

# Populacijsko istraživanje sustava HLA kod oboljelih od reumatoidnog artritisa s područja Sinjske krajine

---

**Marinović, Ivanka**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2016**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:979423>

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

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



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**Ivanka Marinović**

**POPULACIJSKO ISTRAŽIVANJE SUSTAVA HLA KOD OBOLJELIH OD  
REUMATOIDNOG ARTRITISA S PODRUČJA SINJSKE KRAJINE**

**Doktorska disertacija**

**Split, 2016.**

Disertacija je izrađena na Kliničkom odjelu za reumatologiju i kliničku imunologiju Klinike za unutarnje bolesti i Zavodu za fizikalnu medicinu i rehabilitaciju s reumatologijom Kliničkog bolničkog centra Split.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Dušanka Martinović Kaliterna, dr. med.

Zahvaljujem dragoj mentorici prof. dr. sc. Dušanki Martinović Kaliterna na ukazanom povjerenju, velikoj stručnoj pomoći i moralnoj podršci tijekom provođenja istraživanja i pisanja disertacije.

Veliko hvala mojoj obitelji na bezuvjetnoj potpori.

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Definicija reumatoidnog artritisa .....	1
1.2. Povijesni pregled .....	1
1.3. Epidemiologija reumatoidnog artritisa.....	2
1.4. Etiologija reumatoidnog artritisa.....	4
1.4.1. Genetski čimbenici povezani s reumatoidnim artritisom .....	4
1.4.1.1. HLA sustav .....	4
1.4.1.2. Geni izvan sustava HLA .....	11
1.4.2. Okolišni čimbenici povezani s reumatoidnim artritisom.....	13
1.4.2.1. Pušenje .....	13
1.4.2.2. Infektivni uzročnici .....	14
1.4.2.3. Prehrana .....	15
1.4.2.4. Socioekonomski status.....	15
1.4.2.5. Izloženost prašini .....	16
1.4.2.6. Spol .....	16
1.5. Patogeneza reumatoidnog artritisa .....	17
1.6. Klinička slika reumatoidnog artritisa .....	20
1.6.1. Zglobna obilježja .....	20
1.6.2. Vanzglobna obilježja .....	21
1.7. Dijagnostika reumatoidnog artritisa .....	23
1.7.1. Laboratorijske pretrage.....	23
1.7.2. Radiološke metode .....	26
1.8. Liječenje reumatoidnog artritisa.....	28
2. CILJEVI I HIPOTEZE .....	32
2.1. Ciljevi istraživanja.....	32
2.2. Hipoteze .....	33
3. ISPITANICI I METODE .....	34
3.1. Ispitanici .....	34
3.1.1. Opis istraživane populacije.....	35
3.2. Metode.....	36
3.2.1. Upitnik .....	36
3.2.2. Procjena aktivnosti bolesti.....	36
3.2.3. Procjena funkcionalnog statusa .....	37

3.2.4. Radiološka dijagnostika.....	37
3.2.5. Laboratorijski testovi.....	37
3.2.6. Izolacija DNA.....	38
3.2.7. Metode određivanja alela HLA-DRB1 gena .....	38
3.2.8. Statistička analiza .....	40
4. REZULTATI.....	41
4.1. Opis istraživnog uzorka.....	41
4.2. Prevalencija reumatoidnog artritisa u Splitsko-dalmatinskoj županiji.....	41
4.3. Raspodjela alela HLA-DRB1 gena u ispitanika.....	43
4.4. Klinička obilježja pacijenata s reumatoidnim artritisom.....	47
4.5. Povezanost alela HLA-DRB1 gena i težine bolesti .....	49
4.6. Pušenje, anti-CCP i SE status.....	58
4.7. Raspodjela podtipova HLA-DRB1*04 alela.....	59
4.8. Povezanost alela HLA-DRB1*04:01 i *04:04 i težine bolesti.....	60
5. RASPRAVA .....	75
5.1. Prevalencija reumatoidnog artritisa u Splitsko-dalmatinskoj županiji.....	75
5.2. Raspodjela alela HLA-DRB1 gena u ispitivanoj populaciji .....	76
5.3. Povezanost alela HLA-DRB1 gena i težine bolesti .....	78
5.4. Ograničenja i prednosti istraživanja.....	81
6. ZAKLJUČAK.....	83
7. SAŽETAK .....	84
8. SUMMARY .....	85
9. POPIS LITERATURE .....	87
10. PRILOZI.....	103
11. ŽIVOTOPIS.....	113

## POPIS KRATICA

A	aminokiselina alanin
ACR	Američko reumatološko društvo ( <i>engl. American College of Rheumatology</i> )
ANA	antinuklearna antitijela
anti-CarP	protutijela na karbamilirane proteine ( <i>engl. Anti-Carbamylated Protein Antibodies</i> )
anti-CCP	protutijela na cikličke citrulinirane peptide ( <i>engl. Anti-Cyclic Citrullinated Peptide</i> )
anti-MCV	protutijela na mutirani citrulinirani vimentin
antiSS	autoantigen za Sjögrenov sindrom ( <i>engl. Anti-Sjögren's-syndrome-related antigen</i> )
APC	antigen predočna stanica ( <i>engl. Antigen Presenting Cell</i> )
CDAI	klinički indeks aktivnosti bolesti ( <i>engl. Clinical Disease Activity Index</i> )
COX	ciklooksigenaze ( <i>engl. Cyclooxygenase</i> )
CRP	C - reaktivni protein
CTLA-4	antigen prezentirajućih stanica ( <i>engl. Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen 4</i> )
D	asparaginska kiselina
DAS	indeks aktivnosti bolesti ( <i>engl. Disease Activity Score</i> )
Dkk-1	inhibitor Wingless signalnog puta ( <i>engl. Dickkopf-1</i> )
DMARD	lijekovi koji mijenjaju tijek bolesti ( <i>engl. Disease modifying anti-rheumatic drugs</i> )
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
E	glutaminska kiselina
EULAR	Europska liga za borbu protiv reumatizma ( <i>engl. European League Against Rheumatism</i> )
GM-CSF	čimbenik stimulacije kolonije granulocita i makrofaga ( <i>engl. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> )
HAQ	upitnik funkcionalnog statusa ( <i>engl. Health Assessment Questionnaire</i> )
HDL	lipoprotein visoke gustoće ( <i>engl. High-density Lipoprotein</i> )
HLA	sustav humanog leukocitnog antigena ( <i>engl. Human Leukocyte Antigens</i> )
HPA	hipotalamo-hipofizno-adrenalna osovina ( <i>engl. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis</i> )
IFN	Interferoni
Ig	Imunoglobulini
IL	Interleukini
IP	interfalangealni zglobovi
K	aminokiselina lizin
LDL	lipoprotein niske gustoće ( <i>engl. Low-density Lipoprotein</i> )
MCP	metakarpofalangealni zglobovi

MHC	glavni sustav tkivne podudarnosti ( <i>engl. Major Histocompatibility Complex</i> )
MTP	metatarzofalangealni zglobovi
ND	nije definirano
NIMA	nenasljedna materinja antigenost ( <i>engl. Non-inherited Maternal Antigen</i> )
NSAID	nesteroidni protuupalni lijekovi ( <i>engl. Non-steroidal anti-inflammatory drugs</i> )
PAD	enzim peptidilarginin deiminaze ( <i>engl. Peptidyl-Arginine Deiminase</i> )
PADI4	gen koji kodira enzim peptidil-arginin deaminazu 4 ( <i>engl. Peptidyl-Arginine Deiminase Type 4</i> )
PCR	polimerazna lančana reakcija ( <i>engl. Polymerase Chain Reaction</i> )
PCR-SSO	lančana reakcija polimerazom primjenom specifičnih oligonukleotidnih proba ( <i>engl. Polymerase Chain Reaction Sequence Specific Oligonucleotide Probe</i> )
PCR-SSP	lančana reakcija polimerazom primjenom specifičnih početnica za određenu sekvencu DNA ( <i>engl. Polymerase Chain Reaction Sequence Specific Primers</i> )
PIP	proksimalni interfalangealni zglobovi
PTPN22	gen koji kodira unutarstaničnu tirozin kinazu ( <i>engl. Protein Tyrosine Phosphatase Nonreceptor Type 22</i> )
Q	aminokiselina glutamin
R	aminokiselina arginin
RA	reumatoidni artritis
RANKL	ligand receptora za pobudu jezgrinog čimbenika $\kappa$ B ( <i>engl. Receptor Activator of Nuclear Factor-<math>\kappa</math>B Ligand</i> )
RF	reumatoidni faktor ( <i>engl. Rheumatoid Factor</i> )
SD	standardna devijacija
SDAI	pojednostavljeni indeks aktivnosti bolesti ( <i>engl. Simplified Disease Activity Index</i> )
SDŽ	Splitsko-dalmatinska županija
SE	aleli zajedničkog epitopa ( <i>engl. Shared Epitope</i> )
SERT	serotonin transporter
STAT-4	gen za transkripcijski čimbenik ( <i>engl. Signal Transducer and Activator of Transcription 4</i> )
SK	Sinjska krajina
TNF	čimbenik tumorske nekroze ( <i>engl. Tumor Necrosis Factor</i> )
TRAF1	gen koji kodira čimbenik 1 povezan s receptorima TNF-a ( <i>engl. TNF receptor associated factor 1</i> )
T2T	liječenje prema unaprijed određenom cilju ( <i>engl. Treating to Target</i> )
VAS	vizualna analogna ljestvica ( <i>engl. Visual Analogue Scale</i> )





## **1. UVOD**

### **1.1. Definicija reumatoidnog artritisa**

Reumatoidni artritis (RA) je kronična upalna bolest nepoznatog uzroka koja zahvaća više organskih sustava. Glavno obilježje bolesti je trajni sinovitis koji uzrokuje progresivno razaranje hrskavice i zglobova te stvaranje koštanih erozija. Posljedično, dolazi do razvoja zglobnih deformacija, smanjene funkcionalne sposobnosti, narušene kvalitete života i povećane smrtnosti (1). Klinički tijek bolesti je promjenjiv, od blage i samoograničene bolesti pa sve do teškog, brzo napredujućeg, erozivnog artritisa s vanzglobnim obilježjima (2).

Etiologija RA nije poznata, međutim, smatra se da genetski i okolišni čimbenici imaju važan utjecaj na početak bolesti, klinički tijek i pacijentov odgovor na terapiju (1).

### **1.2. Povijesni pregled**

Često se navodi da se RA prvi puta spominje u papirusu Ebers (oko 1550 pr. n. e), svitku koji se smatra kompendijem staroegipatske medicine i farmacije te da su opći simptomi RA opisani i u drevnom indijskom medicinskom tekstu Charak Samhita (oko 300-200 pr. n. e). Točnije bi ipak bilo zaključiti da se u starom vijeku i antici po prvi put bilježe podatci o reumatskim oboljenjima, a da se na potvrdu samog RA trebalo čekati znatno duže. Tako u antičko doba Hipokrat daje prvi općeniti prikaz bolesti koji ne uključuje podjelu na različite vrste (oko 400. pr. n. e), a u doba starog Rima Galen iz Pergama uvodi opći termin reumatizam (između 216. i 129. pr. n. e) (3).

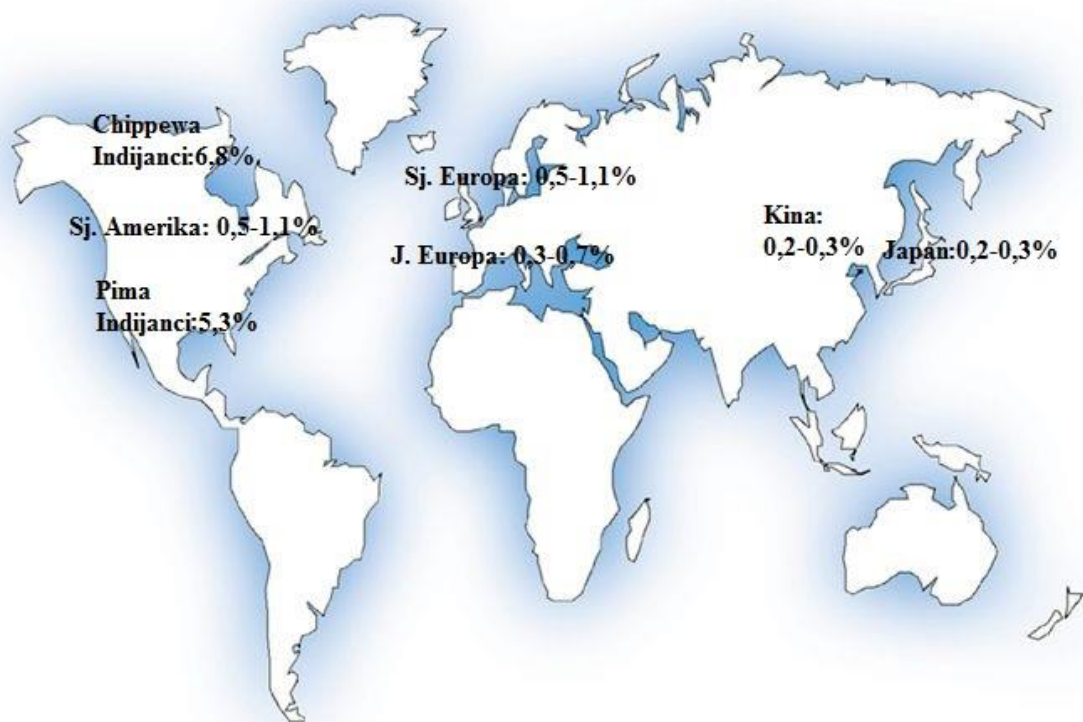
Međutim, prema Scher i Abramsonu RA je postojao u Sjevernoj i Južnoj Americi, a na stari se kontinent proširio tek poslije otkrića Amerike 1492. godine, kroz ekspedicije koje su Europljani poduzimali u novom svijetu (4). Današnja geografska raširenost RA može se objasniti okolišnim čimbenicima (npr. patogenima ili elementima u prehrani koji su utjecali na promjenu mikrobioma), miješanjem Europljana s tamošnjim domorocima ili spojem okolišnih i genetskih čimbenika. Dokazi za ovu teoriju nalaze se u činjenici da su bolesti poput spondiloartropatija, gihta i osteoartritisa detaljno opisane u povijesnim zapisima i paleopatološkim studijama, a RA se po prvi put nedvojbeno definira tek u 19. stoljeću. Neznatni dokazi dostupni su iz tek nešto ranijeg razdoblja, poput Rubensovih slika iz 17. stoljeća na kojima se prikazuje izgled zglobova zahvaćenih reumatoidnim artritismom. S druge strane, paleopatološke studije provedene na ostacima iz novog svijeta potvrđuju postojanje

