na osnovi iznesenih rezultata možemo zaključiti da je IL-18 uključen u patogenezu sistemskog tipa JIA. Točna etiologija sistemskog tipa JIA još je nepoznata, no presudna se smatra aktivacija makrofaga.<sup>146</sup> Iako su prijašnje studije pokazale da su proupalni citokini (IL-6, IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$ ) uključeni u patogenezu sistemskog tipa JIA,<sup>154</sup> još se traga za ključnim medijatorom. IL-18 potiče limfocite T, NK-stanice (od engl. *natural killer*) i makrofage na lučenje proupalnih citokina, te se zbog toga vjeruje da ima važnu ulogu u sistemskom tipu JIA i adultnom tipu Stillove bolesti.<sup>146,147,148</sup>

Također smo zaključili da glavno mjesto proizvodnje IL-18 nije ciljni organ (upalom zahvaćen zglob), nego da je sustavna proizvodnja IL-18 vjerojatno važna u patogenezi sistemskog tipa JIA. Danas je tek u začetku otkrivanje glavnog izvora povišene sinteze IL-18. Makrofagi se smatraju glavnim izvorom povišene sinteze IL-18 u adultnom tipu Stillove bolesti,<sup>147</sup> dok Maeno i suradnici vjeruju da tu ulogu u sistemskom tipu JIA ima koštana srž.<sup>155</sup> Da bi se pronašao izvor znatno povišene razine IL-18, u djevojke oboljele od sistemskog tipa JIA i sindroma aktivacije makrofaga za vrijeme obdukcije uzeti su uzorci slezene, jetara, limfnih čvorova, pluća i koštane srži, koji su

imunohistološki obojeni s monoklonskim antitijelom na IL-18. Samo je u koštanoj srži nađen povišeni broj stanica koje izražavaju IL-18. Na temelju dobivenog rezultata zaključili su da je vjerojatno koštana srž osnovni organ u patogenezi sistemskog JIA.<sup>155</sup> Prema tome, značajno povišena razina IL-18 u perifernoj krvi podrijetlom iz koštane srži, povećava mogućnost da koštana srž sadržava obilje proupalnih citokina potaknutih IL-18. Ta je hipoteza potpomognuta i radovima o nekoliko tipova virusa, kao što su: varicella ili parvovirus B19, koji potiču supresiju koštane srži, što može dovesti do kratkotrajne kliničke remisije u djece s tvrdokornim sistemskim tipom JIA.<sup>156,157</sup>

Za razliku od razine IL-18 u serumu bolesnika s JIA (neovisno o tipu bolesti), koja se nije razlikovala od kontrolne skupine, razina IL-10 u serumu bolesnika u remisiji bila je značajno viša od kontrolne skupine, dok je u aktivnoj fazi ona bila bitno viša, ali ne i statistički značajna (što se dijelom može objasniti velikom varijabilnošću uzoraka). Budući da su prema dosadašnjim radovima razine većine citokina, uključujući i IL-10, u serumu vrlo niske, gotovo nemjerljive,<sup>120,121,152,158</sup> odlučili smo se za analizu citokina i u nadtalogu kultura stimuliranih (s PMA) i nestimuliranih limfocita kako bismo lakše uvidjeli postoji li uistinu usmjerenje limfocita T u Th1, odnosno Th2. Za razliku od razine IL-10 u serumu bolesnika koja je samo u remisiji bila statistički viša u odnosu prema kontrolnoj skupini, razina IL-10 u nadtalogu kultura stimuliranih i nestimuliranih limfocita i u remisiji i u aktivnoj fazi bila je statistički značajno viša od kontrolne skupine. Nažalost, razina IL-18 u nadtalogu kultura stimuliranih i nestimuliranih limfocita bila je ispod praga detekcije kita, što možemo objasniti jedino na taj način da aktivirani makrofagi, a ne podraženi limfociti, većinom luče IL-18.

Uspoređujući razliku u razini IL-10 između pojedinih tipova JIA, nađena je značajno povišena razina IL-10 u serumu bolesnika sa sistemskim tipom JIA u remisiji bolesti. U nadtalogu kultura nestimuliranih limfocita razina IL-10 u bolesnika sa sistemskim tipom JIA bila je u aktivnoj fazi značajno viša u odnosu prema drugim tipovima JIA i kontrolnoj skupini. Naši su rezultati u skladu s radom Raziuddina i suradnika koji su pronašli značajno povišene razine IL-10 u kulturi stimuliranih (anti-CD3, anti-CD 28, anti-CD3/anti-CD28) i nestimuliranih mononuklearnih stanica periferne krvi u bolesnika sa sistemskim tipom JIA u aktivnoj fazi bolesti u odnosu prema zdravoj djeci i bolesnicima s RA.<sup>125</sup>

Uspjeli smo dokazati povezanost razine IL-10 i titra ANF u aktivnoj fazi, odnosno bolesnici s pozitivnim titrom ANF imali su više razine IL-10 u serumu u aktivnoj fazi u odnosu prema bolesnicima s negativnim titrom ANF, dok Murray i suradnici nisu našli povezanost ANF i IL-10.<sup>119</sup>

Nismo pronašli povezanost laboratorijskih nalaza aktivne bolesti i razine IL-10.

Za razliku od IL-18, u sinovijalnoj tekućini razina IL-10 bila je značajno viša od razine IL-10 u serumu bolesniku s oligoartikularnim tipom JIA. Nedostatak je našeg rada što svi bolesnici u kojih je učinjena punkcija zgloba imaju oligoartikularni tip JIA, te nismo u mogućnosti ispitati postoji li razlika u razini IL-10 u sinovijalnoj tekućini između oligoartikularnog i poliartrikularnog tipa. Do sada je objavljeno samo nekoliko radova o razini IL-10 u sinovijalnoj tekućini i/ili sinoviji bolesnika s JIA. U radu Scole i suradnika nije nađena značajna razlika u izražaju mRNA IL-10 u sinoviji između bolesnika s teškim poliartrikularnim tipom JIA i kontrolne skupine, što može upućivati na gubitak regulacije u teškim i kroničnim tipovima bolesti.<sup>122</sup> Murray i suradnici određivali su razinu mRNA IL-10 u sva tri tipa JIA, te su pokazali da je izražaj mRNA IL-10 u sinovijalnoj tekućini i sinoviji manji u bolesnika sa sistemskom tipom JIA, dok nije bilo razlike između bolesnika s oligoartikularnim i poliartrikularnim tipom JIA. Češće su detektirali mRNA IL-

10 u bolesnika s ne-erozivnim artritisom nego u bolesnika s erozivnim artritisom.<sup>119</sup> Također je određivan i izražaj mRNA IL-10 u sinovijalnoj tekućini bolesnika s RA, koji je bio značajno viši u odnosu prema kontrolnoj skupini (bolesnicima s uričnim artritisom), te je bio povezan s razinom C–reaktivnog proteina i brzinom sedimentacije eritrocita. Bolesnici s vrlo teškim RA, koji je odgovarao stadiju IV prema Steinbrockerovim kriterijima,<sup>159</sup> imali su niske razine mRNA IL-10 u odnosu prema IL-12 (Th1) i izrazito povišene razine C–reaktivnog proteina, brzinu sedimentacije eritrocita i broja trombocita. Zaključili su da je smanjena sinteza IL-10 u bolesnika s vrlo teškim RA vjerojatno povezana s progresijom i/ili aktivnošću bolesti.<sup>160</sup>

Na osnovi naših rezultata možemo zaključiti da su limfociti u ciljnom tkivu, odnosno u upalom zahvaćenom zglobu, glavni izvor IL-10. Stoga u bolesnika s oligoartikularnim tipom JIA, koji u većini slučajeva imaju blagi, rijetko destruktivan artritis s dugim razdobljima remisije i dobrom prognozom bolesti, nalazimo povišene razine IL-10 u sinovijalnoj tekućini jer IL-10 nastoji suprimirati upalni proces u zglobu. S druge strane, na osnovi do danas objavljenih radova,<sup>119,122,160</sup> možemo pretpostaviti da u težim, destruktivnijim tipovima bolesti (poliartikularnim) on sam nije dovoljan da bi suprimirao kronični, destruktivni artritis, te je potrebno sinergističko djelovanje s drugim protuupalnim citokinima.

U radu smo pokazali da se razine proupalnog (IL-18) citokina i protuupalnog (IL-10) citokina u serumu bolesnika s oligoartikularnim i poliartikularnim tipom ne razlikuju od kontrolne skupine, pa njihova analiza u serumu u bolesnika s artikularnim tipovima JIA ne može biti korisna smjernica za utvrđivanje aktivnosti bolesti, odnosno ne može predstavljati prognostički čimbenik na temelju kojeg bi se mogao odrediti intenzitet bolesti i odgovor na liječenje.

Različito od oligoartikularnog i poliartikularnog tipa JIA, razine IL-18, koji stimulira Th1 imunosti odgovor, u serumu bolesnika sa sistemskim tipom značajno su više od razina IL-10 (Th2), i u

aktivnoj fazi i u remisiji bolesti, te možemo zaključiti da u sistemskom tipu JIA prevladava Th1 odgovor, što je u skladu s većinom do danas objavljenih istraživanja.<sup>122,126,161</sup> No s druge strane, neki radovi pokazuju da je u sistemskom tipu JIA identificiran suprotan profil citokina, odnosno dominantni Th2 profil.<sup>125,162</sup> Okamoto i suradnici pokazali su da je razina i IL-2 (Th1) i IL-4 (Th2) u bolesnika sa sistemskim tipom JIA u aktivnoj fazi bolesti značajno viša u odnosu prema zdravoj djeci, dok je omjer Th1/Th2 limfocita u bolesnika značajno manji nego u zdrave djece, odnosno u aktivnoj fazi bolesti značajno je povišena razina Th2 limfocita, a time je omjer Th1/Th2 smanjen. Prema tome, ravnoteža citokina u bolesnika sa sistemskim tipom JIA narušena je i usmjerena u dominantni Th2 profil.<sup>162</sup> Također su i Raziuddin i suradnici pokazali da je u sistemskom tipu bolesti jače izlučivanje citokina Th2 skupine (IL-4 i IL-10) iz stimuliranih mononuklearnih stanica periferne krvi.<sup>125</sup>

Naše istraživanje zajedno s drugim istraživanjima<sup>122,125,126,161-163</sup> upućuje na to da citokini imaju različite uloge u pojedinim tipovima JIA, te je moguće da odražavaju heterogenost tipova JIA. Zbog toga će biti potrebna daljnja istraživanja specifičnih citokina, među kojima smatramo da je to IL-18 za sistemski tip JIA, da bi se odredila različita uloga citokina u pojedinim tipovima JIA, odnosno različiti patogenetski mehanizam između, a možda i unutar tipova JIA, što će pridonijeti objašnjenju velike raznolikosti između pojedinih tipova ove bolesti, a time i boljem planiranju terapije.



## 6.2. Uloga regulacijskih limfocita T u juvenilnom idiopatskom artritisu

JIA je višesustavna autoimunosna bolest. Danas je poznato da regulacijski limfociti T imaju glavnu ulogu u homeostazi imunskog sustava. Važni su u održavanju tolerancije i time sprječavanja nastanka autoimunosti, odnosno njihovo odstranjenje uzrokuje nastanak mnogobrojnih autoimunskih bolesti.<sup>48,56,60,61</sup> Danas se vrlo malo zna o ulozi tih limfocita u JIA. Budući da smo u radu istraživali ulogu protuupalnog, imunosupresivnog citokina IL-10, koji luče i inducirani regulacijski limfociti T, navelo nas je da nastavimo istraživanje u smjeru daljnjeg razjašnjenja patogeneze bolesti, odnosno uloge regulacijskih limfocita T u JIA.

U istraživanje je bilo uključeno 34-ero djece s JIA (20 s oligoartikularnim tipom, devet s poliartikularnim tipom i pet sa sistemskim tipom JIA) i 23-oje djece u kontrolnoj skupini. Bolesnici sa sistemskim tipom JIA imali su značajno viši udio  $CD4^+CD25^+$  limfocita, u aktivnoj fazi i u remisiji bolesti, u odnosu prema djeci s oligoartikularnim i poliartikularnim tipom JIA, te kontrolnoj skupini. Udio  $CD4^+CD25^+$  limfocita u djece s poliartikularnim tipom JIA u remisiji bio je značajno viši nego u djece s oligoartikularnim tipom i kontrolne skupine. Taj povećani udio  $CD4^+CD25^+$  limfocita u sistemskom i poliartikularnom tipu JIA upućuje na to da je za vrijeme klinički mirne faze bolesti i dalje prisutna upalna aktivnost imunološkog sustava.

Suprotno našim očekivanjima, nismo našli razlike u regulacijskim limfocitima T (definiranim kao  $CD4^+CD25^{++}$  i  $CD4^+CD25^{++}CCR4^+$ )<sup>50-53,55,56,64</sup> između kontrolne skupine i bolesnika s JIA za vrijeme aktivne faze bolesti. S druge strane, kontrolna skupina imala je više regulacijskih limfocita T nego djeca s JIA u remisiji bolesti. Između tipova JIA, broj  $CD4^+CD25^{++}$  limfocita bio je povišen u djece sa sistemskim tipom JIA za vrijeme remisije bolesti. Naši rezultati upućuju na to da bi smanjenje regulacijskih limfocita T za vrijeme remisije bolesti moglo učiniti bolesnike sklonim

gubitku imunotolerancije i time uzrokovati aktivaciju bolesti. Možemo pretpostaviti da jedanput kad je aktiviran autoimunosni proces, regulacijski limfociti T, i usprkos svojem povećanju, više ga ne mogu kontrolirati. Da bismo mogli objasniti svoje rezultate, kao i pretpostavke, potrebno je dalje nastaviti istraživanje u koje će biti uključen veći broj bolesnika.

Do danas su objavljena samo dva rada koja govore o ulozi regulacijskih limfocita T u artritisu. U prvom radu, Cao i suradnici ispitivali su postojanje regulacijskih ( $CD4^+CD25^{++}$ ) limfocita T u ciljnim organima (zahvaćenim zglobovima) u bolesnika s RA. Nisu pronašli razliku u regulacijskim limfocitima T između bolesnika i zdravih ispitanika, dok je broj regulacijskih limfocita T u sinovijalnoj tekućini u bolesnika s RA bio značajno viši u odnosu prema perifernoj krvi. Autori smatraju da imunosni sustav upravo porastom broja regulacijskih limfocita T u upalom zahvaćenim zglobovima nastoji djelovati na autoimunosne reakcije i na samu upalu u ciljnim organima.<sup>164</sup> No kako je pokazano u ovom radu, taj je porast broja još nedovoljan da bi se spriječila upala. U drugom radu, koji je zapravo jedini do sada objavljeni rad o ulozi regulacijskih ( $CD4^+CD25^{++}$ ) limfocita T u bolesnika s oligoartikularnim tipom JIA, određivala se razlika u razini regulacijskih limfocita T između proširenog i perzistirajućeg oligoartikularnog tipa JIA. U objema skupinama bolesnika razina regulacijskih limfocita T bila je značajno niža u perifernoj krvi u odnosu prema zdravim ispitanicima, dok je s druge strane razina regulacijskih limfocita T u perifernoj krvi bolesnika bila značajno niža nego u sinovijalnoj tekućini bolesnika. U značajnom većem broju, i u perifernoj krvi i sinovijalnoj tekućini, nađeni su regulacijski limfociti T u perzistirajućem u odnosu prema proširenom oligoartikularnom tipu, te su zaključili da regulacijski limfociti T imaju važnu ulogu u određivanju bolesnikove «sudbine» tj. usmjeravanja bolesti bilo prema povoljnom, benignom perzistirajućem, bilo prema znatno nepovoljnijem, proširenom oligoartikularnom tipu JIA.<sup>165</sup>

Na osnovi rezultata tih dvaju radova možemo pretpostaviti da lokalna imunosupresija putem regulacijskih limfocita T utječe na aktivnost bolesti i njezinu daljnju progresiju. To bi značilo da povećanjem broja regulacijskih limfocita T u upalom zahvaćenim zglobovima, imunosni sustav pokušava regulirati autoimunosnu reakciju i upalu u ciljanim organima. No, ako je to uistinu tako, nameće se pitanje: zašto usprkos nazočnosti regulacijskih limfocita T u zglobovima nastaje kronična upala i autoimunosna reakcija? Postoji nekoliko hipoteza: prva, nazočnost regulacijskih limfocita T odgađa ili sprječava progresiju prema erozivnoj upali; druga, regulacijski limfociti T uzrokuju supresiju imunosnog sustava te na taj način onemogućuju da se upala povuče i time dovode do neprekidne kronične upale; i treće, unatoč njihovom povećanju, još nije dovoljno regulacijskih limfocita T da se suzbije upala.<sup>164</sup> Bit će potrebne još mnogobrojne studije da se odredi uloga regulacijskih limfocita T u različitim stadijima aktivnosti bolesti, kao i u kroničnoj upali. Također od velike je važnosti otkriti jesu li te supresijske stanice prisutne i u staničnim infiltratima u sinoviji, budući da je njihovo regulacijsko djelovanje ovisno o dodiru.<sup>166</sup> Imunohistokemijska bojenja bioptata sinovije upućuju na to da izražaj limfocita T u infiltratima nije znatan,<sup>167</sup> što upozorava na bitno manju razinu regulacijskih limfocita T u sinoviji u odnosu prema sinovijalnoj tekućini.

Osim prirodnih regulacijskih limfocita T opisana je i druga skupina tzv. inducirani regulacijski limfociti T (TR<sub>1</sub>) koji inhibiraju antigen - specifični imunološki odgovor putem sekrecije IL-10 i TGF- $\beta$ .<sup>48,71,72</sup> U našem istraživanju nađen je povišeni broj regulacijskih limfocita T (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>++</sup>) u bolesnika sa sistemskim tipom JIA za vrijeme remisije bolesti. Također, nađena je i značajno povišena razina IL-10 u serumu bolesnika sa sistemskim tipom JIA u remisiji bolesti, koja je povezana s brojem regulacijskih limfocita T (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>++</sup>). Na osnovi tih rezultata možemo

pretpostaviti da su to inducirani regulacijski limfociti čija je razina, prema tome, povišena u remisiji bolesti u bolesnika sa sistemskim tipom JIA. Iako su dostupni podaci o lučenju imunosupresivnih citokina IL-10 i TGF- $\beta$  i njihovoj ulozi u supresiji putem regulacijskih limfocita T vrlo sporni, radovi Kleera i Fontenota pokazuju da je izražaj FoxP3 povezan s povećanjem mRNA IL-10 u regulacijskim limfocitima T.<sup>81,165</sup> Kleer i suradnici pokazali su da regulacijski (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>++</sup>) limfociti T iz sinovijalne tekućine u bolesnika s oligoartikularnim tipom JIA imaju pojačani izražaj mRNA IL-10 u usporedbi s onima iz periferne krvi i s CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> limfocitima T iz sinovijalne tekućine, što upućuje na aktivnu ulogu IL-10 za vrijeme supresije upale regulacijskim limfocitima T u zglobovima bolesnika.<sup>165</sup> Prijašnje studije o povezanosti IL-10 i artritisa upućivale su da je nedostatak IL-10 za vrijeme upale jedan od mogućih mehanizama koji dopušta da se dalje nastavlja upala u zglobu.<sup>168-170</sup>

Možemo zaključiti da su potrebna još mnogobrojna istraživanja regulacijskih limfocita T koja bi omogućila bolje razumijevanje imunotolerancije, a time i mehanizma nastanka autoimunskih bolesti. Do danas su otkrivene dvije populacije regulacijskih limfocita T, što nas navodi na razmišljanje da možda postoji još subpopulacija. Također otkriven je i veći broj biljega na površini regulacijskih limfocita T,<sup>45,48</sup> no smatramo da je potrebna identifikacija specifičnih biljega za odvojene populacije regulacijskih limfocita T kako bi njihova fiziološka uloga u različitim bolestima bila točno određena.