RA još u razdoblju između 6000. i 3000. godine pr. n. e. na kosturima iz sjeverozapadne Alabame. Prvi medicinski zapis o RA datira iz 1800. kada Landré-Beauvais objavljuje rad „La goutte asthénique primitive”. U devetnaestom stoljeću o progresivnom tijeku kroničnog artritisa pišu Sydenham, Beauvais i Brodie. Potonji opisuje kako bolest utječe na ovojnice tetiva i zglobnu sinovijalnu membranu te ustanovljuje da dovodi do sinovitisa i oštećenja hrskavice. Do 1858. najčešće korišteni nazivi za bolest bili su arthritis deformans i reumatski giht, a 1858. godine Garrod uvodi termin RA, razdvajajući ovu bolest od osteoartritisa i gihta. Usporedo s otkrićima o prirodi bolesti razvija se i reumatologija kao posebna grana medicine koja potpuno priznanje doživljava 1930-ih i 1940-ih, ponajprije u SAD-u, a potom i u ostatku svijeta (4).

### **1.3. Epidemiologija reumatoidnog artritisa**

RA je najčešća upalna reumatska bolest, s prevalencijom 0,5-1,0% u odrasloj populaciji diljem svijeta (Slika 1). Poznato je da se prevalencija i incidencija RA razlikuju u različitim etničkim skupinama pa čak i unutar iste zemlje (5). Moguće je da je za razlike u prevalenciji i incidenciji RA primjećene između različitih populacija odgovorno mnoštvo različitih čimbenika, kao što su ponašajni čimbenici, izloženost različitim čimbenicima okoliša, klimatske razlike i genetski utjecaji (6).

Poznato je da je RA učestaliji u sjevernijim zemljama (Sjeverna Amerika i sjeverna Europa) nego u južnijim zemljama, kao što su južna Europa, Afrika i zemlje trećeg svijeta (5,7). Najniža prevalencija RA zabilježena je u ruralnim područjima Afrike. Osim toga, jako niska prevalencija RA pronađena je u proučavanim populacijama Kine i Japana (0,2-0,3%). Najviša prevalencija bolesti primjećena je u Pima Indijanaca (5,3%) i 6,8% u Chippewa Indijanaca (8). Istraživanja provedena na populacijama bijele rase otkrila su incidenciju RA u Sjevernoj Americi i sjevernoj Europi od 20 do 50 slučajeva na 100 000 stanovnika i prevalenciju 0,5-1,1% (7). Niža incidencija i prevalencija zabilježena je na području južne Europe (incidencija 9-24 na 100 000 stanovnika, prevalencija 0,3-0,7%) te u zemljama u razvoju (9). Tako je prevalencija u Francuskoj 0,6%, u Italiji 0,33%, u Španjolskoj 0,5% i u Grčkoj 0,3-0,7% (9-13).



**Slika 1.** Prevalencija reumatoidnog artritisa u svijetu

Osim niže prevalencije, pacijenti iz zemalja južne Europe, a posebno iz mediteranskih zemalja imaju blaži oblik bolesti s manje vanzglobnih obilježja i sporijim radiološkim napredovanjem bolesti što se očituje i nižom stopom pobola i smrtnosti.

Za područje Republike Hrvatske ne postoje službeni podatci o incidenciji i prevalenciji RA.

Bolest se tri puta češće javlja u žena nego u muškaraca (8). Nadalje, iako se može pojaviti u osoba bilo koje životne dobi, najčešće se javlja u dobi od 40 do 60 godina (7,8). Velike epidemiološke studije pokazale su da oboljeli od RA imaju povećanu smrtnost te prosječno skraćenje života za 3 do 10 godina (7,8,14).

Bolesnici s RA imaju povišen rizik za razvoj komorbiditeta i sam ishod tih komorbiditeta lošiji je nego u bolesnika koji ne boluju od RA. Kardiovaskularni komorbiditet vodeći je uzrok povećane smrtnosti u bolesnika s RA (15-18). Povećanoj smrtnosti pridonose i infekcije, malignomi, plućna bolest i bolesti bubrega (17,19).

## **1.4. Etiologija reumatoidnog artritisa**

Etiologija RA još uvijek nije poznata. Niti jedan do sada opisani model nastanka RA ne objašnjava u potpunosti etiologiju bolesti. Ipak, smatra se da bolest nastaje zbog promijenjenog imunološkog odgovora u genetski predodređenih osoba uz sudjelovanje nekih još nedovoljno poznatih okolišnih čimbenika.

Genetski i okolišni čimbenici mogu povećati osjetljivost domaćina za nastajanje reumatoidnog artritisa mijenjanjem opće reaktivnosti imunološkog sustava, mijenjanjem antigen specifičnog odgovora posredstvom HLA i „non-HLA“ molekula te mijenjanjem sposobnosti ciljnih tkiva u moduliranju imunološkog odgovora koja se očituje u smanjenu sinteze imunosupresijskih citokina, smanjenju apoptoze autoreaktivnih stanica i smanjenju odstranjivanja imunokompleksa. Iako još uvijek nisu poznati svi etiološki čimbenici važni u nastanku RA, smatra se da je za razumijevanje mehanizama koji dovode do razvoja i napredovanja bolesti nužno razumjeti složenu interakciju između genetike i okoliša i njihovu ulogu u patogenezi.

### **1.4.1. Genetski čimbenici povezani s reumatoidnim artritismom**

Brojne obiteljske studije i studije blizanaca ukazale su na genetsku predodređenost za RA te je potvrđen povećan relativni rizik u najuže rodbine oboljelih (20). Studije blizanaca ukazuju na povećanu učestalost bolesti kod jednojajčanih blizanaca (stopa konkordancije 15-30% u jednojajčanih, a 5% u dvojajčanih blizanaca) (20,21). Kao i kod drugih autoimunih bolesti, višestruki nepovoljni aleli pridonose osjetljivosti na RA i težini kliničke slike.

Geni koji su uključeni u razvoj RA dijele se na gene koji kodiraju antigene tkivne podudarnosti (sustav humanog leukocitnog antigena, engl. *Human Leukocyte Antigens*; HLA) i gene koji kodiraju tzv. „non-HLA“ antigene (22).

#### **1.4.1.1. HLA sustav**

Sustav humanog leukocitnog antigena najvažniji je i najduže proučavani genetski čimbenik rizika za nastanak RA, koji predstavlja otprilike 30 do 50% genetske predodređenosti za razvoj bolesti. Povezanost HLA-DR antigena, HLA razreda II s RA uočena je i opisana sedamdesetih godina prošlog stoljeća (20,22). Sustav HLA ili glavni sustav tkivne podudarnosti (engl. *Major Histocompatibility Complex*; MHC) smješten je na odsječku

6p21,3, kraćeg kraka kromosoma 6 i sadrži četiri milijuna parova baza. Geni sustava HLA izrazito su polimorfni, nasljeđuju se kodominantno i dijele se u tri razreda. Geni razreda I smješteni su u području telomera i odgovorni su za sintezu klasičnih transplantacijskih antigena HLA-A, HLA-B i HLA-C. Regija gena razreda II nalazi se u području centromera i sadržava gene odgovorne za sintezu antigena HLA-DR, HLA-DQ i HLA-DP (23,24). Geni razreda III, smješteni između ove dvije skupine gena, odgovorni su za sintezu komponenti komplementa, čimbenika B, čimbenika tumorske nekroze i steroid 21-hidroksilaze.

Molekule HLA razreda I i II imaju ključnu ulogu u stvaranju tolerancije na vlastite antigene. Na taj način, putem HLA molekula T limfociti u timusu sazrijevaju u stanice koje razlikuju vlastite antigene od stranih antigena (23). Antigeni HLA razreda I predočuju unutarstanične antigene CD8<sup>+</sup> citotoksičnim T limfocitima, a antigeni HLA-razreda II predočuju vanstanične antigene CD4<sup>+</sup> pomoćničkim T limfocitima (24).

Molekule HLA razreda II su transmembranski heterodimerni glikoproteini koji se sastoje od  $\alpha$  lanca i  $\beta$  lanca. Svaki lanac ima mjesto za vezanje peptida kojeg grade  $\alpha 1$  i  $\beta 1$  domena, zatim domenu sličnu imunoglobulinu koju čine nepromjenjive  $\alpha 2$  i  $\beta 2$  domene i transmembransku regiju s citoplazmatskim repom. Alfa lanac (proteinski produkt HLA-DRA gena) je nepromjenljiv, nepolimorfni polipeptid koji određuje mjesto za koje će se vezati peptid za antigen molekule HLA razreda II. Beta lanac (proteinski produkt HLA-DRB1 gena) pokazuje izraziti polimorfizam, osobito na mjestu i oko mjesta za vezanje peptida. Predočavanje stranog antigena počinje razgradnjom antigena na male peptide u fagolizosomu. Istovremeno u endoplazmatskoj mrežici počinje sinteza HLA molekule. Sintetizirana molekula transportira se u fagolizosom i veže antigeni peptid te nakon njegova vezanja putuje prema staničnoj membrani antigen predočne stanice i predočuje ga CD4<sup>+</sup> T limfocitima (24). Vezanjem T staničnog receptora sa kompleksom peptid-molekula MHC razreda II i aktiviranjem kostimulacijskih molekula aktiviraju se CD4<sup>+</sup> T limfociti i pokreće se imunosna reakcija.

### **HLA i hipoteza zajedničkog epitopa**

Brojne genetičke studije ukazale su na značajnu povezanost RA s alelima HLA-DRB1 gena. Godine 1969. izveden je prvi eksperiment koji je ukazao na genetsku sličnost između pacijenata oboljelih od RA. U miješanoj kulturi limfocita, limfociti iz periferne krvi pacijenata oboljelih od RA nisu bili reaktivni s limfocitima iz periferne krvi drugih oboljelih

pacijenata. Zatim je 1976. godine otkriveno da je nereaktivnost nastala uslijed prisutnosti istih HLA gena u oboljelih. Povezanost HLA sustava s RA opisana je 1978. godine kada je uočen veći broj oboljelih s HLA-Dw4 serotipom u odnosu na kontrolnu zdravu populaciju (22,25). Gregersen i sur. su 1987. godine dokazali povezanost RA s drugim alelima HLA-DRB1 gena (26). Svi HLA-DRB1 aleli povezani s reumatoidnim artritisom u trećoj hipervarijabilnoj regiji beta1 lanca, na pozicijama 70-74, dijele zajedničku sekvencu aminokiselina, što je dovelo do stvaranje hipoteze o zajedničkom epitopu (engl. *Shared epitope*; SE). Otkrićem modela kristalografske strukture molekule HLA-DR1 dodatno je potvrđeno da su upravo ovi epitopi glavni strukturni dio pukotine za vezanje peptida u heterodimeru HLA-DR ( $\alpha 1, \beta 1$ ) te da oblikuju tzv. „reumatoidni džep” (27,28).

Zajednički epitop sastoji se od tri sekvence aminokiselina: QKRAA, QRRAA i RRRRAA (Tablica 1). Aleli zajedničkog epitopa su: HLA-DRB1\*04:01 (QKRAA), HLA-DRB1\*04:04, HLA-DRB1\*04:05, HLA-DRB1\*04:08, HLA-DRB1\*01:01, HLA-DRB1\*01:02, HLA-DRB1\*14:02 (QRRAA); HLA-DRB1\*10:01 (RRRAA) (28,29).

**Tablica 1.** Aleli zajedničkog epitopa

HLA-DRB1 aleli	Pozicija aminokiselina				
	70	71	72	73	74
*01:01	Q	R	R	A	A
*01:02	Q	R	R	A	A
<b>*04:01</b>	<b>Q</b>	<b>K</b>	<b>R</b>	<b>A</b>	<b>A</b>
*04:04	Q	R	R	A	A
*04:05	Q	R	R	A	A
*04:08	Q	R	R	A	A
*10:01	R	R	R	A	A
*14:02	Q	R	R	A	A

**Q - glutamin, K - lizin, R - arginin, A - alanin, A - alanin**

Unatoč napretku u razumijevanju strukture i funkcije HLA-DRB1 molekula, temeljni mehanizmi kojim pojedini HLA-DRB1 aleli pogoduju razvoju RA još uvijek nisu poznati. Brojne teorije ekspresiju zajedničkog epitopa objašnjavaju kroz ulogu HLA molekule u

vezivanju specifičnih peptida i njihovom prezentiranju CD4+ T limfocitima putem T staničnih receptora. Pretpostavlja se da molekule HLA razreda II uzrokuju osjetljivost na RA mijenjanjem antigen specifičnog odgovora putem centralne i/ili periferne selekcije T limfocita, odnosno uzrokuju povećanu prezentaciju i smanjenu negativnu selekciju autoreaktivnih T limfocita uz inhibiciju selekcije CD4+CD25+ T regulacijskih stanica u timusu (20,22,27,28). Nadalje, u većini modela koji opisuju patogenezu RA spominje se molekularna mimikrija kao mogući predisponirajući čimbenik koji vodi nerazlikovanju HLA molekula i antigenih peptida unesenih infektivnim agensom. Međutim, unatoč brojnim pokušajima identificiranja artritogenih peptida, još nije dokazana njihova izravna veza i uloga u nastanku RA (20,30). Izgleda da citrulinacija aminokiselina u području zajedničkih epitopa pojačava afinitet peptida (autoantigena) za pozitivno nabijene aminokiseline u udubini hipervarijabilne regije HLA molekule. Smatra se da to utječe na sposobnost vezivanja na citrulinirane peptide te tako izaziva jači imunski odgovor sa nastajanjem anti-CCP (engl. *anti-Cyclic citrullinated peptide*; anti-CCP) protutijela (27,31). Štoviše, poznato je da se anti-CCP protutijela najčešće pojavljuju upravo u nositelja alela zajedničkog epitopa.

### **HLA zaštitni aleli**

Brojne studije dokazale su da pojedini HLA-DRB1 aleli, nazvani zaštitni aleli, mogu smanjiti rizik nastajanja RA. Aleli sa slijedom aminokiselina "DERAA" (D-asparaginska kiselina, E-glutaminska kiselina, R-arginin, A-alanin, A-alanin) na istoj poziciji kao kod zajedničkog epitopa smanjuju rizik za nastajanje RA. DERAA-kodirajući aleli su: \*01:03, \*04:02, \*11:02, \*11:03, \*13:01, \*13:02, \*13:04. DERAA pozitivni pojedinci imaju značajno manji rizik za razvoj RA, kako u slučaju prisutnih, tako i u slučaju odsutnih alela zajedničkog epitopa (32, 33). Udruženi su s blažim, manje erozivnim oblikom bolesti. Meta analiza koja je uključivala četiri europske populacije utvrdila je da je HLA-DRB1\*13:01 alel zaštitni alel za nastanak seropozitivnog RA, a nije pronašla zaštitni alel za seronegativni RA (34). Iz istraživanja RA bolesnika u Mađarskoj populaciji proizlazi da je HLA-DRB1\*13:01 alel zaštitni alel za seropozitivni i za seronegativni RA (27). U Okinom istraživanju 2014. pokazalo se da je HLA-DRB1\*13:02 zaštitni alel za razvoj seropozitivnog RA u Japanskoj populaciji (35). Zaštitni utjecaj HLA-DRB1 alela za razvoj RA dosad još nije rasvijetljen. Pretpostavlja se da je zaštitni učinak posredovan time što T limfociti prepoznaju DERAA sekvencu u peptidima koji su prezentirani u kontekstu HLA-DQ molekula. Opažanjem da je zaštitni DERAA učinak uočen kod DERAA-negativne djece od DERAA-pozitivnih majki upućuje na tzv.

nenasljednu materinju antigenost (engl. *Non-inherited maternal antigen*; NIMA). Taj je učinak najvjerojatnije rezultat ulaska materinjih stanica u fetalni krvotok tijekom trudnoće. Ove stanice mogu dovesti do mikrohimerizma u djeteta, što modulira i podiže prag tolerancije fetalnog imunskog sustava (33,36).

### **Povezanost alela zajedničkog epitopa s težinom i napredovanjem RA**

Osim uloge u samom nastanku bolesti, aleli zajedničkog epitopa su čimbenik rizika za teži, erozivniji oblik bolesti kao i za razvoj vanzglobnih obilježja bolesti (37,38). Brojne studije dokazale su povezanost između alela zajedničkog epitopa i vanzglobnih obilježja bolesti u pacijenata s RA u različitim populacijama (38,39). U populacijama sjeverne Europe i Sjeverne Amerike bolesnici koji su homozigoti ili heterozigoti za HLA-DRB1\*04:04 i HLA-DRB1\*04:01 alele imaju veću učestalost vanzglobnih obilježja bolesti uključujući i vaskulitis (40) (Tablica 2).

Utvrđeno je da pacijenti s HLA-DRB1\*01:01/\*04:01 i \*04:04/\*04:04 genotipom imaju povećan rizik za nastajanje kardiovaskularnih bolesti te povećan rizik smrtnosti od kardiovaskularnih bolesti (14,15,41). Dokazano je da su aleli zajedničkog epitopa rizični čimbenik prvenstveno za povećanu proizvodnju protutijela usmjerenih protiv cikličkih citruliniranih peptida (anti-CCP) u RA te na ishod bolesti utječu putem anti-CCP protutijela (27,40,42-44). Nastajanje anti-CCP-a povezano je s alelima HLA-DRB1\*04:01, \*04:04, \*04:05 i \*04:08 više nego s HLA-DRB1\*01 genotipom i izraženije je u nositelja dva epitopa nego u onih koji nose jedan epitop (43,45,46).



**Tablica 2.** Povezanost alela zajedničkog epitopa i težine bolesti

HLA-DRB1 genotip	Težina bolesti <sup>45</sup>	Erozije <sup>38</sup>	Felty sindrom <sup>40</sup>	Vanzglobna obilježja <sup>40</sup>	Anti-CCP <sup>43</sup>
*04:01/*04:04	+++	+++		+++	+++
*04:01/*04:01	+++	+++	+++	+++	+++
*04:04/*04:04	++	++		+++	++
*04:01/*01:01	++			Vaskulitis	
*04:01/X	++	+++			+++
*04:04/X	+	+			++
*04:05/X	+	+			

Aleli HLA-DRB1\*01:01 i HLA-DRB1\*10:01 povezuju se s blažim, sporo napredujućim oblikom bolesti (22,43,46). Aleli HLA-DRB1\*04:01 i HLA-DRB1\*04:04 povezani su s početkom bolesti u ranijom životnoj dobi, dok se alel HLA-DRB1\*01:01 povezuje s nastankom RA u kasnijoj životnoj dobi (27,39).

### Pojavnost rizičnih alela u različitim populacijama

Poznato je da se prevalencija i incidencija RA razlikuju u različitim etničkim skupinama, što se dijelom može objasniti različitom učestalošću i tipom HLA-DRB1 rizičnih alela u pojedinim populacijama, dokazanu brojnim populacijskim studijama (Tablica 3).

**Tablica 3.** Pojavnost rizičnih alela u različitim populacijama

Zemlja	HLA-DRB1 aleli	Težina bolesti
Zemlje sjeverne Europe <sup>20</sup>	*04:01, *04:04	+ + +
Zemlje Sjeverne Amerike <sup>20</sup>	*04:01, *04:04	+ + +
Zemlje Istočne Azije <sup>20</sup>	*04:05	+ +
Italija <sup>48</sup>	*01:01, *10:01, *04:05	+
Grčka <sup>9</sup>	*01:01, *04:01, *04:05, *10:01	+
Španjolska <sup>9</sup>		
Južna Španjolska	*01:01, *10:01, *04:05	+
SZ Španjolska -Lugo	*04:01, *04:04, *04:05	+ + +

HLA-DRB1\*04:01 i HLA-DRB1\*04:04 aleli najčešći su u pacijenata s RA u zemljama sjeverne Europe i Sjeverne Amerike, dok je HLA-DRB1\*04:05 najčešći u populacijama Istočne Azije (20,47). U populacijama južne Europe tj. mediteranskim zemljama, najčešći predodređeni aleli su HLA-DRB1\*01:01, \*04:05 i \*10:01 (9,48-50).

HLA-DRB1\*14:02 alel izražen je u pripadnika Yakima, Tlingit i Pima Indijanaca dok je DR4 učestaliji u Chippewa Indijanaca. U Afro Amerikanaca većina pacijenata s RA ne nosi alele zajedničkog epitopa (5,8).

### Reumatoidni artritis i drugi HLA geni

Tri nezavisne multicentrične prospektivne kohortne studije pokazale su da aminokiselina valin na poziciji 11 izvan zajedničkog epitopa zajedno s aminokiselinom lizin na poziciji 71 i alanin na poziciji 74 zajedničkog epitopa definira 16 haplotipova koji utječu na radiološko napredovanje bolesti, na povećanu smrtnost i bolji odgovor na anti-TNF (engl. *Tumor Necrosis Factor*; čimbenik tumorske nekroze) terapiju (45,51).

Nadalje, osim alela zajedničkog epitopa dokazano je da su drugi HLA aleli, kao što su HLA-DRB1\*15 i HLA-DRB1\*09:01 povezani s razvojem RA (52-54).

Seropozitivni RA pacijenti sa sekundarnim Sjögrenovim sindromom imaju povećanu učestalost HLA-DRB1\*15 alela. Navedeni alel također je povezan s RA u pacijenata koji nisu nositelji alela zajedničkog epitopa i koji nemaju sekundarni Sjögrenov sindrom (55). Utvrđena je i povezanost HLA-DRB1\*15 alela s bubrežnim oštećenjima kod RA pacijenata (56). Nadalje, dokazana je povećana učestalost HLA-DRB1\*15 alela u RA pacijenata s visokom razinom anti-CCP protutijela i protutijela na mutirani citrulinirani vimentin (anti-MCV) (27,52,54).

U europskim populacijama opisan je HLA-DRB1\*03:01 alel (dio proširenog haplotipa A2-B8-DR3), povezan isključivo s anti-CCP negativnim RA i blažim tijekom bolesti (57-59). U Japanu seronegativni RA povezan je s HLA-DRB1\*14 i HLA-DRB1\*08 homozigotnim alelima (60).

#### **1.4.1.2. Geni izvan sustava HLA**

Studije koje su istraživale cijeli genom otkrile su da genetičkoj predodređenosti za pojavnost i razvoj RA pridonose i geni izvan sustava HLA, tzv. „non-HLA” geni. Tako se s RA povezuju polimorfizmi gena PTPN22 (engl. *Protein Tyrosine Phosphatase Nonreceptor Type 22*), STAT4 (engl. *Signal Transducer and Activator of Transcription 4*), TRAF1/C5 (engl. *TNF receptor associated factor 1*), PADI4 (engl. *Peptidyl-Arginine Deiminase Type 4*) i CTLA4 (engl. *Peptidyl-Arginine Deiminase Type 4*) (61).

Polimorfizmi gena PTPN22 za unutarstaničnu tirozin fosfatazu povezani su s RA u europskim populacijama, ali se rijetko nalaze u azijskim populacijama. PTPN22 polimorfizam povezan je s anti-CCP i RF (engl. *Rheumatoid factor*) pozitivnim RA (22,62). Polimorfizam gena STAT4 za transkripcijski čimbenik koji je uključen u diferencijaciju Th1 T limfocita povećava rizik za nastajanje seropozitivnog i seronegativnog RA u svim etničkim skupinama (20,63).

Gen TRAF1/C5 kodira čimbenik 1 povezan s receptorima TNF i C5 komponentu komplekta, koji imaju važnu ulogu u apoptozi, proliferaciji i diferencijaciji upalnih stanica. Polimorfizam ovog gena povezan je s anti-CCP pozitivnim RA te je poznato da utječe na radiološko napredovanje bolesti (20,64). Gen PADI4 kodira enzim peptidil-arginin deiminazu 4 koji sudjeluje u pretvorbi arginina u citrulin i potiče stvaranje anticitrulinskih protutijela. Polimorfizmi gena PADI4 pronađeni su u azijskim populacijama, ali nisu u

europskim populacijama (65,66). Povezanost s patogenezom RA imaju i geni koji kodiraju CD28 i CD40 kostimulacijske molekule uključene u T staničnu aktivaciju i poticanje suradnje T i B-limfocita, inhibicijske molekule uključene u međudjelovanje limfocita T i antigen predočnih stanica (CTLA-4) te citokine uključene u aktivaciju T-limfocita (IL-2 i IL-21) i indukciju proupalnih (Th17) limfocita (67,68). Također, postoji povezanost gena za citokinske receptore i kemokine te gena uključenih u aktivaciju NF-kB puta (69).

U Tablici 4 prikazane su najčešće genetske razlike između anti-CCP pozitivnog i negativnog RA.