### 6.3. Nove smjernice u liječenju bolesnika s juvenilnim idiopatskim artritisom

Nekoliko nedavno provedenih kliničkih studija bavi se problemom prognoze djece s JIA, te utjecaja bolesti na psihosocijalno funkcioniranje odraslih koji su u dječjoj dobi oboljeli od JIA.<sup>171-</sup>

<sup>174</sup> U djece s JIA ne nastaje uvijek «trajna remisija», znatan broj djece nastavlja s epizodama artritisa u odrasloj dobi, te se teža ometanost zbog trajnog oštećenja zglobova javlja u približno 40% bolesnika.<sup>172</sup> Djeca s pozitivnim nalazom RF i ona oboljela od sistemskog tipa JIA s kroničnim sinovitisom imaju bitno lošiju prognozu.<sup>173</sup> Studija Frencha i suradnika pokazala je povećani mortalitet odraslih koji su u dječjoj dobi oboljeli od JIA, za što smatraju da je odgovorna pojava i drugih autoimunskih bolesti u tih bolesnika, no za točan razlog trebat će daljnje praćenje bolesnika.<sup>174</sup> Prema tome, cilj liječenja nije više samo suzbiti boli nego i zaustaviti i liječiti autoimunosnu upalu, čime se sprječava nastanak ireverzibilnih promjena ciljnih tkiva i trajne invalidnosti. Uz medikamentozno liječenje svakako je bitno održavanje funkcionalnog statusa lokomotornog sustava što se postiže redovitom fizikalnim vježbama. Ne postoje podaci koji govore da se djeci s JIA treba zabraniti sudjelovanje u aktivnostima za koje se oni osjećaju sposobnim da mogu obavljati. Iz te skupine treba izuzeti djecu s nestabilnom vratnom kralježnicom koju treba odgovoriti od sudjelovanja u aktivnostima (sportu) u kojima postoji rizik za tešku ozljedu kralježnične moždine.<sup>175,176</sup>

Kako napreduju istraživanja patogeneze reumatskih bolesti, tako se javljaju i bitni pomaci u njihovu liječenju, osobito posljednjih 10-15 godina. U prvoj polovici 20. stoljeća gotovo svi tradicionalni temeljni lijekovi za reumatske bolesti slučajno su otkriće. Iznimka su sulfasalazin, koji je ciljano sintetiziran za liječenje RA, i auranofin kao modifikacija parenteralnih pripravaka soli zlata.<sup>177</sup> Skoro pola stoljeća paleta antireumatika nije se bitno mijenjala. Tek su devedesetih godina 20.

stoljeća istraživanja u području molekularne biologije i molekularne genetike omogućila velik napredak u razumijevanju patogeneze reumatskih bolesti, čime počinje novo razdoblje u liječenju reumatskih bolesti. Uvode se preparati s ciljanim djelovanjem na određene sekvence autoimunskog upalnog procesa, tzv. biološki preparati. Cilj je biološke terapije ponovna uspostava imunološke homeostaze, što se nastoji postići na nekoliko načina: izravnom infuzijom citokina (npr. rekombinantni IL-10), poticanjem ili blokadom lučenja citokina (kortikosteroidi), vezanjem za topljive citokine (npr. blokada TNF- $\alpha$ ), kompetitivnim vezanjem za receptore (npr. IL-1Ra) i inhibicijom signalne transdukcije (leflunomid). Blokada citokina postala je osnova biološke terapije, a postignuta je uporabom monoklonskih neutralizirajućih protutijela, rekombinantnih topljivih citokinskih receptora i drugih proteina koji vežu citokine (engl. *cytokine binding proteins*).<sup>178</sup> Danas na tržištu, za liječenje JIA, postoje tri anticitokinska lijeka: etanercept (Enbrel), infliximab (Remicade) i anakinra (Kineret).<sup>179</sup> Etanercept je fuzijski protein građen od dvaju istovjetnih lanca: rekombinantnog topljivog receptora (p75) koji je fuzioniran s Fc regijom humanog IgG1. On veže cirkulirajuće molekule TNF- $\alpha$  i limfotoksin (TNF- $\beta$ ), te inhibira njihovo djelovanje.<sup>179-181</sup> Infliximab je monoklonsko protutitijelo klase IgG1 usmjereno protiv TNF- $\alpha$ , ali ne djeluje na TNF- $\beta$ .<sup>178,179,182,183</sup> Anakinra je rekombinantni neglikolizirani oblik humanog IL-1Ra koji vežući se kompetitivno za IL-1Ra, blokira biološku aktivnost IL-1.<sup>178,179,184</sup> Provode se i mnoga istraživanja drugih bioloških pripravaka kao što su: monoklonska protutijela na molekule na površini limfocita T: CD4 (anti-CD4), na molekule na površini limfocita B: CD20 (anti-CD20), na aktivacijske antigene: CD25 (anti-TAC), na adhezijske molekule: ICAM-1/LFA-1 interakcija (anti-CD11a receptor), na komplement: C5 (anti-C5) i na kostimulacijske molekule: CD40L (anti-CD40L). Istražuju se također i biološki pripravci koji djeluju na kostimulacijske molekule između limfocita T i predočnih stanica (CD28/B7 interakcija, (CTLA -4 Ig)) i biološke tvari usmjerene na interakciju antigen -

MHC - TCR. Istraživanja provedena o primjeni rekombinantnog IL-10 u bolesnika s RA i JIA nisu dala očekivane rezultate,<sup>185</sup> dok s druge strane istraživanja vezana za monoklonska protutijela na receptor IL-6 u bolesnika s RA i sistemskim tipom JIA vrlo su obećavajuća.<sup>186</sup>

Do danas je opisano nekoliko proupalnih citokina (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) za koje se smatra da su uključeni u patogenezu sistemskog tipa JIA.<sup>1108,187-190</sup> Pokazano je pojačano lučenje IL-1 iz mononuklearnih stanica periferne krvi,<sup>187</sup> povišene razine IL-6 i topljivog IL-6R u perifernoj krvi,<sup>188</sup> povezanost povišene razine IL-6 u serumu i trombocitoze,<sup>108</sup> te povišene razine IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 i IL-7 u perifernoj krvi bolesnika sa sistemskim tipom JIA.<sup>154,189,190</sup> Još nije utvrđen ključni medijator (citokin) sistemskog tipa JIA. Naše istraživanje, kao i istraživanje Maena i suradnika,<sup>146</sup> upućuje na to da bi sustavno lučenje IL-18 moglo biti vrlo važno u patogenezi sistemskog tipa JIA, te bi u bolesnika s teškim sistemskim JIA, u kojih nema odgovora na primijenjenu standardnu terapiju, biološki pripravci koji neutraliziraju IL-18 bili puno djelotvornija terapija, nego ona koja se postiže anti-TNF- $\alpha$  pripravcima. Nedavno su započeti klinički pokusi dva biološka pripravka za neutralizaciju IL-18: a) rekombinantni IL-18BP (rIL-18BP) (trenutačno se provodi faza IIa pokusa u bolesnika s psorijazom i faza I u RA), i b) anti IL-18 protutijelo (ABT-325), čija je faza I kliničkog pokusa za primjenu u autoimunskim bolestima počela u svibnju 2003. godine, a sada se očekuje početak faze II.<sup>191</sup>

Sposobnost regulacijskih limfocita T da kontroliraju imunološki odgovor čini ih izvrsnom metom za razvoj nove terapije. Ohrabruje činjenica da manipulacija TCR i kostimulacijskih signala (molekula) pojačava djelovanje regulacijskih limfocita T *in vivo*.<sup>192,193</sup> No ipak bit će potrebna još mnogobrojna istraživanja da bi se počelo liječenje regulacijskim limfocitima T.

Kliničke studije o biološki pripravcima daju nam nadu da će upravo biološka terapija imati glavni utjecaj na tijek i ishod bolesti. Nastoje se proširiti indikacije za uporabu bioloških pripravaka i na bolesnike s blažim tipovima bolesti. Također, vjeruje se da će biološka terapija u osnovi promijeniti današnje liječenje svih kroničnih autoimunskih bolesti.



## 7. ZAKLJUČCI

---

1. Serumska razina IL-18 u sistemskom tipu JIA značajno je povišena u odnosu prema oligoartikularnom i poliartrikularnom tipu bolesti i u aktivnoj fazi i u remisiji bolesti, dok se razina IL-18 u oligoartikularnom i poliartrikularnom tipu ne razlikuje od kontrolne skupine ispitanika. Razina IL-18 u sinovijalnoj tekućini ne razlikuje se od one u serumu, što govori u prilog da je sustavna proizvodnja IL-18 vjerojatno važna u imunopatogenezi sistemskog tipa JIA.
2. Razina IL-18 u bolesnika povezana je s laboratorijskim nalazima aktivne bolesti, tj. s ubrzanom sedimentacijom eritrocita, povišenom razinom C-reaktivnog proteina, anemijom, trombocitozom i s povišenom razinom  $\alpha$ 2-globulina.
3. Razina IL-18 u sistemskom tipu JIA značajno se smanjuje tijekom remisije bolesti, no i dalje ostaje povišenom u odnosu prema drugim tipovima JIA i kontrolnoj skupini. To pokazuje da je za vrijeme klinički «mirne» faze bolesti još prisutna upalna aktivnost. Navedeni rezultati nedvosmisleno upućuju na to da je serumska razina IL-18 znatno bolji i informativniji pokazatelj aktivnosti bolesti u bolesnika sa sistemskim tipom JIA.
4. Razina IL-10 u serumu i nadtalogu kultura stimuliranih i nestimuliranih limfocita bolesnika s JIA viša je nego u kontrolnoj skupini ispitanika.
5. U bolesnika s oligoartikularnom tipom JIA razina IL-10 u sinovijalnoj tekućini značajno je viša od razine IL-10 u serumu, što govori da su limfociti u ciljnom tkivu, odnosno u upalom zahvaćenom zglobu, glavni izvor IL-10.
6. Serumske razine IL-18 i IL-10 u bolesnika s oligoartikularnim i poliartrikularnim tipom JIA ne razlikuju se značajno od nalaza kontrolne skupine, što govori da analiza tih citokina u

artikularnim tipovima JIA ne može biti korisna smjernica za utvrđivanje aktivnosti bolesti, odnosno važan prognostički čimbenik.

7. Budući da IL-18 stimulira Th1-imunosni odgovor, nalaz njegove povišene razine u odnosu prema razini IL-10 (Th2) u sistemskom tipu JIA govori da u tom tipu bolesti prevladava Th1 imunosni odgovor.
8. Udio i broj regulacijskih limfocita T ( $CD4^+CD25^{++}$  i  $CD4^+CD25^{++}CCR4^+$ ) u perifernoj krvi bolesnika s JIA u aktivnoj bolesti ne razlikuje se od nalaza kontrolne skupine. Međutim, udio i broj  $CD4^+CD25^{++}$  značajno se razlikuje između pojedinih tipova JIA tijekom remisije bolesti: dok se u sistemskom tipu JIA nalazi značajno povišenje broja  $CD4^+CD25^{++}$  limfocita u krvi, udio  $CD4^+CD25^{++}$  i  $CD4^+CD25^{++}CCR4^+$  u oligoartikularnom i poliartikularnom tipu JIA značajno je snižen u odnosu prema kontrolnoj skupini. Važnost tog nalaza bit će moguće interpretirati tek daljnjim praćenjem bolesnika, odnosno praćenjem tijeka njihove osnovne bolesti.
9. U sistemskom tipu JIA značajno je povišen broj  $CD4^+CD25^{++}$  limfocita T i serumska razina IL-10 tijekom remisije bolesti. Statistički značajna povezanost tih dvaju nalaza mogla bi upućivati da je riječ o regulacijskim limfocitima T koji ujedno izlučuju IL-10.

## 8. LITERATURA

---

1. Petty RE, Cassidy JT. Introduction to the Study of Rheumatic Diseases in Children. U: Cassidy JT, Petty RE. Textbook of Pediatric Rheumatology 4 izd. W. B. Saunders Company. Philadelphia, London, New York, St. Louis, Sidney, Toronto 2001:2-7 str.
2. Rotschild BM, Woods RJ. Symmetrical erosive disease in Archaic Indians: the origin of rheumatoid arthritis in the New World? *Arthritis Rheum* 19:278,1990.
3. Barlow T. 51<sup>st</sup> Annual Meeting of the BMA, Section of Diseases of Children. *BMJ* 2:509, 1983.
4. Schneider R, Passo MH. Juvenile rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin N Am* 2002;28:503-530.
5. Petty RE. Classification of childhood arthritis: a work in progress. *Baillieres Clin Rheumatol* 1998;12:181-190.
6. Brewer EJ, Bass JC, Cassidy TJ. Criteria for the classification of juvenile rheumatoid arthritis. *Bull Rheum Dis* 1973;23:712-719.
7. Brewer EJ, Bass JC, Baum J, Cassidy JT, Fink C, Jacobs J, Hanson V, Levinson JE, Schaller J, Stillman JS. Current proposed revision of JRA Criteria. JRA Criteria Subcommittee of the Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Section of The Arthritis Foundation. *Arthritis Rheum* 1977;20:195-199.
8. Wood PH. Nomenclature and classification of arthritis in children. U: Munthe E, ur. The care of rheumatic children. Basel, European League Against Rheumatism Publisher 1978, str:47-50.
9. Petty RE, Southwood TR, Baum J, Bhattay E, Glass DN, Manners P, Maldonado-Cocco J, Suarez-Almazor M, Orozco-Alcala J, Prieur AM. Revision of the proposed classification criteria for juvenile idiopathic arthritis: Durban, 1997. *J Rheumatol* 1998;25:1991-4.

10. Hochberg MC. The epidemiology of juvenile rheumatoid arthritis: Review of current status and approaches for future research. U: Lawrence RC, ur. Current Topics in Rheumatology: Epidemiology of the Rheumatic Diseases. New York, Gower Medical Publishing Ltd 1984, str 220-230.
11. Petty RE, Cassidy JT. Juvenile Idiopathic Arthritides. U: Textbook of pediatric rheumatology 4. izd., WB Saunders company; Philadelphia, London, New York, St. Louis, Toronto 2001, str: 214-321.
12. Oen K. Comparative epidemiology of the rheumatic diseases in children. Curr Opin Rheumatol 2000; 12:410-414.
13. Schwartz MM, Simpson P, Kerr KL, Jarvis JN. Juvenile rheumatoid arthritis in African Americans. J Rheumatol 1997; 24: 1826-1829.
14. Jarvis JN. Juvenile rheumatoid arthritis: A guide for pediatricians. Pediatric Annals 2002; 31: 437-446.
15. Akduman L, Kaplan H, Tychsen L. Prevalence of uveitis in outpatient juvenile arthritis clinic: onset of uveitis more than a decade after onset of arthritis. J Pediatr Ophthalmol Strabismus 1997; 34: 101-106.
16. Naidu SH, Ostrov BE, Pellegrini VD Jr. Isolated digital swelling as the initial presentation of juvenile rheumatoid arthritis. J Hand Surg 1997;22:653-657.
17. Walton AG, Welbury RR, Thomason JM, Foster HE. Oral health and juvenile idiopathic arthritis: a review. Rheumatology 2000; 39:550-555.
18. van der Net J, Kuis W, Prakken AB, Lukkassen I, Sinnema G, Hutter AP, Brackel HJ, de Wilde EJ, Helders PJ. Correlates of disablement in polyarticular juvenile chronic arthritis – a cross-sectional study. Br J Rheumatol 1996;35:91-100.

19. Isdale IC. Hip disease in juvenile rheumatoid arthritis. *Ann Rheum* 1970;29:603-608.
20. Rombouts JJ, Rombouts-Lindemans C. Involvement of the hip in juvenile rheumatoid arthritis. A radiological study with special reference to growth disturbances. *Acta Rheumatol Scand*. 1971;17:248-267.
21. Blane CE, Ragsdale CG, Hesinger RN. Late effects of JRA on the hip. *J Pediatr Orthop* 1987;7:677-680.
22. Isdale IC, Bywaters EGL. The rash of rheumatoid arthritis and Still disease. *Q J Med* 1956;25:377.
23. Ansell BA, Rudge S, Schaller JG. *A Colour Atlas of Paediatric Rheumatology*. Aylesbury, UK, Wolfe, 1991.
24. Cassidy JT, Levinson JE, Bass JC, Baum J, Brewer EJ Jr, Fink CW, Hanson V, Jacobs JC, Masi AT, Schaller JG. A study of classification criteria for a diagnosis of juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1986;29:274-281.
25. Schneider R, Lang BA, Reilly BJ, Laxer RM, Silverman ED, Ibanez D, Bombardier C, Roifman CM. Prognostic indicators of joint destruction in systemic-onset juvenile rheumatoid arthritis. *J Pediatr* 1992;120:200-205.
26. Lin SJ, Huang JL, Chao HC, Lee WY, Yang MH. A follow-up study of systemic-onset juvenile rheumatoid arthritis in children. *Taiwan Erh Ko I Hsueh Hui Tsa Chih* 1999;40:176-181.
27. Lomater C, Gerloni V, Gattinara M, Mazzotti J, Cimaz R, Fantini F. Systemic onset juvenile idiopathic arthritis: a retrospective study of 80 consecutive patients followed for 10 years. *J Rheumatol* 2000;27:491-496.

28. Lang BA, Shore A. A review of current concepts on the pathogenesis of juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1990, Suppl 21:1-15.
29. Jarvis JN. Pathogenesis and mechanisms of inflammation in childhood rheumatic diseases. *Curr Opin Rheumatol* 1998;10:459-467.
30. Glass DN, Giannini EH. JRA as a complex genetic trait. *Arthritis Rheum* 1999;42:2261-2268.
31. Rachelefsky GS, Terasaki PI, Katz R, Stiehm ER. Increased prevalence of B27 in juvenile rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 1974; 290:892-893.
32. Ploski R, Undlien DE, Vinje O, Forre O, Thorsby E, Ronningen KS. Polymorphism of human major histocompatibility complex-encoded transporter associated with antigen processing (TAP) genes and susceptibility to juvenile rheumatoid arthritis. *Hum Immunol* 1994;39:54-60.
33. Prahalad S, Kingsbury DJ, Griffin TA, Cooper BL, Glass DN, Maksymowych WP, Colbert RA.. Polymorphism in the MHC-encoded LMP7 gene: association with JRA without functional significance for immunoproteasome assembly. *J Rheumatol* 2001;28:2320-2325.
34. Forre O, Smerdel A. Genetic epidemiology of juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol* 2002;31:123-128.
35. Date Y, Seki N, Kamizono S, Higuchi T, Hirata T, Miyata K, Ohkuni M, Tatsuzawa O, Yokota S, Joo K, Ueda K, Sasazuki T, Kimura A, Itoh K, Kato H. Identification of a genetic risk factor for systemic juvenile rheumatoid arthritis in the 5'-flanking region of the TNFalpha gene and HLA genes. *Arthritis Rheum* 1999;42:2577-82.
36. Maksymowych WP, Gabriel CA, Luyrink L, Van Kerckhove C, Leiden J, Choi E, Glass DN. Polymorphic markers related to a single Tcrb-V6 gene segment. *Immunogenetics* 1991;33:281-285.

37. McDowell TL, Symons JA, Ploski R, Forre O, Duff GW. A genetic association between juvenile rheumatoid arthritis and a novel interleukin-1 alpha polymorphism. *Arthritis Rheum* 1995;38:221-228.
38. Vencovsky J, Jarosova K, Ruzickova S, Nemcova D, Niederlova J, Ozen S, Alikasifoglu M, Bakkaloglu A, Ollier WE, Mageed RA. Higher frequency of allele 2 of the interleukin-1 receptor antagonist gene in patients with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2001;44:2387-2391.
39. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P. The effect of novel polymorphism in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 1998;102:1369-1376.
40. Crawley E, Kay R, Sillibourne J, Patel P, Hutchinson I, Woo P. Polymorphic haplotypes of the interleukin-10 5' flanking region determine variable interleukin-10 transcription and are associated with particular phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999;42:1101-1108.
41. Sanjeevi CB, Miller EN, Dabadghao P, Rumba I, Shtauvere A, Denisova A, Clayton D, Blackwell JM.. Polymorphism at NRAMP1 and D2S1471 loci associated with juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43:1397-13404.
42. Donn RP, Shelley E, Ollier WE, Thomson W; British Paediatric Rheumatology Study Group. A novel 5'-flanking region polymorphism of macrophage migration inhibitory factor is associated with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2001;44:1782-1785.