**Tablica 4.** Genetske razlike između anti-CCP pozitivnog i anti-CCP negativnog RA

<b>anti-CCP pozitivni RA</b>	<b>anti-CCP negativni RA</b>
HLA-DRB1*01	HLA-DRB1*03
HLA-DRB1*04	HLA-DRB1*13
HLA-DRB1*15	STAT4
PTPN22	
CTLA4	
STAT4	
TRAF1/C5	
PADI4	

### **Epigenetske modifikacije**

Sve je više studija koje dokazuju da su epigenetske modifikacije važne za razvoj reumatoidnog artritisa. Epigenetika objašnjava promjene u ekspresiji gena koje nisu rezultat promjene slijeda nukleotida u molekuli DNA. Najčešći epigenetski mehanizmi su metilacija DNK, modifikacija histona i sinteza nekodirajućih ribonukleotida. Ove molekularne promjene utječu na transkripciju gena uključenih u odgovor domaćina na antigene iz vanjske sredine, na nastanak upalnih reakcija i učinkovitost farmakološke terapije. Utvrđena je znatna razlika u metilaciji DNA sinovijalnih fibroblasta oboljelih od RA u odnosu na osteoarthritis. Zabilježena je i hipometilacija brojnih gena koji utječu na ekspresiju citokina, kemokina i

matriksnih metaloproteinaza te promjene histona koje utječu na transkripcijsku regulaciju sinteze upalnih molekula (70).

#### **1.4.2. Okolišni čimbenici povezani s reumatoidnim artritismom**

Niti jedan genetski čimbenik sam po sebi nije dovoljan za nastajanje RA. Za razvoj bolesti potrebno je međudjelovanje genetskih čimbenika i različitih čimbenika okoliša. Brojna istraživanja utvrdila su da pušenje duhana, razni infektivni uzročnici, izloženost industrijskoj prašini, socioekonomski status i prehrana mogu utjecati na nastanak i tijek RA. Nadalje, zna se da žene oboljevaju češće od muškaraca te se pretpostavlja da spolni hormoni i reproduktivni čimbenici mogu utjecati na razvoj i težinu bolesti (71).

##### **1.4.2.1. Pušenje**

Pušenje je najvažniji okolišni čimbenik rizika za nastanak RA. Osim s nastankom, pušenje je također povezano s težim oblikom i lošijom prognozom bolesti (72,73). Pretpostavlja se da pušenje smanjuje učinkovitost anti-TNF terapije (74). Rizik od RA povećava se s dužinom pušenja čak i kod pušača koji puše 10 i manje kutija cigareta na godinu (75). Pušenje povećava rizik za razvoj seropozitivnog (anti-CCP i RF+) RA, ali ne i seronegativnog RA, osobito u nositelja jednog ili dva alela zajedničkog epitopa i to prvenstveno HLA-DRB1\*04:01 i HLA-DRB1\*04:04 (76,77). Rezultati meta-analize Taylora i suradnika ukazali su da su pušenje i polimorfizam gena PTPN22 povezani s rizikom nastanka anti-CCP pozitivnog RA (78).

Glavni mehanizam kojim pušenje pridonosi nastanku RA je citrulinacija proteina. Novija istraživanja navode oksidativni stres, upalu, epigenetske promjene i povećanu apoptozu stanica kao dodatne mehanizme kojima pušenje utječe na razvoj RA (73,79).

Citrulinacija je posttranslacijska modifikacija aminokiseline arginin u citrulin djelovanjem enzima peptidilarginin deiminaze (PAD) uz prisustvo kalcijevih iona.

Citrulin je ubikvitarni protein koji se nalazi u različitim fiziološkim i patološkim stanjima. Naime, citrulinacija je fiziološki proces bitan u procesu razgradnje unutarstaničnih proteina koji se oslobađaju za vrijeme apoptoze stanica. Pušenje i upala izazivaju povećanu citrulinaciju proteina. Pojačana ekspresija citruliniranih proteina otkrivena je u sinovijalnom tkivu bolesnika s RA, osteoartritismom, reaktivim artritismom i drugim artropatijama te u upalnim bolestima crijeva i neurodegenerativnim bolestima. Međutim, povećana prisutnost

citruliniranih proteina u navedenim bolestima, osim u RA, nije povezana sa stvaranjem anticitrulinskih protutijela, što znači da sama prisutnost citruliniranih proteina nije dostatna za aktivaciju specifične imunosne reakcije. Citrulinirani proteini pronađeni su u bronhoalveolarnom lavatu pušača (73,76). Pretpostavlja se da pušenje pojačanom citrulinacijom, u genetski predodređenih osoba, potiče aktivaciju T limfocita, potom B limfocita koji proizvode anticitrulinska protutijela specifična za RA. Zašto i kako ovaj odgovor zahvaća zglobove ostaje nejasno (73,77,79).

Nedavno je dokazana povezanost karbamilacije ili posttranslacijske modifikacije aminokiseline lizin u homocitrulin s pojavom RA. Karbamilirani proteini postaju autoantigeni i na njih se stvaraju anti-CarP protutijela (engl. *Anti-Carbamylated Protein Antibodies*). Dokazano je da pušenje, kronična upala i bubrežna insuficijencija potiču karbamilaciju. Pojava anti-CarP protutijela povezuje se s anti-CCP negativnim RA i težom kliničkom slikom bolesti (80).

#### **1.4.2.2. Infektivni uzročnici**

Odavno se brojni infektivni uzročnici (Epstein-Barr virus, mikoplazme, parvovirus B19, Cytomegalovirus, virus rubeole, mikobakterije, proteus) povezuju s nastankom RA, ali još uvijek nije pronađen uvjerljiv dokaz o ulozi bilo kojeg navedenog uzročnika u nastanku bolesti (4). Unatoč brojnim istraživanjima još nije poznat način na koji infektivni uzročnik može potaknuti imunosnu reakciju odgovornu za nastanak RA. Najčešće spominjani mehanizmi nastanka bolesti su molekularna mimikrija, narušavanje tolerancije, aktivacija prirodene imunosti (Toll receptori, inflamosomi), utjecaj na regulacijske T i B stanice (81,82). U posljednje vrijeme dokazana je snažna povezanost periodontitisa i RA. Prema epidemiološkim studijama oboljeli od RA imaju veću učestalost periodontalnih bolesti (79). Pokazalo se da bakterija *Porphyromonas gingivalis*, najčešći uzročnik periodontitisa, sadrži enzim peptidilarginin deiminazu 4 (PADI4) i izaziva citrulinaciju proteina te u genetski predodređenih osoba (HLA-DRB1\*04:01 i HLA-DRB1\*04:04) pokreće stvaranje anticitrulinskih protutijela (79,83).

Crijevni mikrobiom predmet je intenzivnih istraživanja posljednjih nekoliko godina. Bakterije koje se nalaze u našim crijevima snažno utječu na razvoj prirodnog i stečenog imuniteta. Nedavna znanstvena istraživanja nedvojbeno su dokazala da je izmijenjen sastav crijevnih bakterija odgovoran za razvoj alergijskih i autoimunih bolesti (4). Promjenjen sastav crijevnog mikrobioma zabilježen je u bolesnika s RA. Primjenom kvantitativnog testa

polimerazne lančane reakcije (engl. *Polymerase Chain Reaction*; PCR) otkriveno je da novootkriveni, neliječeni bolesnici s RA imaju višak bakterija *Prevotella copri* i manjak bakterija *Bacterioides fragilis* u stolici, za razliku od zdravih ispitanika (84).

#### **1.4.2.3. Prehrana**

Pretpostavlja se da je utjecaj prehrane u nastanku bolesti znatan, ali još uvijek nije dovoljno istražen (7). Nedavna istraživanja pokazuju da prekomjerna tjelesna težina i pretilost povećavaju rizik za razvoj RA, pogoršavaju tijek bolesti i smanjuju izgleda za remisiju (85-87). Versini i suradnici zaključili su da upalni citokini koje izlučuje masno tkivo mogu povećati komorbiditet vezan uz RA, pogoršati tijek bolesti i smanjiti učinkovitost terapije. Adipokini poput leptina, adiponektina i rezistina potiču autoimuni proces time što podižu razinu odgovora imunskog sustava, T stanica i autoprotutijela (88). S druge strane, prehrana bogata ribom, maslinovim uljem i povrćem štiti od RA zbog visokog udjela omega 3 masnih kiselina. To je jedan od razloga zašto je manja prevalencija RA u mediteranskim zemljama (7). Također, visok udio vitamina D smanjuje rizik od razvoja RA. Vitamin K (prisutan u mahunarkama i povrću) može inhibirati proliferaciju sinoviocita sličnih fibroblastima te na taj način ublažiti upalu kod RA (7).

Brojna istraživanja dokazala su da niska do umjerena konzumacija alkohola može smanjiti rizik od razvoja RA (89,90). Pretpostavlja se da pijenje crne kave, četiri šalice i više dnevno, povećava rizik za nastanje bolesti (91).

#### **1.4.2.4. Socioekonomski status**

Godinama se pretpostavlja da su socioekonomski čimbenici povezani s rizikom za razvoj RA, ali još nije poznato koja je komponenta socioekonomskog statusa odgovorna za povećan rizik oboljevanja. Opisana je povezanost nižeg socioekonomskog statusa s lošijim ishodom bolesti. U Švedskoj studiji prikazana je povezanost visokog socioekonomskog statusa i nižeg rizika za RA iz čega se može zaključiti da još uvijek nedovoljno istraženi okolišni čimbenici i životne navike utječu na rizik za RA, čak i u društvu s vrlo egalitarnim socijalnim ustrojstvom (92).

#### **1.4.2.5. Izloženost prašini**

Izloženost industrijskoj prašini i drugim onečišćenjima zraka može povećati rizik od razvoja mnogih autoimunih bolesti uključujući i RA. Zanimljiva je veća učestalost RA kod radnika u rudnicima ugljena koji su između ostalog izloženi antracitu, azbestu i silicijskoj prašini te osim RA razvijaju i pneumokoniozu (Caplanov sindrom) (7). U vatrogasaca i pripadnika drugih spasilačkih službi koje su bile izložene prašini na mjestu terorističkog napada na Svjetski trgovački centar u New Yorku 2001. godine opisana je veća učestalost RA i drugih autoimunih bolesti. Prašina kojoj su bili izloženi sadržavala je staklena vlakna, silicij, azbest, olovo, policiklički aromatski ugljikovodik, poliklorirani bifenil, poliklorirani furan, dioksin i čestice cementa (93).

#### **1.4.2.6. Spol**

Žene oboljevaju češće nego muškarci možda dijelom i zbog stimulirajućeg učinka estrogena na imunski sustav. Estrogen inhibira funkciju T supresorskih stanica i poboljšava funkciju T pomoćničkih stanica. Osim toga, aktivirani estrogenski receptori prisutni na sinovijalnim fibroblastima mogu potaknuti proizvodnju metaloproteinaza. U makrofazima estrogeni potiču proizvodnju proupalnog citokina TNF-alfa (94).

Različiti reproduktivni čimbenici mogu pridonijeti razvoju RA. Žene koje su dobile prvu menstruaciju u ranijoj životnoj dobi imaju manji rizik za RA. Trudnoća je također rizični čimbenik za razvoj RA, jer je oko 12% žena s RA prve simptome dobilo unutar godinu dana od trudnoće. Ipak, tijekom trudnoće, osobito u trećem trimestru, većina žena s RA osjeti znatno olakšanje simptoma, ali su relapsi bolesti česti unutar šest mjeseci od poroda (95,96). Žene s više od troje djece imaju veći rizik za teži oblik bolesti, ali im nije povećan rizik za sam razvoj RA. Oralni kontraceptivi mogu smanjiti težinu bolesti, dok prvotno mišljenje da smanjuju rizik razvoja RA nije potvrđeno (95).

Najnovija istraživanja Cruza i sur. 2014. god. ukazuju na mogući utjecaj djetetovog genoma na rizik razvoja RA u majke. Naime, za vrijeme trudnoće određen broj stanica fetusa ulazi u majčin krvotok gdje se mogu zadržati i nekoliko desetljeća, a sama pojava naziva se fetalni mikrokimerizam. Istraživanjem je pokazano da je rizik oboljevanja od RA veći kod majki koje nisu nositelji alela zajedničkog epitopa HLA-DRB1 gena i čija su djeca nositelji rizičnog alela zajedničkog epitopa naslijeđenog od oca. Poznato je da majčin imunski sustav



može prepoznati proteine koje stvaraju stanice fetusa kao strane i potaknuti imunosnu reakciju i razvoj RA (36).

Niže razine testosterona i veće koncentracije estrogena pronađene su u muškaraca s RA, međutim još se ne zna jesu li takve promjene u razini hormona rezultat kronične upale ili muškarci s promjenjenom razinom hormona imaju povećan rizik za RA. Čini se da muški spol utječe i na fenotip bolesti. Za razliku od žena, u muškaraca se bolest češće pojavljuje u kasnijoj životnoj dobi, vjerojatnije je da će oboljeli biti seropozitivni i da će imati veći titar anti-CCP protutijela (97).