43. Donn RP, Barrett JH, Farhan A, Stopford A, Pepper L, Shelley E, Davies N, Ollier WE, Thomson W. Cytokine gene polymorphisms and susceptibility to juvenile idiopathic arthritis. British Paediatric Rheumatology Study Group. *Arthritis Rheum* 2001;44:802-810.
44. Čulo F. Imunotolerancija. U: *Imunologija*. Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Marušić M, Taradi M, Višnjić D, 6. izd, Zagreb; Medicinska naklada, 2004; str. 245-262.
45. Sakaguchi S. Regulatory T cells: Key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 2000;101:455-458.
46. Čulo F i Batinić D. Organizacija imunskog sustava. U: *Imunologija*. Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Marušić M, Taradi M, Višnjić D, 6. izd, Zagreb; Medicinska naklada, 2004; str. 27-68.
47. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet* 2001;357:1777-1789.
48. Suci Foca N, Manavalan JS, Cortesini R. Generation and function of antigen-specific suppressor and regulatory T cells. *Transpl Immunol* 2003;11:235-244.
49. Nossal GR. Negative selection of lymphocytes. *Cell* 1994;76:229-239.
50. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chain (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995;155:1151-1164.
51. Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 2003;3:199-210.
52. Shevach EM. Certified professionals: CD4(+)CD25(+) suppressor T cells. *J Exp Med* 2001;193:F41-45.



53. Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 2002;3:135-142.
54. Hara M, Kingsley CI, Niimi M, Read S, Turvey SE, Bushnell AR. IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo. *J Immunol* 2001;166:3789-3796.
55. Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, Kuniyasu Y, Shimizu J, Otsuka F, Sakaguchi S. Thymus and autoimmunity: production of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol* 1999;162:5317-5326.
56. Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuettenberg A, Knop J, Enk AH. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med* 2001;193:1285-1294.
57. Lin CY, Graca L, Cobbold SP, Waldman H. Dominant transplantation tolerance impairs CD8<sup>+</sup> T cells function but not expansion. *Nat Immunol* 2002;3:1208-1213.
58. Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 1970;18:723-737.
59. Moller G. Do suppressor T cells exist? *Scand J Immunol* 1988;27:247-250.
60. Levings MK, Sangregorio R, Roncarolo MG. Human CD25+CD4+ T-regulatory cells suppress naive and memory T-cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J Exp Med* 2001;193:1295-1302.
61. Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) regulatory properties from human blood. *J Exp Med* 2001;193:1303-1310.

62. Stephens LA, Mason D. CD25 is a marker for CD4<sup>+</sup> thymocytes that prevent autoimmune diabetes in rats, but peripheral T cells with this function are found in both CD25<sup>+</sup> and CD25<sup>-</sup> subpopulations. *J Immunol* 2000;165:3105-3110.
63. Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, Petrone AL, Holenbeck AE, Lerman MA, Naji A, Caton AJ. Thymic selection of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells induced by an antagonist self-peptide. *Nat Immunol* 2001;2:301-306.
64. Iellem A, Colantonio I, D'Ambrosio D. Skin- versus gut – skewed homing receptor expression and intrinsic CCR4 expression on human peripheral blood CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> suppressor T cells. *Eur J Immunol* 2003;33:1488-1496.
65. Thompson SD, Luyrink LK, Graham TB, Tsoras M, Ryan M, Passo MH, Glass DN. Chemokine receptor CCR4 on CD4<sup>+</sup> T cells in juvenile rheumatoid arthritis synovial fluid defines a subset of cells with increased IL-4 : INF- $\gamma$  mRNA ratios. *J Immunol* 2001;166:6899-6906.
66. Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG. A CD4<sup>+</sup> T cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997;389:737-742.
67. Bacchetta R, Bigler M, Touraine JL, Parkman R, Tovo PA, Abrams J, de Waal Malefyt R, de Vries JE, Roncarolo MG. High levels of interleukin 10 production in vivo are associated with tolerance in SCID patients transplanted with HLA mismatched hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 1994;179:493-502.
68. Kitani A, Chua K, Nakamura K, Strober W. Activated self-MHC-reactive T cells have the cytokine phenotype of Th3/T regulatory cell 1 T cells. *J Immunol* 2000;165:691-702.

69. Han HS, Jun HS, Utsugi T, Yoon JW. A new type of CD4+ suppressor T cell completely prevents spontaneous autoimmune diabetes and recurrent diabetes in syngeneic islet-transplanted NOD mice. *J Autoimmun* 1996;9:331.
70. Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL. Regulatory T cell clones induced oral tolerance suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 1994;265:1237.
71. Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med* 1999;190:995-1004.
72. Levings MK, Sangregorio R, Galbiati, Squadrone S, de Waal Malefyt R, Roncarolo MG. INF- $\alpha$  and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells. *J Immunol* 2001;166:5530-5539.
73. Barrat FJ, Cua DJ, Boonstra A, Richards DF, Crain C, Savelkoul HF, de Waal-Malefyt R, Coffman RL, Hawrylowicz M, O'Garra A. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2 inducing cytokines. *J Exp Med* 2002;195:603-616.
74. Dieckmann D, Bruett CH, Ploettner H, Lutz MB, Schuler G. Human CD4(+)CD25(+) regulatory contact-dependent T Cells induce interleukin 10-producing contact-independent type 1-like regulatory T cells. *J Exp Med* 2002;196:247-253.
75. Jonuleit H, Schmitt E, Kakirman H, Stassen M, Knop J, Enk AH. Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. *J Exp Med* 2002;196:255-260.
76. Gilliet M, Liu YJ. Human plasmacytoid-derived dendritic cells and the induction of T-regulatory cells. *Hum Immunol* 2002;63:1149-1155.

77. McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, Young DA, Shevach EM, Collins M, Byrne MC. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 2002;16:311-323.
78. Thompson C, Powrie F. Regulatory T cells. *Current Opinion in Pharmacology* 2004;4:408-414.
79. Khattri R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* 2003;4:337-342.
80. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by transcription factor Foxp3. *Science* 2003;299:1057-1061.
81. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003;4:330-336.
82. Walker MR, Kaspirowicz DJ, Gersuk VH, Benard A, Van Landeghen M, Buckner JH, Ziegler SF. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. *J Clin Invest* 2003;112:1437-1443.
83. Ramsdell F, Ziegler SF. Transcription factors in autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 2003;15:718-724.
84. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marions N, McGrady G, Wahl SM. Conversion of peripheral CD4+CD25-naïve T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 2003;198:1875-1886.
85. Zheng SG, Wang JH, Gray JD, Soucier H, Horwitz DA. Natural and induced CD4+CD25+ cells educate CD4+CD25- cells to develop suppressive activity; the role of IL-2, TGF-beta, and IL-10. *J Immunol* 2004;172:5213-5221.

86. Fantini MC, Becker C, Monteleone G, Pallone F, Galle PR, Neurath MF: Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol.* 2004;172:5149-5153.
87. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392:245-252.
88. Patterson S. Flexibility and cooperation among dendritic cells. *Nat Immunol* 2000;1:273-274.
89. Mellman I, Steinman RM. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 2001;106:255-258.
90. Kadowaki N, Liu YJ. Natural type 1 interferon-producing cells as a link between innate and adaptive immunity. *Hum Immunol* 2001;31:2547-2557.
91. Kuwana M. Induction of anergic and regulatory T cells by plasmacytoid dendritic cells and other dendritic cell subsets. *Hum Immunol* 2002;63:1156-1163.
92. Penna G, Vulcano M, Sozzani S, Adorini L. Differential migration behaviour and chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Hum Immunol* 2002;63:1164-1171.
93. Olweus J, BitMansour A, Warnke R, Thompson PA, Carballido J, Picker LJ, Lund-Johansen F. Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:12551-12556.
94. Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, de Waal Malefyt R, Liu YJ. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 1999;283:1183-1187.
95. Grouard G, Rissoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu YJ. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med* 1997;185:1101-1111.

96. Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, Colona M. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 1999;5:919-923.
97. Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, Antonenko S, Liu YJ. The nature of principal type 1 interferon – producing cells in human blood. *Science* 1999;284:1935-1937.
98. Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH. Induction of interleukin 10-producing non-proliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med* 2000;192:1213-1222.
99. Dhodapkar MV, Steinman RM, Krasovsky J, Munz C, Bhardwaj N. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med* 2001;193:233-238.
100. Gilliet M, Liu YJ. Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 2002;195:695-704.
101. Steinman RM, Turley S, Mellman I, Inaba K. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med* 2000;191:411-416.
102. Roncarolo MG, Levinhs MK, Traversari C. Differentiation of T regulatory cells by immature dendritic cells. *J Exp Med* 2001;193:F5-F9.
103. De Benedetti F, Ravelli A, Martini A. Cytokines in juvenile rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 1997;9:428-433.
104. Madson KL, Moore TL, Lawrence JM, Osborn TG. Cytokine levels in serum and synovial fluid of patients with juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1994;21:2359-2363.

105. De Benedetti F, Pignatti P, Gerloni V, Massa M, Sartirana P, Caporali R, Montecucco CM, Corti A, Fantini F, Martini A. Differences in synovial fluid cytokine levels between juvenile and adult rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1997;24:1403-1409.
106. Ozen S, Saatci U, Bakkaloglu A, Ozmdemir O, Besbas N, Kirazli S, Ozdemir S. Interleukin-1, -6, and -8 levels in juvenile chronic arthritis. *Clin Rheumatol* 1997;16:173-178.
107. Rooney M, Varsani H, Martin K, Lombard PR, Dayer JM, Woo P. Tumor necrosis factor alpha and its soluble receptors in juvenile chronic arthritis. *Rheumatology* 2000;39:432-438.
108. De Benedetti F, Massa M, Robbioni P, Ravelli A, Burgio GR, A Martini. Correlation of serum interleukin-6 levels with joint involvement and thrombocytosis in systemic juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1991;34:1158-1163.
109. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 1998;102:1369-1376.
110. Muzaffer MA, Dayer JM, Feldman BM; Pruzanski W, Roux-Lombard P, Schneider R, Laxer RM, Silverman ED. Differences in the profiles of circulating levels of soluble tumor necrosis factor receptors and interleukin 1 receptors antagonist reflect the heterogeneity of the subgroups of juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2002;29:1071-1078.
111. Marušić M, Grčević D. Fiziološki tijek imunoreakcije. U: *Imunologija*. Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Marušić M, Taradi M, Višnjić D, 6. izd, Zagreb; Medicinska naklada, 2004; str. 139-156.

112. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T-cell clones I. Definition according to profiles of activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136:2348-2357.
113. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cytokines. U: *Cellular and Molecular Immunology*. 4 izd, W. B. Saunders Company, Philadelphia, London, New York, St. Louis, Sydney, Toronto 2000, str: 235-269.
114. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. Cytokines. U: *Kuby Immunology*, 4 izd, W. H Freeman and Company, New York, 2000, str: 303-327.
115. Klein J, Horejši V. Cytokines and their receptors. U: *Immunology*, 2 izd., Blackwell Science Ltd, Qxford 1999, str: 291-327.
116. Fitch FW, Lancki DW, Gajewski TF. T-cell mediated immune regulation. Help and suppression. U: Paul WE. *Fundamental immunology*, 3 izd, Raven Press Ltd, New York 1993, str: 733-762.
117. Howard MC, Miyajima A, Coffman R. T-cell-derived cytokines and their receptors. U: Paul WE. *Fundamental immunology*, 3 izd, Raven Press Ltd, New York 1993, str: 763-791.
118. Fitzgerald KA, O'Neill LAJ, Gearing AJH, Callard RE. The cytokine. *Facts book*. 2 izd, Academic Press, London 2001.
119. Murray KJ, Grom AA, Thompson SD, Lieuwen D, Passo MH, Glass DN. Contrasting cytokine profiles in the synovium of different forms of juvenile rheumatoid arthritis and juvenile spondyloarthropathy: prominence of interleukin 4 in restricted disease. *J Rheumatol* 1998;25:1388-1398.



120. Kutukculer N, Caglayan S, Aydogdu F. Study of pro-inflammatory (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6) and T-cell-derived (IL-2, IL-4) cytokines in plasma and synovial fluid of patients with juvenile chronic arthritis: correlations with clinical and laboratory parameters. *Clin Rheumatol* 1998;17:288-292.
121. Berner B, Akca D, Jung T, Muller GA, Reuss-Borst MA. Analysis of Th1 and Th2 cytokines expressing CD4+ and CD8+ T cells in rheumatoid arthritis by flow cytometry. *J Rheumatol* 2000;27:1128-1135.
122. Scola MP, Thompson SD, Brunner HI, Tsoras MK, Witte D, van Dijk MA, Grom AA, Passo MH, Glass DN. Interferon- $\gamma$ :interleukin 4 ratio and associated type 1 cytokine expression in juvenile rheumatoid arthritis synovial tissue. *J Rheumatol* 2002;29:369-378.
123. Miossec P, Briolay J, Dechanet J, Wijdenes J, Martinez-Valdez H, Banchereau J. Inhibition of the production of proinflammatory cytokines and immunology by interleukin 4 in ex vivo model of rheumatoid synovitis. *Arthritis Rheum* 1992;35:874-883.
124. Chomarat P, Banchereau J, Miossec P. Differential effects of interleukin 10 and 4 on the production of interleukin-6 by blood and synovium monocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995;38:1046-1054.
125. Raziuddin S, Bahabri S, Al-Dalaan A, Siraj AK, AL-Sedairy S. A mixed Th1/Th2 cell cytokine response predominates in systemic onset juvenile rheumatoid arthritis: immunoregulatory IL-10 function. *Clin Immunol Immunopathol* 1998;86:192-198.
126. Ozen S, Tucker LB, Miller LC. Identification of Th subsets in juvenile rheumatoid arthritis confirmed by intracellular cytokine staining. *J Rheumatol* 1998;25:1651-1653.

127. Murray KJ, Luyrink L, Grom AA, Passo MH, Emery H, Witte D, Glass DN. Immunohistological characteristics of T cells infiltrates in different forms of childhood onset chronic arthritis. *J Rheumatol* 1996;23:2116-2124.
128. <http://www.copewithcytokine.de>
129. Gracie JA, Forsey RJ, Chan WL, Gilmour A, Leung BP, Greer MR, Greer MR, Kennedy K, Carter R, Wei XQ, Xu D, Field M, Foulis A, Liew FY, McInnes IB. A proinflammatory role for the IL-18 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1999;104:1393-1401.
130. Yamamura M, Kawashima M, Tanai M, Yamauchi H, Tanimoto T, Kurimoto M, Morita Y, Ohmoto Y, Makino H. Interferon- $\gamma$ -inducing activity of interleukin-18 in the joint with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2001;44:275-285.
131. Olee T, Hashimoto S, Quach J, Lotz M. IL-18 is produced by articular chondrocytes and induced proinflammatory and catabolic responses. *J Immunol* 1999;162:1096-1100.
132. Dayer JM. Interleukin-18, rheumatoid arthritis, and tissue destruction. *J Clin Invest* 1999;104:1337-1339.
133. Novick D, Kim SH, Fantuzzi G, Reznikov LL, Dinarello CA, Rubinstein M. Interleukin-18 binding protein: a novel modulator of the Th1 cytokine response. *Immunity* 1999;10:127-136.
134. Okamura H, Tsutsi H, Kawashiwamura SI, Yoshimoto T, Nakanishi K. Interleukin – 18: a novel cytokine that augments both innate and acquired immunity. *Adv Immunol* 1998;70:281-312.
135. Kawakami K, Qureshi MH, Zhang T, Okamura H, Kurimoto M, Saito A. IL-18 protects mice against pulmonary and disseminated infection with *Cryptococcus neoformans* by inducing IFN- $\gamma$  production. *J Immunol* 1997;159:5528-5534.

136. Yoshimoto T, Okamura H, Tagawa Y, Iwakura Y, Nakanishi K. Interleukin 18 together with interleukin 12 inhibits IgE production by induction of interferon- $\gamma$  production from activated B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3948-3953.
137. Rothe H, Jenkins NA, Copeland NG, Kolb H. Active stage of autoimmune diabetes is associated with the expression of a novel cytokine, IGIF, which is located near Idd2. *J Clin Invest* 1997;99:469-474.
138. Pizarro TT, Michie MH, Bentz M, Woraratanadharm J, Smith MF Jr, Foley E, Moskaluk CA, Bickston SJ, Cominelli F. IL-18 a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Chron's disease, expression and localization in intestinal mucosal cells. *J Immunol* 1999;162:6829-6835.
139. Dayer JM. Interleukin-18, rheumatoid arthritis, and tissue destruction. *J Clin Invest* 1999;104:1337-1339.
140. Vey E, Zhang JH, Dayer JM. IFN- $\gamma$  and 1,25(OH) $_2$ D $_3$  induce on THP-1 cells distinct patterns of cell surface antigen expression, cytokine production, and responsiveness to contact with activated T cells. *J Immunol* 1992;149:2040-2046.
141. Burger D, Rezzonico R, Li JM, Modoux C, Pierce RA, Welgus HG, Dayer JM. Imbalance between interstitial collagenase (MMP-1) and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in synovial cells and fibroblasts upon direct contact with stimulated T lymphocytes: involvement of membrane-associated cytokines. *Arthritis Rheum* 1998;41:1748-1759.
142. McInnes IB, Leung BP, Sturrock RD, Field M, Liew FY. Interleukin-15 mediates T cell-dependent regulation of tumor necrosis factor- $\alpha$  production in rheumatoid arthritis. *Nature Med* 1997;3:189-195.

143. Saha N, Moldovan F, Tardif G, Pelletier JP, Cloutier JM, Martel-Pelletier J. Interleukin 1 $\beta$ -converting enzyme/caspase-1 in human osteoarthritic tissues. Localization and role in the maturation of interleukin 1  $\beta$  and interleukin-18. *Arthritis Rheum* 1999;42:1577-1587.
144. Horwood NJ, Udagawa N, Elliott J, Grail D, Okamura H, Kurimoto M, Dunn AR, Martin T, Gillespie MT. Interleukin 18 inhibits osteoclast formation via T cell production of granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *J Clin Invest* 1998;101:595-603.
145. StatSoft, Inc. Statistica [computer program]. Version 6.0. Tulsa (OK, USA): StatSoft; 2001.
146. Maeno N, Takei S, Nomura Y, Imanaka H, Hokonohara M, Miyata K. Highly elevated serum levels of interleukin-18 in systemic juvenile idiopathic arthritis but not in other juvenile idiopathic arthritis subtypes or in Kawasaki disease: comment on the article by Kawashima et al. *Arthritis Rheum* 2002;49:2539-2541.
147. Kawashima M, Yamamura M, Taniuchi M, Yamauchi H, Tanimoto T, Kurimoto M, Miyawaki S, Amano T, Takeuchi T, Makino H. Levels of interleukin-18 and its binding inhibitors in the blood circulation of patients with adult – onset Still's disease. *Arthritis Rheum* 2001;44:550-560.
148. Kawaguchi Y, Terajima H, Harigai M, Hara M, Kamatani N. Interleukin-18 as a novel diagnostic marker and indicator of disease severity in adult – onset Still's disease. *Arthritis Rheum* 2001;44:1716-1717.
149. Okamura H, Nagata K, Komatsu T, Tanimoto T, Nukata Y, Tanabe F, Akita K, Torigoe K, Okura T, Fukuda S. A novel costimulatory factor for gamma interferon induction found in the livers of mice causes endotoxic shock. *Infect Immun* 1995;63:3966-3972.