### **1.5. Patogeneza reumatoidnog artritisa**

Prema novijim spoznajama patogeneza RA započinje godinama prije kliničkog početka bolesti. U genetski predodređenih osoba pod utjecajem različitih okolišnih čimbenika te zbog poremećaja regulatornih mehanizama dolazi do pojačane posttranskripcijske modifikacije, osobito citrulinacije proteina. Najraniji događaj u patogenezi RA je aktivacija antigen predočnih stanica (makrofaga, dendritičkih stanica, sinovijalnih fibroblasta) koje predočuju antigene endogenog (citrulinirani peptidi) ili egzogenog porijekla CD4 T limfocitima. Oni se potom diferenciraju u Th1 i/ili Th17 stanice. Th1 stanice stvaraju IL-2 i interferon (IFN) gamma. Th17 stanice izlučuju IL-17 za koji se smatra da igra središnju ulogu u patogenezi RA jer ulazi u interakciju sa stanicama koje nose IL-17 receptore (sinovijalni fibroblasti, endotelne stanice, epitelne stanice, neutrofili) (98,99).

Diferencirani T limfociti potiču makrofage na produkciju proupalnih citokina i aktiviraju B limfocite na produkciju autoprotutijela. Autoprotutijela s ciljnim antigenom mogu formirati imunokomplekse koji aktiviranjem komplementa i Fc receptora na makrofazima dodatno stimuliraju proizvodnju proupalnih citokina (TNF, IL-6 i IL-1). Navedeni citokini mogu mijenjati i aktivirati diferencijaciju i funkciju T stanica i B stanica. Nadalje, proupalni citokini potiskuju diferencijaciju regulacijskih limfocita T (Treg) koji u fiziološkim uvjetima inhibiraju aktivnost Th1 i Th17 limfocita i time se narušava njihova uloga u održavanju periferne tolerancije u RA (99). Povećanom ekspresijom adhezijskih molekula na endotelu sinovijalnih krvnih žila i povećanim lučenjem kemokina dolazi do infiltracije upalnih stanica u sinovijalnu membranu. U sinovijalnom upalnom tkivu mogu se naći različite stanice stečene i prirodne imunosti koje sudjeluju u nastanku upale, održavanju upale i napredovanju bolesti. Neutrofili su uglavnom prisutni u sinovijalnoj tekućini, iako se mogu naći i na spoju sinovijalne ovojnice i hrskavice. Dakle, ključnu ulogu u patogenezi RA imaju

limfociti T te njihovo međudjelovanje s dendritičkim stanicama, makrofazima, limfocitima B, neutrofilima i mastocitima. Smatra se da aktivacija T limfocita nastaje prvenstveno u limfnim čvorovima ili u formiranim germinativnim centrima u upalno promjenjenoj sinovijalnoj membrani. Uloga limfocita B zasniva se na produkciji autoprotutijela, lučenju proupalnih citokina, predočavanju autoantigena T stanicama i aktiviranju T limfocita. Kao rezultat složenog međudjelovanja stanica prirodene i stečene imunosti nastaje snažna produkcija proupalnih citokina, pogotovo TNF-alfa, IL-1 i IL-6 (98,99).

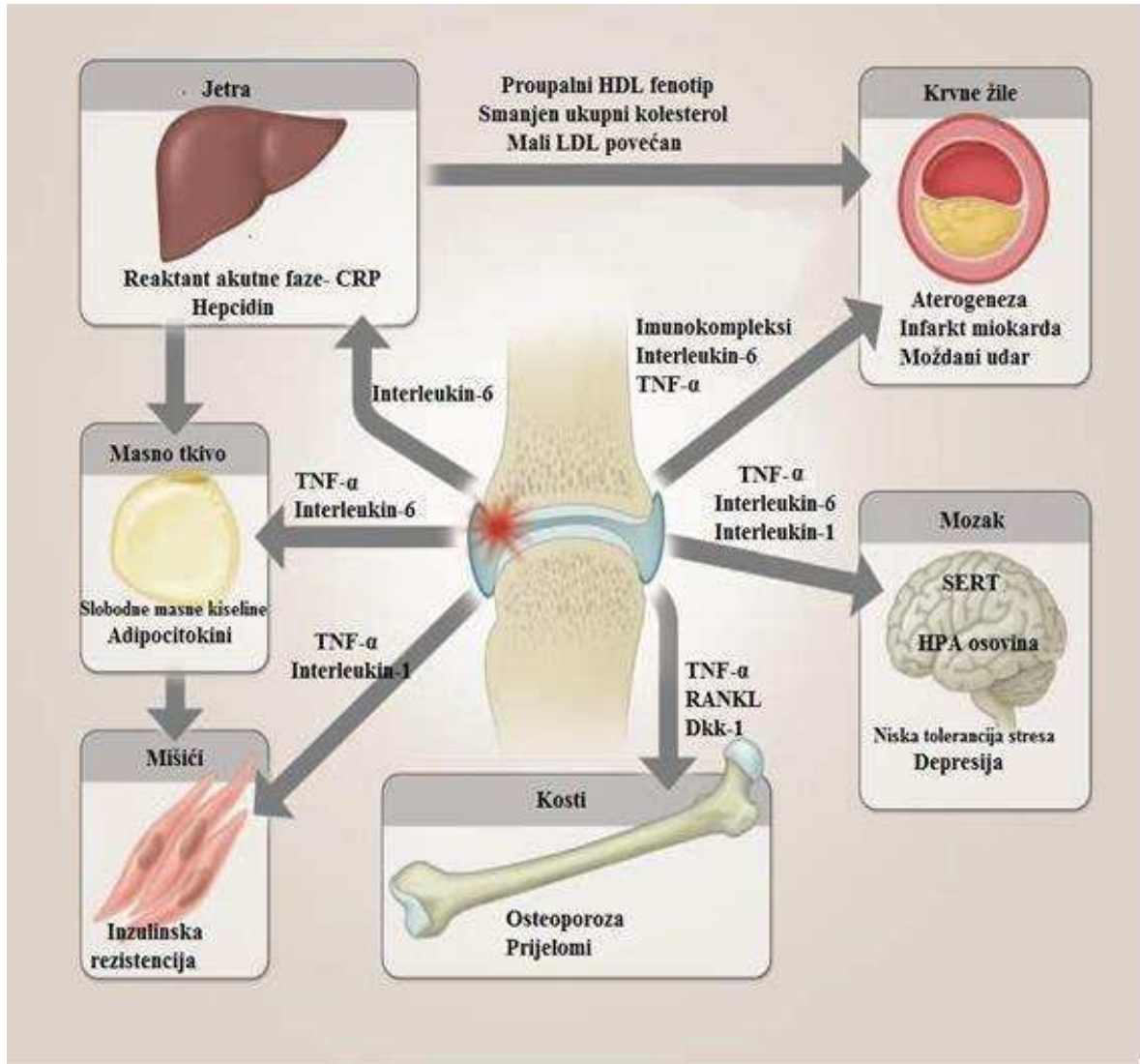
Pod utjecajem proupalnih citokina aktiviraju se sinovijalni fibroblasti, a sinovijalna membrana postaje hiperplastična i zadebljana. Hiperplastična zglobna ovojnica (panus) širi se sa rubova zglobova na površinu hrskavice, prekriva zglobne površine i razara ih.

Osim toga, promijenjena je i funkcija sinovijalnih fibroblasta. Aktivirani fibroblasti stvaraju citokine koji aktiviraju T i B limfocite te kemokine i prostaglandine koji podržavaju upalu. Sekrecijom litičkih enzima, osobito katepsina i matriks metaloproteinaza dolazi do degradacije hrskavice (98,100). Uz to, pod utjecajem IL-6 i TNF-alfa hondrociti stvaraju proteaze koje razaraju proteoglikane hrskavice i izvanstanični kolagen tipa 2. Daljnjem gubitku hrskavice pridonosi i odlaganje imunokompleksa koji sadržavaju RF i stimuliraju stvaranje invazivnog panusa. Dijelovi razorene hrskavice postaju autoantigeni koji dodatno potiču imunosnu reakciju (101).

Djelovanjem citokina IL-1, IL-6, IL-17, TNF-alfa i ekspresijom liganda za receptor koji aktivira transkripcijski čimbenik u jezgri  $\kappa$ B (engl. *Receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand*; RANKL) potiče se diferencijacija i aktivacija osteoklasta i njihova invazija u subhondralne dijelove kosti. U subhondralnom dijelu kosti javlja se osteoporoza, a na mjestu pripoja sinovijalne membrane za kost nastaju koštane erozije koje se ispune upalnim tkivom. Erodirana periartikulana kost pokazuje mali reparacijski potencijal, a inhibirana je i diferencijacija mezenhimalnih prekursorskih stanica u adipocite, osteoblaste i hondroblaste (102,103). U upalno promijenjenoj sinovijalnoj membrani, pod utjecajem vaskularnog endotelnog čimbenika rasta, potaknuta je neovaskularizacija. Aktivirane endotelne stanice potiču daljnju kemotaksiju leukocita te održavaju i pojačavaju upalnu reakciju u zglobovima (104). Urođeni i stečeni poremećaji imunoregulacije T i B limfocita omogućuju kronicitet upalnog procesa. Trajanjem upale sve je izraženiji T i B stanični odgovor, uz trajnu aktivnost makrofaga i sinoviocita, što se očituje stvaranjem sve većih količina proupalnih citokina i autoprotutijela (100,103).

Proupalni citokini, imunokompleksi i autoreaktivni proteini odgovorni su za sustavne učinke i vanzglobna obilježja RA. Utječu na stvaranje reaktanata akutne faze, anemije kronične

bolesti, dislipidemije, kardiovaskularnih bolesti, osteoporoze, sarkopenije, depresije i umora (Slika 2). Hiperstimulacija limfatičkog sustava nerijetko dovodi do razvoja limfoma (98).



**Slika 2.** Patogenetski mehanizmi vanzglobnih obilježja RA (prilagođeno prema McInnes IB, Schett G. N Engl J Med. 2011;365:2205-19. uz dopuštenje Copyright Massachusetts Medical Society).

CRP – C reaktivni protein; HDL – lipoprotein visoke gustoće; LDL – lipoprotein niske gustoće; TNF- $\alpha$  – tumor nekrotizirajući čimbenik alfa; RANKL – aktivator receptora nuklearnog čimbenika  $\kappa$ B-liganda; Dkk-1 – dickkopf-1, inhibitor Wingless signalnog puta; SERT – serotonin transporter; HPA – hipotalamo-hipofizno-adrenalna osovina.

U svom tijeku RA prelazi u kronični stadij s razaranjem zglobnih i vanzglobnih struktura te značajnim stupnjem invaliditeta, komorbiditeta i smrtnosti.

## **1.6. Klinička slika reumatoidnog artritisa**

Reumatoidni artritis pokazuje varijacije u kliničkoj manifestaciji u pojedinih bolesnika. Te razlike očituju se u broju zahvaćenih zglobova, napredovanju i opsegu oštećenja zglobova, aktivnosti bolesti i postizanju remisije. Osim toga, vanzglobna obilježja bolesti javljaju se samo u pojedinih bolesnika.

Tijekom ove dugotrajne bolesti izmjenjuju se faze pogoršanja i poboljšanja kliničkih simptoma i znakova te pokazatelja upalne aktivnosti bolesti. Nastale patomorfološke promjene su nepopravljive pa se u svakoj fazi pogoršanja dodatno oštećuju zahvaćeni zglobovi i organi. Bolest utječe na kvalitetu života bolesnika, izaziva poteškoće u obavljanju svakodnevnih aktivnosti i dovodi do invalidnosti.

### **1.6.1. Zglobna obilježja**

U oko 80% bolesnika bolest se razvija postupno, kroz nekoliko tjedana ili mjeseci sa izraženim umorom, blago povišenom temperaturom, gubitkom tjelesne težine, bolovima u mišićima i depresijom (105). Jutarnja ukočenost zglobova prvi je tipičan simptom bolesti te napredovanjem bolesti može trajati duže od sat vremena. Bol se u početku osjeća samo pri pritisku na zglob, a s vremenom postaje sve jača i trajno prisutna u mirovanju i pri pokretu. Glavno kliničko obilježje bolesti je simetrična oteklina ručnih, metakarpofalangealnih (MCP), proksimalnih interfalangealnih (PIP) i metatarzofalangealnih (MTP) zglobova. Ramena, koljena, laktovi i gležnjevi također mogu biti zahvaćeni kao i svi ostali sinovijalni zglobovi. Aksijalni skelet, osim vratne kralježnice, rijetko je zahvaćen (2,105). U 10% bolesnika RA počinje naglo sa simetričnom oteklinom velikog broja zglobova, izraženim općim simptomima i brzim razvijanjem vanzglobnih obilježja bolesti. Zahvaćenost jednog zgloba može biti jedina manifestacija RA ili može prethoditi poliartikularnom obliku bolesti. Razvojem bolesti nastaju teške i karakteristične deformacije poput radijalne devijacije ručnih zglobova i ulnarne devijacije prstiju šaka, „Z“ deformacije palčeva, deformacije ostalih prstiju šaka poput „labuđeg vrata“ i „rupice za gumb“. Razvija se fibularna devijacija prstiju stopala i izražen haluks valgus te stopalo poprima trokutasti oblik. Laktovi i koljena nagnju fleksijskoj kontrakturi, ramena adukcijskoj kontrakturi dok zahvaćenost kukova dovodi do fleksijsko-adukcijske kontrakture. Upale tetivnih ovojnica pridonose funkcionalnom oštećenju i mogu uzrokovati kanalikularne sindrome. Sinovitis intervertebralnih zglobova

vratne kralježnice završava s ankilozom i ukočenjem vrata. Zahvaćenost poprečnog ligamenta atlasa dovodi do atlantoaksijalne dislokacije i pritiska na produženu moždinu što može prouzročiti kljenut udova ili trenutnu smrt (2,105).

### **1.6.2. Vanzglobna obilježja**

Oko 25-30% bolesnika s RA ima vanzglobna obilježja bolesti. Čimbenici rizika za nastajanje vanzglobnih obilježja bolesti su dob, pušenje, prisutnost RF, anti-CCP protutijela i alela zajedničkog epitopa HLA-DRB1 gena. Vanzglobna obilježja su pretkazatelji lošije prognoze bolesti i povezana su s povećanim rizikom od kardiovaskularnih bolesti u bolesnika s RA (106).

Potkožni reumatoidni čvorići javljaju se u oko četvrtine bolesnika i to obično u seropozitivnih. Najčešće nastaju na ekstenzornoj strani udova, na mjestima izloženim mehaničkom pritisku (107).

Vaskulitis uzrokuju imunokompleksi koji se odlažu u stijenkama arterija. Može dovesti do ishemijskih promjena, ulceracija i nekroze na prstima šaka i stopala, palpabilne purpore donjih udova i u težim slučajevima do ulceracija na potkoljenicama. Na koži potkoljenica može se pojaviti i neutrofilna dermataza (pyoderma gangrenosum) (107,108). Vaskulitis perifernih živaca očituje se pojavom multiplog mononeuritisa i senzorne polineuropatije. Nešto rjeđa, ali i ozbiljnija vanzglobna obilježja su promjene na krvnim žilama visceralnih organa (108).

Promjene na srcu pri obdukciji nalaze se u oko 40% bolesnika, no rjeđe se klinički očituju. Najčešće je zahvaćen perikard u vidu eksudativnog i konstriktivnog perikarditisa. Reumatoidni čvorići u miokardu i na zaliscima mogu se očitovati smetnjama provođenja ili insuficijencijom zalisaka. Infarkt miokarda zbog vaskulitisa nastaje rijetko. Međutim, povišen je rizik od kardiovaskularnih bolesti, ponajprije od ishemične bolesti srca zbog ubrzane ateroskleroze koja se razvija uslijed kronične upale (18,109).

Pluća bolesnika s RA mogu biti zahvaćena u sklopu same bolesti (pleuritis, intersticijska fibroza i nodularna plućna bolest), ali i infekcijama i lijekovima koji se koriste za liječenje RA (110).

Na oku mogu nastati skleritis i episkleritis, a reumatoidni čvorići na oku mogu uzrokovati perforantnu skleromalaciju. Kod prisutnog sekundarnog Sjögrenovog sindroma izražena je suhoća sluznice očiju i usne šupljine (111).

Odlaganja u bubrege stabilnog serumskog amiloid A proteina, reaktanta akutne faze, uzrokuje nefrotski sindrom i zatajenje bubrega. Amiloid se, u sklopu sekundarne amiloidoze, taloži i unutarstanični matriks ostalih organa (112).

Bolesnici s Feltyevim sindromom uz zglobne promjene tipične za RA imaju znakove hipersplenizma (splenomegalija, anemija, leukopenija, trombocitopenija), limfadenopatiju, vrućicu, umor i gubitak težine. Koža im je hiperpigmentirana, a na potkoljenicama nastaju ulceracije. Nastaje samo u seropozitivnih bolesnika, nositelja HLA-DRB1\*04:01/\*04:01 genotipa (113). Gubitak mišićne mase ili sarkopenija i mišićna slabost česti su u oboljelih od RA (114).

Osteoporoza nastaje zbog povećane aktivnosti osteoklasta pod utjecajem proupalnih citokina, zbog smanjene fizičke aktivnosti i dugotrajne primjene glukokortikoida. Također je povećan rizik od vertebralnih i nevertebralnih prijeloma (115).

Rizik od infekcija, prije svega dišnog i mokraćnog sustava, povećan je u oboljelih od RA i korelira s težinom i aktivnosti bolesti. Treba napomenuti i da samo liječenje glukokortikoidima i biološkom terapijom dodatno povećava rizik od infekcija (17,110).

Blago povišen rizik od maligne bolesti u bolesnika s RA korelira s težinom i upalnom aktivnosti bolesti. U odnosu na opću populaciju, ovi bolesnici imaju dva puta veći rizik od nastanka limfoma (116). Biološka terapija ne povećava dodatno rizik od malignih bolesti, ali je dokazana povezanost biološke terapije i povećane incidencije melanoma i nemelanomskih tumora kože (117).

Depresija je dio kliničke slike oboljelih od RA. Znatno utječe na kvalitetu života oboljelih i na lošiji dugotrajniji ishod bolesti (118).

## **1.7. Dijagnostika reumatoidnog artritisa**

Dijagnoza RA postavlja se na osnovu anamneze i kliničkog pregleda, laboratorijskih pretraga i radiološke obrade.

### **1.7.1. Laboratorijske pretrage**

Važno mjesto u dijagnosticiranju reumatoidnog artritisa imaju laboratorijske pretrage. U obradi je nužno napraviti hematološke, biokemijske i serološke pretrage. Povišene vrijednosti sedimentacije eritrocita i C reaktivnog proteina odražavaju aktivnost upalnog procesa. Većina bolesnika ima normocitnu normokromnu ili blago hipokromnu anemiju kronične bolesti koja korelira s razinom reaktanata akutne faze i aktivnosti bolesti. Snižena je vrijednost hemoglobina i serumskog željeza i povišena koncentracija feritina. Trombocitoza je pokazatelj aktivnosti bolesti kao i blaga leukocitoza (119). Česta je poliklonska hipergamaglobulinemija. Testovi bubrežne i jetrene funkcije obično su uredni.

Pretraga sinovijalne tekućine važna je pri svakom novonastalom artritisu ili izljevu radi diferenciranja sličnih stanja (npr. septički ili kristalni artritis). Sinovijalna tekućina u RA smanjene je viskoznosti, broj stanica uvećan je od 3000 do 50000/mm<sup>3</sup> i prevladavaju polimorfonuklearni leukociti (120).

### **Protutijela**

#### **Reumatoidni faktor**

Reumatoidni faktor je autoprotutijelo na Fc fragment imunoglobulina G. Smatra se da ima ulogu u patogenezi bolesti, može aktivirati mehanizme stanične imunosti te stvarati cirkulirajuće imunokomplekse i aktivirati sustav komplementa. Laboratorijski se mogu odrediti sva tri izotopa imunoglobulina (RF-IgA, RF-IgM, RF-IgG), ali se rutinski određuje samo RF-IgM protutijelo. Povišen titar RF ima 70%- 80% bolesnika s RA. Specifičnost RF za RA je 85%, a osjetljivost 69% (121). Osim dijagnostičke, RF ima i prognostičku vrijednost. Povišen titar RF u serumu može godinama prethoditi nastupu simptoma RA. Visoki titar RF loš je prognostički znak jer ukazuje na teži oblik bolesti s vanzglobnim obilježjima (122).

Povišene vrijednosti RF mogu se naći u 10% zdravih osoba te u drugim bolestima poput Sjögrenovog sindroma, sistemske skleroze, sistemskog eritemskog lupusa, miješane bolesti vezivnog tkiva, dermatomiozitisa, kroničnog hepatitisa, primarne bilijarne skleroze, kroničnih bakterijskih i virusnih infekcija te limfoproliferativnim bolestima (123).

#### Anticitrulinska protutijela

Ciklička citrulinska protutijela su protutijela usmjerena protiv cikličkih citruliniranih proteina. U eksperimentalnim radovima dokazano je njihovo artritogeno djelovanje i mogući udio u etiopatogenezi RA (124). Dokazana je jaka povezanost između stvaranja anti-CCP, alela zajedničkog epitopa HLA-DRB1 gena, PTPN22 gena, pušenja i *Porphyromonas gingivalis*. Anti-CCP protutijela imaju dijagnostičku, prediktivnu i prognostičku vrijednost. Imaju visoku specifičnost (98%) i dobru osjetljivost (70%). Mogu se dokazati u serumu godinama prije pojave prvih simptoma bolesti (124). Prediktivna vrijednost anti-CCP protutijela za RA potvrđena je i u bolesnika s nediferenciranim artritismom. U istraživanju van Gaalena i sur. 75% bolesnika koji su u početku bili anti-CCP pozitivni nakon prve godine zadovoljilo je ARA (engl. *American Rheumatism Association*; ARA) kriterije za dijagnozu RA, a nakon 3 godine čak njih 93%. Među bolesnicima koji su bili anti-CCP negativni u početku, samo ih je 25% zadovoljilo kriterije za RA nakon 3 godine (125). Pozitivan titar anti-CCP protutijela u bolesnika s RA loš je prognostički znak i ukazuje na teži, erozivni oblik bolesti (124-126).

Povišena vrijednost anti-CCP protutijela može se naći i u oko 9% bolesnika sa sistemskim eritemskim lupusom, bolesnika sa Sjögrenovim sindromom (5%), psorijatičnim artritismom (8%), autoimunim hepatitisom (2-4%) i aktivnom tuberkulozom (12%) (127).

Razina vrijednosti RF i anti-CCP protutijela uključena je u važeće kriterije Američkog reumatološkog društva (engl. *American College of Rheumatology*; ACR) i Europske lige za borbu protiv reumatizma (engl. *European League Against Rheumatism*; EULAR) klasifikacijske kriterije za RA iz 2010 (128). Povišena vrijednost oba autoprotutijela govori u prilog potvrde dijagnoze RA sa specifičnošću od 97%. Navedeni kriteriji bitno olakšavaju dijagnozu ranog RA (Tablica 5).



**Tablica 5.** ACR/EULAR klasifikacijski kriteriji za reumatoidni artritis iz 2010. (Prilagođeno prema Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, et al. Arthritis Rheum 2010;62:2569-81).

Domena	Parametar	Bodovi
Zahvaćenost zglobova	1 veliki zglob (rame, lakat, kuk, koljeno, gležanj)	0
	2 – 10 velikih zglobova	1
	1 – 3 mala zgloba (MCP, PIP, IP zglob palca, MTP, ručni zglob)	2
	4 – 10 malih zglobova	3
	> 10 zglobova (najmanje 1 mali zglob)	5
Serologija	Negativan RF i negativan anti-CCP	0
	Slabo pozitivan RF ili slabo pozitivan anti-CCP*	2
	Jako pozitivan RF ili jako pozitivan anti-CCP†	3
Reaktanti akutne faze	Normalan CRP i sedimentacija eritrocita	0
	Povišen CRP ili ubrzana sedimentacija eritrocita	1
Trajanje simptoma	< 6 tjedana	0
	≥ 6 tjedana	1
Maksimalan broj bodova: 10		Dijagnoza RA: ≥ 6 bodova

\*Slabo pozitivan RF i anti-CCP = vrijednost veća za jedan do tri puta od gornje granice normale; †Jako pozitivan RF i anti-CCP = vrijednost veća za više od tri puta od gornje granice normale; MCP – metakarpofalangealni; PIP – proksimalni interfalangealni; IP – interfalangealni; MTP – metatarzofalangealni; RF – reumatoidni faktor; anti-CCP – anticitrulinska protutijela; CRP – C - reaktivni protein; RA – reumatoidni artritis

Postalo je sve jasnije da anti-CCP status razlikuje dva klinička fenotipa RA. Sve je više dokaza koji potvrđuju da se seropozitivni i seronegativni RA razlikuju u genetskoj osnovi, u patogenezi pa čak i odgovoru na terapiju (129). Važno je napomenuti da druga autoprotutijela kao što su anti-CarP protutijela mogu postojati u seronegativnih RA bolesnika. Štoviše, dokazana je njihova predskazateljska vrijednost razvoja RA koja je neovisna o anti-CCP protutijelima. Međutim, potrebna su daljnja istraživanja za dokazivanje dijagnostičke i prognostičke vrijednosti ovih autoprotutijela (80).

## Antinuklearna protutijela

Od ostalih imunoloških testova određuje se titar antinuklearnih antitijela (ANA). Negativan ANA test isključuje sistemski eritemski lupus i druge sustavne reumatske bolesti. ANA mogu biti pozitivna u jedne trećine bolesnika s RA, ali njihovo prisustvo nema nikakvu prognostičku vrijednost u RA. Sekundarni Sjögrenov sindrom često je javlja uz RA i nerijetko tipični serološki markeri za Sjögrenov sindrom (anti SS-A i anti SS-B) mogu biti prisutni u bolesnika s RA (130).

### 1.7.2. Radiološke metode

S obzirom da je glavna značajka RA zahvaćanje zglobova, različite slikovne radiološke metode jako su važne u dijagnostici bolesti i praćenju razvoja strukturnih promjena.