150. Takada H, Ohga S, Mizuno Y, Suminoe A, Matsuzaki A, Ihara K, Kinukawa N, Ohshima K, Kohno K, Kurimoto M, Hara T. Oversecretion of IL-18 in haemophagocytic lymphohistiocytosis: a novel marker of disease activity. *Br J Haematol* 1999;106:182-189.
151. Joosten LA, Radstake TR, Lubberts E, van den Bersselaar LA, van Riel PL, van Lent PL. Association of interleukin-18 expression with enhanced levels of both interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha in knee synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:339-347.
152. Bresnihan B, Roux-Lombard P, Murphy E, Kane D, FitzGerald O, Dayer JM. Serum interleukin 18 and interleukin 18 binding protein in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2002;61:726-729.
153. Lepore L, Pennesi M, Saleta S, Perticarari S, Presani G, Prodan M. Study of IL-2, IL-6, TNF $\alpha$ , INF $\gamma$  and  $\beta$  in the serum and synovial fluid of patients with juvenile chronic arthritis. *Clin Exp Immunol* 1994;12:561-565.
154. De Benedetti F, Martini A. Is systemic juvenile rheumatoid arthritis an interleukin 6 mediated disease? *J Rheumatol* 1998;25:203-207.
155. Maeno N, Takei S, Imanaka H, Yamamoto K, Uriwaki K, Kawano Y, Oda H. Increased interleukin-18 expression in bone marrow of a patient with systemic juvenile arthritis and unrecognized macrophage-activation syndrome. *Arthritis Rheum* 2004;50:1935-1938.
156. Bateman HE, Kirou KA, Paget SA, Crow MK, Yee AM. Remission of juvenile rheumatoid arthritis after infection with parvovirus B19. *J Rheumatol* 1999;26:2482-2484.
157. Saulsbury FT. Remission of juvenile rheumatoid arthritis with varicella infection. *J Rheumatol* 1999;26:1606-1608.

158. Ou LS, See LC, Wu CJ, Kao CC, Lin YL, Huang JL. Association between serum inflammatory cytokines and disease activity in juvenile idiopathic arthritis. *Clin Rheumatol* 2002;21:52-56.
159. Steinbrocker O, Traeger CH, Batterman RC. Therapeutic criteria in rheumatoid arthritis. *JAMA* 1949;140:659-62.
160. Miyata M, Ohira H, Sasajima T, Suzuki S, Ito M, Sato Y, Kasukawa R. Significance of low mRNA levels of interleukin-4 and -10 in mononuclear cells of the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheum* 2000;19:365-370.
161. Gattorno M, Facchetti P, Ghiotto F, Vignola S, Buoncompagni A, Prigione I, Picco P, Pistoia V. Synovial fluid T cell clones from oligoarticular juvenile arthritis patients display a prevalent Th1/Th0 – type pattern of cytokine secretion irrespective of immunophenotypic. *Clin Exp Immunol* 1997;109:4-11.
162. Okamoto Y, Gotoh Y, Shiraishi H, Nishida M. A human dual – color enzyme – linked immunospot assay for simultaneous detection of interleukin 2- and interleukin 4 – secreting cells. *Int Immunopharmacol* 2004;4:149-156.
163. Mangge H, Gallistl S, Schauenstein K. Long – term follow up of cytokines and soluble cytokine receptor in peripheral blood of patients with juvenile rheumatoid arthritis. *J Interferon Cytokine Res* 1999;19:1005-1010.
164. Cao D, Malmstrom V, Becher-Allan C, Hafler D, Klareskog L, Trollmo C. Isolation and functional characterisation of regulatory CD25<sup>bright</sup>CD4<sup>+</sup> T cells from the target organ of patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 2003;33:215-223.

165. de Kleer IM, Wedderburn LR, Taams LS, Patel A, Varsani H, Klein M, de Jager W, Pugayung G, Giannoni F, Rijkers G, Albani S, Kuis W, Prakken B. CD4+CD25bright regulatory T cells actively regulate inflammation in the joints of patients with the remitting form of juvenile idiopathic arthritis. *J Immunol* 2004;172:6435-43.
166. Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 1998;188:287-296.
167. Smeets T, Dolhain R, Miltenburg A, de Kuiper R, Breedveld F, Tak P. Poor expression of T cell-derived cytokines and activation and proliferation marker sin early rheumatoid synovial tissue. *Clin Immunol Immunopathol* 1998;88:84-90.
168. Tanaka Y, Otsuka T, Hotokebuchi T, Miyahara H, Nakashima H, Kuga S, Nemoto Y, Nihiro H, Niho Y. Effect of IL-10 collagen – induced arthritis in mice. *Inflamm Res* 1996;45:283-288.
169. Whalen JD, Lechman EL, Carlos CA, Weiss K, Kovesdi I, Glorioso JC, Robbins PD, Evans CH. Adenoviral transfer of the IL-10 gene periarticular to mouse paws suppresses development of collagen – induced arthritis in both injected and uninjected paws. *J Immunol* 1999;162:3625-3632.
170. Jorgensen C, Apparailly F, Canovas F, Verwaerde C, Auriault C, Jacquet C, Sany Y. Systemic viral interleukin-10 gene delivery prevents cartilage invasion by human rheumatoid synovial tissue engrafted in SCID mice. *Arthritis Rheum* 1999;42:678-685.
171. Zak M, Pedersen FK. Juvenile chronic arthritis into adulthood: a long-term follow-up study. *Rheumatology* 2000;39:198-200.

172. Flato B, Aasland A, Vinje O, Forre O. Outcome and predictive factors in juvenile rheumatoid arthritis and juvenile spondyloarthritis. *J Rheumatol* 1998;25:366-375.
173. Lomater C, Gerloni V, Gattinara M, Mazzotti GM, Cimaz R, Fantini R. Systemic onset juvenile idiopathic arthritis: a retrospective study of 80 consecutive patients followed for 10 years. *J Rheumatol* 2000;27:491-496.
174. French AR, Mason T, Nelson AM, O'Fallon WM, Gabriel SE. Increased mortality in adults with a history of juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2001;44:523-527.
175. Laiho K, Hannula S, Savolainen A, Kautiainen H, Kauppi M. Cervical spine in patients with juvenile chronic arthritis and myeloidosis. *Clin Exp Rheumatol* 2001;19:345-348.
176. Hensinger RN, DeVito PD, Ragsdale CG. Changes in the cervical spine in juvenile rheumatoid arthritis. *J Bone Joint Surg Am.* 1986;68:189-198.
177. Svartz N. Salazopyrin, a new sulfanilamide preparation. *Acta Med Scand* 1942;50:577-598.
178. Wilkinson N, Jackson G, Gardner-Medwin J. Biologic therapies for juvenile arthritis. *Arch Dis Child* 2003;88:186-191.
179. Cannella A, O'Dell J. Cytotoxic immunoregulatory and biologic agents. U: West S. *Rheumatology Secrets 2*. izdanje. Hanley & Belfus, INC Philadelphia 2002, str 588-597.
180. Lovell DJ, Giannini EH, Reiff A, Cawkwell GD, Silverman ED, Nocton JJ, Stein LD, Gedalia A, Ilowite NT, Wallace CA, Whitmore J, Finck BK. Etanercept in children with polyarticular juvenile rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2000;342:763-769.
181. Garrison L, McDonnell ND: Etanercept: therapeutic use in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1999;58:165-169.



182. Maini RN, Breedveld FC, Kalden JR, Smolen JS, Davis D, Macfarlane JD, Antoni C, Leeb B, Elliott MJ, Woody JN, Schaible TF, Feldmann M. Therapeutic efficacy of multiple intravenous infusions of anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody combined with low-dose weekly methotrexate in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1998;41:1552-1563.
183. Kavanaugh AF. Anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody therapy for rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 1998;24:593-614.
184. Bresnihan B, Alvaro-Gracia JM, Cobby M, M, Doherty M, Domljan Z, Emery P, Nuki G, Pavelka K, Rau R, Rozman B, Watt I, Williams B, Aitchison R, McCabe D, Musikic P. Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Rheum* 1998;41:2196-2204.
185. van Roon JA, Lafeber ME, Bijlsma JW. Synergistic activity of interleukin-4 and interleukin-10 in suppression of inflammation and joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2001;44:3-12.
186. Keul R, Heinrich PC, Muller-newen G, Muller K, Woo P. A possible role for soluble IL-6 receptor in the pathogenesis of systemic onset juvenile chronic arthritis. *Cytokine* 1998;10:729-734.
187. Martini A, Ravelli A, Notarangelo LD, Maccario R, Lanfranchi A, Rondena D, Ugazio AG, Burgio. Enhanced interleukin 1 and depresses interleukin 2 production in juvenile arthritis. *J Rheumatol* 1986;13:598-603.
188. De Benedetti , Massa M, Pignatti P, Albani S, Novick D, Martini A. Serum soluble interleukin 6 (IL-6) receptor and IL-6/soluble IL-6 receptor complex in systemic juvenile rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1994;93:2114-2119.

189. Mangge H, Kenzian H, Gallistl S, Neuwirth G, Liebmann P, Kaulfersch W, Beaufort F, Muntean W, Schauenstein K. Serum cytokines in juvenile rheumatoid arthritis: correlation with conventional inflammation parameters and clinical subtypes. *Arthritis Rheum* 1995;38:211-220.
190. Kelley M, Faltynek CR, Martini A. Elevated circulating interleukin-7 levels in patients with systemic juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1995;22:1581-1585.
191. Braddock M, Quinn A, Canvin J. Therapeutic potential of targeting IL-1 and IL-18 in inflammation. *Expert Opin Biol Ther* 2004;4:847-860.
192. Belghith M, Bluestone JA, Barriot S, Merget J, Bach JF, Chatenoud L. TGF-beta-dependent mechanisms mediate restoration on self-tolerance induced by antibodies to CD3 in overt autoimmune diabetes. *Nat Med* 2003;9:1202-1208.
193. Lin CH, Hunig T. Efficient expansion of regulatory T cells *in vitro* and *in vivo* with a CD28 superagonist. *Eur J Immunol* 2003;33:626-638.