Standardni radiogrami šaka i stopala, na kojima nastaju prve strukturne promjene RA, još uvijek su zlatni standard u dijagnostici RA, kao i u praćenju strukturnih promjena uslijed napredovanja bolesti. Rane promjene vidljive na radiogramu su paraartikularna osteoporoza i otekline mekih tkiva oko zglobova, a s napretkom bolesti nastaje suženje zglobnog prostora, rubne erozije kosti, subluksacije i luksacije zglobnih tijela te sekundarni osteoartritis. U većini slučajeva prve vidljive erozije nastaju na 5. MTP zglobu iako bolesnik ne mora imati simptome zahvaćenosti stopala (131). Čak 70% bolesnika s RA razvija erozije prije druge godine trajanja bolesti (132).

Primjena dijagnostičkog muskuloskeletnog ultrazvuka u kombinaciji s tehnikom Power Doppler u RA, posebice u području malih zglobova šaka i stopala, omogućava rano otkrivanje sinovitisa, otkrivanje koštanih erozija prije nego što su vidljive na klasičnom radiogramu te pregled periartikularnog mekog tkiva, tetiva, tetivnih ovojnica i burza. Ova metoda korisna je u praćenju aktivnosti bolesti i uspješnosti terapije (131,133).

Magnetskom rezonancijom moguće je prikazati početne upalne i erozivne promjene pa je tako bitna u postavljanju rane dijagnoze, praćenju napredovanja bolesti i uspješnosti terapije. Nezaobilazna je pretraga za dokazivanje atlantoaksijalne dislokacije (131).

Scintigrafija skeleta osjetljiva je, ali nespecifična pretraga, kojom se mogu otkriti promjene na kostima i do 6 mjeseci prije nego što su vidljive na standardnom radiogramu. Dobiveni podatci o distribuciji pojačanog nakupljanja radiofarmaka mogu biti korisni u diferencijalnoj dijagnozi RA (131).

Kriteriji za postavljanje rane dijagnoze RA, indeksi praćenja aktivnosti bolesti i učinkovitosti terapije, indeksi procjene funkcionalne sposobnosti bolesnika s RA i radiološka procjena oštećenja zglobova uvelike pomažu u odluci o početku liječenja i u procjeni učinka terapije.

Za praćenje aktivnosti bolesti i učinkovitosti liječenja u kliničkoj praksi najčešće se primjenjuju ACR i EULAR kriteriji. ACR kriteriji aktivnosti bolesti obuhvaćaju broj bolnih i otečenih zglobova, bolesnikovu procjenu boli na vizualnoj analognoj ljestvici (engl. *Visual Analogue Scale*; VAS), bolesnikovu procjenu opće aktivnosti bolesti (VAS), liječnikovu procjenu aktivnosti bolesti (VAS), bolesnikovu procjenu funkcionalnog statusa (engl. *Health Assessment Questionnaire*; HAQ) i reaktante akutne faze. ACR 20 odgovor definiran je kao smanjenje broja bolnih i otečenih zglobova za 20% i više i uz to najmanje 20%-tno poboljšanje u najmanje tri od preostalih pet varijabli. ACR 50 i ACR 70 odgovori znače poboljšanje od 50% i 70% u odnosu na početno stanje u navedenim mjerenjima (134). EULAR-ova procjena aktivnosti bolesti DAS 28/44 (engl. *Disease Activity Score*; DAS) temelji se na procjeni broja bolnih i otečenih zglobova, sedimentaciji/CRP i bolesnikovoj procjeni aktivnosti bolesti VAS skalom. U kliničkoj praksi najčešće se primjenjuje DAS28 indeks koji uzima u obzir broj bolnih i otečenih zglobova od 28 izabranih zglobova, sedimentaciju eritrocita i bolesnikovu procjenu aktivnosti bolesti (VAS). Smolen i sur. predložili su pojednostavljeni indeks aktivnosti bolesti (engl. *Simplified Disease Activity Index*; SDAI) temeljen na numeričkom zbroju pet parametara: broj bolnih (28) i otečenih (28) zglobova, bolesnikova procjena aktivnosti bolesti (VAS), liječnikova procjena aktivnosti bolesti (VAS) i CRP (135). Aletaha i sur. smatraju da reaktanti akutne faze malo pridonose multikomponentnim indeksima ocjene aktivnosti bolesti pa su predložili klinički indeks aktivnosti bolesti (engl. *Clinical Disease Activity Index*; CDAI) (136).

HAQ indeks jedan je od upitnika koji se najčešće koristi u svakodnevnoj kliničkoj praksi za procjenu funkcionalne sposobnosti bolesnika s RA (137). Dobar je predskazatelj funkcionalnog ishoda, radne nesposobnosti, strukturnog oštećenja zglobova i povećane smrtnosti (138).

Stupanj oštećenja zglobova u RA procjenjuje se analizom širine zglobnog prostora i prisutnosti erozija na standardnom radiogramu šaka i stopala. Najčešće korišteni sustavi bodovanja radiološkog oštećenja su bodovanje prema Larsenu i Sharpu te njihovim modifikacijama (139,140).

## 1.8. Liječenje reumatoidnog artritisa

Osnovni je zahtjev suvremene reumatologije postaviti ranu dijagnozu bolesti, prepoznati bolesnike koji će razviti teški, brzo napredujući, erozivni artritis kako bi se pravovremeno mogla započeti intenzivna terapija, a sve s ciljem izbjegavanja nastanka nepopravljivih oštećenja zglobova i trajne nesposobnosti te postizanje remisije bolesti.

Visoko razarajuća priroda RA očituje se razvojem erozija u 10-26% bolesnika u prva tri mjeseca trajanja bolesti, u više od 60% bolesnika tijekom prve godine trajanja bolesti dok u 75% bolesnika erozije nastaju tijekom prve dvije godine trajanja bolesti (141).

Tijek RA je različit među bolesnicima i stoga je neophodno u svakodnevnoj kliničkoj praksi predvidjeti hoće li bolesnik razviti teški, brzo napredujući erozivni artritis.

Najuvjerljiviji čimbenici rizika za razvoj erozivne bolesti su povišen titar ant-CCP protutijela i RF, povišeni reaktanti akutne faze, rani radiološki nalaz erozija, broj otečenih zglobova, pušenje, prisutnost alela zajedničkog epitopa HLA-DRB1 gena (\*04:01,\*04:04), ženski spol, inicijalno visoka aktivnost bolesti i stupanj nesposobnosti (45,142-144).

Osnovni ciljevi liječenja reumatoidnog artritisa jesu smanjenje boli, sprečavanje oštećenja zgloba, sprečavanje gubitka funkcije i poboljšanje kvalitete života, a krajnji cilj liječenja je postizanje kliničke remisije ili niske aktivnosti bolesti. Klinička remisija podrazumijeva odsutnost znakova i simptoma upalne aktivnosti bolesti. Prema ACR/EULAR kriterijima remisija znači prisutnost jednog ili nijednog otečenog i jednog ili nijednog bolnog zgloba (145). Nadalje, o remisiji RA govorimo kada je vrijednost DAS 28 manja od 2,6. Radiološka remisija ukazuje na odsutnost aktivnosti bolesti kod analize zglobova color doppler ultrazvukom i magnetskom rezonancijom (146).

Za postizanje remisije bitna je rana dijagnoza bolesti, dok još nema radiološki vidljivih erozija kosti i pravodobno učinkovito liječenje.

U liječenju bolesnika s RA usvojen je koncept liječenja prema unaprijed određenom cilju (engl. *Treating to Target*; T2T) tj. prema remisiji (146). Pri donošenju odluke o liječenju bolesnika s RA potrebno je uz klinički pregled, laboratorijsku i radiološku obradu uzeti u obzir sve komorbiditete te odrediti aktivnost bolesti i funkcionalni status bolesnika.

U periodu provođenja terapije neophodne su redovite kontrole bolesnika, procjena aktivnosti bolesti i funkcionalnog statusa, periodična laboratorijska i radiološka obrada i pravovremeno uočavanje komplikacija bolesti i terapije. Sve dok se ne postigne željeni cilj liječenja terapija se mijenja i prilagođava prema prethodno utvrđenom protokolu (146,147).

U liječenju RA koriste se nesteroidni protuupalni lijekovi, analgetici, glukokortikoidi, sintetski i biološki lijekovi koji mijenjaju tijek bolesti (engl. *Disease modifying anti-rheumatic drugs*; DMARD) te iznimno citostatici (147). Također je važna edukacija bolesnika, rehabilitacija i primjena metoda fizikalne terapije, a u slučaju izostanka učinkovitosti svih navedenih mjera kirurško liječenje nastalih oštećenja zglobova i pripadajućih struktura.

Nesteroidni protuupalni lijekovi (engl. *Non-steroidal anti-inflammatory drugs*; NSAID) su lijekovi različite kemijske strukture koji imaju analgetski, protuupalni i antipiretski učinak. Glavno djelovanje nesteroidnih protuupalnih lijekova je inhibicija ciklooksigenaza (COX-1 i COX-2) i posljedično smanjeno stvaranje prostaglandina i tromboksana. Protuupalno djelovanje NSAID-a posljedica je inhibicije COX-2, dok inhibicijom COX-1 nastaju nuspojave, uglavnom gastrointestinalnog trakta. Klasični NSAID su neselektivni inhibitori ciklooksigenaze (COX-1 i COX-2), dok su koksibi selektivni COX-2 inhibitori.

Simptomatskim liječenjem RA nesteroidnim protuupalnim lijekovima može se smanjiti bol, ali ne i napredak bolesti (148).

Glukokortikoidi su lijekovi koji dovode do brze supresije upale, smanjivanja otekline zglobova i bola. Indicirani su kao vezna terapija dok ne počne djelovanje DMARD-a te u fazama pogoršanja bolesti. Primjena malih doza glukokortikoida u prve dvije godine trajanja bolesti može utjecati na tijek bolesti smanjivanjem napredovanja zglobnih erozija (149).

Konvencionalni sintetski lijekovi koji mijenjaju tijek bolesti (csDMARD) su lijekovi koji smanjuju simptome i znakove bolesti, poboljšavaju funkcijske sposobnosti bolesnika i usporavaju strukturalna oštećenja zglobova. Iz ove skupine lijekova najčešće se primjenjuju metotreksat, klorokin, leflunomid i sulfasalazin. Metotreksat je prvi lijek izbora u liječenju RA te se primjenjuje u monoterapiji ili u kombinaciji s drugim DMARD-ima. Dokazano usporava radiološko napredovanje bolesti. Njegova adekvatna primjena u jednog dijela bolesnika može dovesti do remisije bolesti (147).

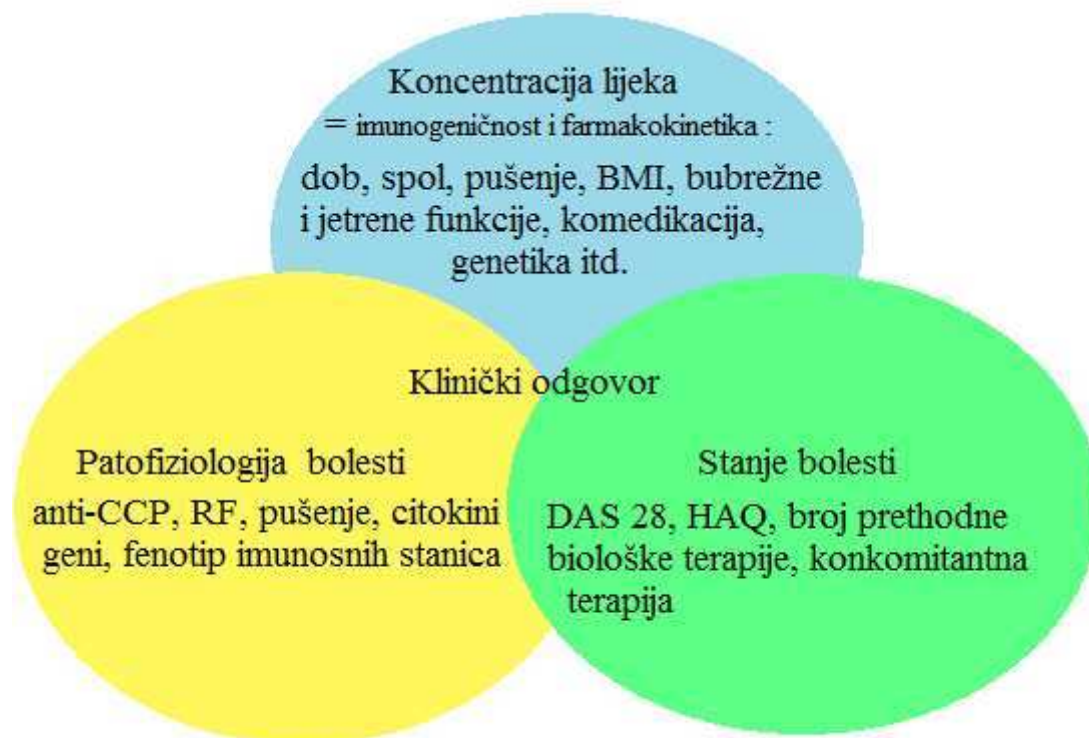
Ako se primjenom optimalnog liječenja sintetskim DMARD-ima ne postigne remisija ili niska aktivnost bolesti tada se preporuča liječenje biološkim lijekovima koji mijenjaju tijek bolesti. Biološki lijekovi su proteinske molekule proizvedene rekombinantnom tehnologijom koji djeluju na različite signalne puteve u upalnoj reakciji i tako prekidaju kaskadu razvoja upale (150). Djeluju na upalu putem neutralizacije TNF- $\alpha$  (adalimumab, etanercept, infliksimab, certolizumab pegol, golimumab), putem neutralizacije B limfocita (rituksimab), blokiranjem receptora IL-6 (tocilizumab) i IL-1 (anakinra), inhibicijom aktivacije T limfocita (abatacept) i inhibicijom janus kinaze (tofacitinib) (Tablica 6). Primjenom bioloških lijekova

postiže se bolji klinički odgovor, veći broj bolesnika ulazi u remisiju, usporava se napredovanje oštećenja zglobova, poboljšava fizička funkcija i kvaliteta života bolesnika. Navedeni lijekovi mogu imati ozbiljne nuspojave, koje uključuju povećan rizik od infekcija, povećanu incidenciju melanoma i nemelanomskih tumora kože, reaktivaciju tuberkuloze i B hepatitisa, a mogu se izbjeći pravilnim odabirom bolesnika, testovima probira i adekvatnim praćenjem bolesnika (147).