## 9. SAŽETAK

---

### **Analiza proupalnog (IL-18) i protuupalnog (IL-10) citokina i regulacijskih limfocita T ( $T_R$ ) u bolesnika s juvenilnim idiopatskim artritisom (JIA)**

*Uvod:* Juvenilni idiopatski artritis (JIA) višesustavna je autoimunosna bolest. Unatoč mnogim istraživanjima ključnih medijatora u JIA, imunopatogeneza još je nepoznata. Cilj rada bio je istražiti ulogu regulacijskih limfocita T ( $T_R$ ), kao i IL-18 i IL-10, predstavnika proupalnih i protuupalnih citokina.

*Ispitanici i metode:* U istraživanje je bilo uključeno 50-ero djece s dijagnozom JIA (prosječne dobi 5,5 godina (1-18); 31 djevojčica i 19 dječaka; 25-ero s oligoartikularnim tipom, 15-ero s poliartrikularnim tipom i desetero sa sistemskim tipom JIA) i 23-oje djece kontrolne skupine (prosječne dobi 7 godina (2–6)). U svih bolesnika uzeta je venska krv u aktivnoj fazi i u remisiji bolesti. U 16 bolesnika s oligoartikularnim tipom uzeta je i sinovijalna tekućina. Broj  $T_R$  (definiranih kao  $CD4^+CD25^{++}$  i  $CD4^+CD25^{++}CCR4^+$ ) analiziran je protočnom citometrijom. Koncentracije citokina IL-18 i IL-10 u uzorcima seruma, sinovijalne tekućine i nadtaloga kultura stimuliranih (s forbol-miristat-acetatom) i nestimuliranih limfocita izmjerene su pomoću komercijalnih ELISA kitova.

*Rezultati:* Serumske razine IL-18 u bolesnika sa sistemskim tipom JIA bile su značajno povišene u odnosu prema drugim tipovima JIA, u aktivnoj fazi i u remisiji bolesti ( $P < 0,001$ ), dok nije nađena značajna razlika između bolesnika s oligoartikularnim i poliartrikularnim tipom JIA i kontrolne skupine. Iako se razina IL-18 u bolesnika sa sistemskim tipom JIA značajno smanjila u remisiji bolesti ( $P = 0,004$ ), i dalje je ostala nekoliko puta viša u usporedbi s drugim tipovima JIA ( $P <$

0,001). Serumske razine IL-10 u bolesnika s JIA bile su više nego u kontrolnoj skupini, međutim razlika je bila statistički značajna samo u remisiji bolesti ( $P = 0,004$ ), dok su razine IL-10 u nadtalogu kultura stimuliranih i nestimuliranih limfocita bolesnika bile značajno više i u aktivnoj fazi i u remisiji bolesti u odnosu prema kontrolnoj skupini ( $P < 0,001$ ). U sinovijalnoj tekućini razina IL-10 značajno je viša od one u serumu ( $P = 0,001$ ). Broj i udio  $CD4^+CD25^{++}$  limfocita u bolesnika s JIA povećavao se s aktivnošću bolesti (od 0,16% do 0,30% ukupnih limfocita), dostižući nalaz kontrolne skupine (0,39%). Nije nađen dosljedan uzorak broja i udjela  $CD4^+CD25^{++}$  i  $CD4^+CD25^{++}CCR4^+$  limfocita s obzirom na tip ili fazu bolesti.

*Zaključak:* Navedeni rezultati govore u prilog važnoj ulozi IL-18 u patogenezi sistemskog tipa JIA. Razina IL-18 povezana je s laboratorijskim nalazima sustavne upale, a ostaje povišenom i za vrijeme remisije bolesti, što upućuje na to da se IL-18 proizvodi sustavno, dok su limfociti u upalom zahvaćenom zglobu glavni izvor IL-10. Nalaz visokih razina proupalnih medijatora (IL-18) zajedno s niskim razinama protuupalnih medijatora (IL-10 i  $T_R$ ) u remisiji bolesti upućuje na to da za vrijeme «klinički mirne» faze postoji aktivnost imunološkog sustava, te da remisija ne smije biti zanemarena kao što je to danas. Stoga, nove smjernice u liječenju JIA i srodnih bolesti trebaju biti usmjerene ne samo na supresiju upale u aktivnoj fazi, nego i na kontrolu imunosnog sustava u remisiji bolesti.

## 10. SUMMARY

---

### **Analysis of pro-inflammatory (IL-18) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines and regulatory T (T<sub>R</sub>) cells in patients with juvenile idiopathic arthritis (JIA)**

*Introduction:* Juvenile idiopathic arthritis (JIA) is multisystemic autoimmune inflammatory disease. Although various factors have been proposed as the key mediators, immunopathogenesis of JIA is still not clear. The aim of my study was to elucidate the role of regulatory T cells (T<sub>R</sub>) as well as interleukin (IL)-18 and IL-10, as representatives of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines, respectively.

*Patients and Methods:* Fifty children with JIA (mean age 5.5 years (range: 1 – 18); 31 girls, 19 boys; 25 with oligoarticular JIA, 15 with polyarticular JIA and 10 with systemic JIA) and 23 healthy children (mean age 7 years (range: 2 – 16)) were enrolled. Blood samples from patients were obtained in active and inactive phase of disease. Synovial fluid samples were collected from 16 patients with oligoarticular JIA. The levels of T<sub>R</sub> (defined as CD4<sup>+</sup>CD25<sup>++</sup> or CD4<sup>+</sup>CD25<sup>++</sup>CCR4<sup>+</sup>) were analysed by flow cytometry. Concentrations of IL-18 and IL-10 were determined in blood serum, synovial fluid, and supernatants of phorbol-myristate-acetate -stimulated and unstimulated peripheral blood mononuclear cells (PBMC) using commercial ELISA kits.

*Results:* Serum levels of IL-18 in systemic JIA were significantly higher than in other forms of disease, both in active and inactive phase ( $P < 0.001$ ), while the IL-18 levels in children with oligoarticular and polyarticular JIA were comparable to the healthy controls. Although the concentrations of IL-18 in systemic JIA decreased significantly during remission ( $P = 0.004$ ), they remained several-fold higher than in the other groups ( $P < 0.001$ ). JIA patients had higher

concentrations of IL-10 in serum than healthy children, but the difference was significant only during the remission ( $P = 0.004$ ). On the other hand, PBMC of JIA patients produced more IL-10 in both active and inactive phase of disease ( $P < 0.001$ ). In addition, more IL-10 was detected in synovial fluid than in blood serum ( $P = 0.001$ ). The proportion and number of  $CD4^+CD25^{++}$  lymphocytes in children with JIA increased with activity of the disease (from 0.16% to 0.30% of total lymphocytes), approaching the levels found in healthy children (0.39%). No consistent pattern of  $CD4^+CD25^{++}$  and  $CD4^+CD25^{++}CCR4^+$  lymphocyte counts was found regarding the subtype of JIA or phase of disease.

*Conclusion:* These results underline the importance of IL-18 in the pathogenesis of systemic JIA. The levels of IL-18 correlated rather well with the other indicators of systemic inflammation and were relatively high even during clinical remission. It seems that the IL-18 was produced systemically while the inflamed joints were the main site of production of IL-10. High concentrations of pro-inflammatory factors (IL-18) together with lower levels of anti-inflammatory mediators (IL-10 and  $T_R$ ) in inactive phase of disease, indicates that even in clinical remission there is activity of the immune system and that this “silent” phase should not be neglected, as it is usually. These findings imply that new strategies of clinical management of JIA and related disorders should be focused not only on suppression of overt inflammation in active phase, but on control of immune process in remission as well.

## 11. ŽIVOTOPIS

---

- Rođena 08. srpnja 1974. god. u Zagrebu
- 1990: Završila Srednju baletnu školu, Zagreb
- 1992: Završila V gimnaziju (Prirodoslovno-matematičku)

### **Edukacija**

- Ožujak, 2002 -: Specijalističko usavršavanje iz pedijatrije za Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
- Travanj, 2002: Obranjena magistarska teza «Molekularno-genetička analiza gena za teški lanac  $\beta$ -miozina (*MYH 7*) u oboljelih od hipertrofične kardiomiopatije»
- 1998-2001: Doktorski studij «Biomedicina i zdravstvo» na Medicinskom fakultetu, Zagreb
- 1996 i 1997: Studentska praksa na Pedijatrijskom odjelu Sveučilišne Klinike u Antwerpenu
- 1995: Studentska praksa na Internom i Kirurškom odjelu Sveučilišne Klinike u Hamburgu
- 1995: Dobila kao izvrstan student stipendiju grada Zagreba
- 1992-1998: Studij medicine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, diplomirala 23.06.1998 god., prosječna ocjena 4,92

### **Zaposlenost**

- Rujan 2002.- Izbor u istraživačko zvanje asistenta u Katedri za pedijatriju, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, KBC Zagreb, na projektu «Etiopatogeneza srčanih bolesti u djece», voditelja Prof. dr. sc. Ivana Malčića
- 1999-2002: znanstveni novak na projektu «Imunogenetika srčanih i neuromišićnih bolesti u djece», Prof. dr. sc. Ivana Malčića, Klinika za pedijatriju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, KBC Zagreb
- 1998-1999: stažist DZ «Peščenica»

### **Publikacije, kongresi**

- Objavila sam nekoliko znanstvenih radova u časopisima s međunarodno priznatom recenzijom, sudjelovala na mnogobrojnim međunarodnim i domaćim kongresima, te u pisanju četiri knjige (dvije iz područja dječje kardiologije i reumatologije).

### **Nastava**

- Redovita dodiplomska nastava iz pedijatrije, tutor u kolegiju «Hitna medicina»

- Doktorski studij: kolegij "Pedijatrijska kardiologija" i kolegij "Osobitosti kliničkih medicinskih istraživanja"

***Strani jezici***

- Aktivno znanje engleskog i njemačkog jezika, pasivno znanje ruskog jezika