**Tablica 6.** Prijedlog nomenklature lijekova koji mijenjaju tijek bolesti (prilagođeno prema Smolen JS, van der Heijde D, Machold KP et al. Ann Rheum Dis. 2014;73:3-5).

Lijekovi koji mijenjaju tijek (DMARD-i) reumatoidnog artritisa			
Sintetski DMARD (sDMARD)		Biološki DMARD (bDMARD)	
Konvencionalni sintetski (csDMARD)	Ciljani sintetski (tsDMARD)	Originalni biološki (boDMARD)	Biosimilari (bsDMARD)
Odobreni lijekovi koji mijenjaju tijek bolesti (DMARD-i) za reumatoidni artritis			
<ul style="list-style-type: none"> <li>• klorokin</li> <li>• leflunomid</li> <li>• metotreksat</li> <li>• sulfasalazin</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• tofacitinib</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• abatacept</li> <li>• adalimumab</li> <li>• anakinra</li> <li>• certolizumab</li> <li>• etanercept</li> <li>• golimumab</li> <li>• infliksimab</li> <li>• rituksimab</li> <li>• tocilizumab</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• infliksimab</li> </ul>

Klinički odgovor na biološku terapiju znatno se razlikuje od bolesnika do bolesnika. Djelomični razlog za to su različite osobine bolesnika, poput dobi, spola, indeksa tjelesne mase, drugih terapija koje istovremeno primaju te navika poput pušenja (Slika 3). Klinički odgovor također ovisi o težini bolesti, prisutnosti autoprotutijela, genetskoj pozadini, razini citokina i fenotipu imunskih stanica (151). Važno je naglasiti da terapiju treba individualizirati uzimajući u obzir sve navedene čimbenike koji mogu utjecati na učinkovitost liječenja.



**Slika 3.** Utjecaj različitih čimbenika na klinički odgovor kod liječenja biološkom terapijom (prilagođeno prema Daien CI, Morel J. Mediators Inflamm. 2014;2014:386148).

## **2. CILJEVI I HIPOTEZE**

Poznato je da se prevalencija i incidencija RA razlikuju u različitim etničkim skupinama, što se dijelom može objasniti različitom učestalošću i tipom rizičnih alela zajedničkog epitopa HLA-DRB1 gena u pojedinim populacijama. Osim uloge u samom nastanku bolesti, aleli zajedničkog epitopa su čimbenik rizika za teži, erozivniji oblik bolesti kao i za razvoj vanzglobnih obilježja bolesti.

U višegodišnjoj kliničkoj praksi u Kliničkom odjelu za reumatologiju i imunologiju Klinike za unutarnje bolesti i Zavodu za fizikalnu medicinu i rehabilitaciju s reumatologijom KBC Split, primijećeno je da veliki broj oboljelih od RA s područja Sinjske krajine (SK) ima teži, brzo napredujući, erozivni, seropozitivni oblik bolesti.

### **2.1. Ciljevi istraživanja**

S obzirom na navedenu problematiku, ciljevi ovog istraživanja su sljedeći:

1. Odrediti raspodjelu alela HLA-DRB1 gena u populaciji oboljelih od reumatoidnog artritisa s područja Sinjske krajine te usporediti s raspodjelom alela HLA-DRB1 gena u populaciji zdravih s područja Sinjske krajine. Odrediti raspodjelu alela HLA-DRB1 gena u populaciji oboljelih od reumatoidnog artritisa s područja ostatka Splitsko-dalmatinske županije (SDŽ) te usporediti s raspodjelom alela HLA-DRB1 gena u populaciji zdravih s područja ostatka Splitsko-dalmatinske županije. Usporediti raspodjelu alela HLA-DRB1 gena populacije oboljelih od reumatoidnog artritisa s područja Sinjske krajine s raspodjelom alela HLA-DRB1 gena populacije oboljelih od reumatoidnog artritisa s područja ostatka Splitsko-dalmatinske županije.

2. Odrediti titar specifičnih protutijela za RA (anti-CCP, RF), vrijednost reaktanata akutne faze (Sedimentacije, CRP), kliničku aktivnost bolesti (DAS28), funkcionalni status (HAQ) i stupanj radioloških promjena (Larsen) u populaciji oboljelih od RA s područja Sinjske krajine te sve navedene parametre usporediti s vrijednostima u oboljelih s područja ostatka Splitsko-dalmatinske županije.

3. Usporediti povezanost pojavnosti alela HLA-DRB1 gena s titrom specifičnih protutijela, kliničkom aktivnosti bolesti, radiološkim stupnjem bolesti i funkcionalnim statusom.



4. Ispitati povezanost pušenja cigareta s titrom anti-CCP-a i alelima HLA-DRB1 gena u populaciji oboljelih od RA.

## **2.2. Hipoteze**

1. S obzirom da velik broj oboljelih od RA s područja Sinjske krajine ima teži oblik bolesti, očekujemo veću zastupljenost alela HLA-DRB1\*04:01 i HLA-DRB1\*04:04 nego u oboljelih s područja ostatka Splitsko-dalmatinske županije.

2. S obzirom da velik broj oboljelih od RA s područja Sinjske krajine ima teži oblik bolesti, očekujemo veći udio seropozitivnih pacijenata u odnosu na seronegativne.

3. S obzirom da su aleli HLA-DRB1\*04:01 i HLA-DRB1\*04:04 povezani s težim oblikom bolesti, očekujemo postojanje povezanosti navedenih alela s opsežnijim radiološkim promjenama, lošijim funkcionalnim statusom i većom aktivnosti bolesti.

### 3. ISPITANICI I METODE

Istraživanje je provedeno od lipnja 2013. do kolovoza 2015. godine, u Kliničkom bolničkom centru Split.

#### 3.1. Ispitanici

U istraživanje su uključeni oboljeli od RA s područja SDŽ u dobi 18 i više godina.

Zemljopisno, SDŽ je najveća hrvatska županija s ukupnom površinom od 14 106,40 km<sup>2</sup>. Nalazi se u južnoj Hrvatskoj, u središnjem dijelu jadranske obale. Prema popisu stanovništva iz 2011. godine, SDŽ ima 363 499 stanovnika u dobi od 18 i više godina. Županija je podijeljena u tri zemljopisne podcjeline: Zagora (78 131 stanovnika  $\geq 18$  godina), priobalje (259 883 stanovnika  $\geq 18$  godina) i otoci (25 485 stanovnika  $\geq 18$  godina). Zagora je zaleđe obalnog pojasa. Čine ju područja u okolici Sinja, Vrlike, Imotskog i Vrgorca. Sinjska krajina ima 35 422 stanovnika  $\geq 18$  godina, a ostatak Zagore ima 42 709 stanovnika  $\geq 18$  godina.

Sinjska krajina obuhvaća područje dalmatinske Zagore, istočno od Drniške krajine, nizvodno Cetinom od Vrličke krajine. Istočna granica Sinjske krajine su Imotska krajina i Omiška krajina, južno su Poljica i Dugopolje. Sinjska krajina obuhvaća područja upravnih jedinica grada Sinja i Trilja te općina Dicmo, Otok i Hrvace.

U istraživanje o prevalenciji RA u SDŽ uključeno je 869 oboljelih od RA s područja SDŽ u dobi 18 i više godina. Od toga je 78 oboljelih od RA koji žive i porijeklom su iz Sinjske krajine te 729 oboljelih od RA koji žive u ostalim područjima SDŽ i nisu porijeklom iz SK. Ostali koji su uključeni u istraživanje su oboljeli od RA koji žive u SK, a nisu porijeklom iz SK (n=16) i oboljeli od RA koji žive u ostalim područjima SDŽ, a porijeklom su iz SK (n=46).

Ispitivanu skupinu čine 74 oboljela od RA, s prebivalištem u Sinjskoj krajini i porijeklom s područja Sinjske krajine jer 4 pacijenta oboljela od RA s područja Sinjske krajine nisu bila voljna sudjelovati u daljnjem istraživanju.

Kontrolnu skupinu čine 74 oboljela od RA s područja SDŽ, izuzev područja SK, koji nisu niti porijeklom iz SK. S obzirom na veliki broj pacijenata kontrolne skupine (n=729), potreban uzorak izabran je metodom zatvorene kuverte. Podatci svih pacijenata kontrolne skupine koji su se podudarali po spolu, dobi i dužini trajanja bolesti s pojedinim pacijentom ispitivane

skupine stavljeni su u zatvorene kuverte. Nasumičnim izvlačenjem kuverti odabrani su pacijenti kontrolne skupine pri čemu je svaki pojedinac imao jednaku šansu za odabir u ispitivanje.

Ispitivana skupina oboljelih od RA iz Sinjske krajine i kontrolna skupina oboljelih od RA iz ostatka Splitsko-dalmatinske županije uspoređivana je s kontrolnom skupinom zdravih ispitanika u učestalosti alela HLA-DRB1 gena. Kontrolna skupina sastoji se od 80 zdravih ispitanika koji su se podudarali s ispitivanom skupinom po dobi, spolu, prebivalištu i porijeklu.

Iz istraživanja su isključeni pacijenti koji ne žive u SDŽ i koji uz RA imaju druge upalne reumatske bolesti (Sjögrenov sindrom, sistemska sklerozu, sistemski eritemski lupus, miješanu bolest vezivnog tkiva).

### **3.1.1. Opis istraživane populacije**

Osim klinički primjećene zanimljivosti veće učestalosti težih oblika RA u oboljelih s područja Sinjske krajine, populacija navedenog područja vrlo je pogodna za genetička istraživanja. Povijest današnjeg stanovništva Sinjske krajine započinje masovnom seobom franjevacu iz samostana u Rami i pretežno Hrvata iz Srednje Bosne krajem 17. stoljeća, koji su naselili opustošenu Cetinsku krajinu i došli na područje brisane tradicije i dali joj njezin današnji etnički lik. Sinjski franjevci i cetinski puk s kraja 17. i početka 18. stoljeća koji se nalaze u demografskoj okosnici današnjeg Sinja i Sinjske krajine, nemaju gotovo nijedne poveznice s cetinskim franjevcima i ljudima srednjovjekovnog vremena u cetinskom kraju. Veže ih tek vjerska pripadnost. Riječ je, naime, o sasvim drugim ljudima na istom području, ljudima potpuno drukčijega dijalekta, mentaliteta i prošlosti. U novijoj povijesti nije bilo većih demografskih promjena (152). Stoga bi klinički primjećena pojavnost težih oblika bolesti u oboljelih s područja Sinjske krajine vrlo lako mogla imati uporište u navedenim demografskim obilježjima i mogućoj jedinstvenoj genetskoj slici tamošnjeg pučanstva.

## **3.2. Metode**

Svi ispitanici su prije uključivanja u istraživanje bili upoznati sa sadržajem istraživanja te su dobrovoljno potpisali Informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju. Provođenje istraživanja odobrilo je Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Split.

### **3.2.1. Upitnik**

Podatci o oboljelima od RA u SDŽ prikupljeni su iz individualne medicinske dokumentacije specijalističko-konzilijarne i bolničke djelatnosti KBC Split te anketnim upitnikom za obilježja koja nisu sadržana u medicinskoj dokumentaciji. Za oboljele od RA koji se liječe u drugim zdravstvenim ustanovama u Republici Hrvatskoj, telefonski su prikupljeni njihovi kontakt podatci od liječnika obiteljske medicine SDŽ, a potom su po osobnom dogovoru sa svakim od njih obavljani: uvid u medicinsku dokumentaciju, klinički pregled i standardizirani intervju. Dijagnoza RA je potvrđena od strane reumatologa, prema revidiranim klasifikacijskim kriterijima za RA Američkog reumatološkog društva iz 1987. godine i/ili prema kriterijima Američkog reumatološkog društva i Europske lige za borbu protiv reumatizma iz 2010. godine. Nakon pregleda reumatologa, ispitanici su ispunili demografsko – epidemiološki upitnik (Prilog 1).

### **3.2.2. Procjena aktivnosti bolesti**

Za procjenu aktivnost bolesti korišten je DAS28 indeks koji uključuje procjenu otečenosti i bolnosti 28 zglobova (Prilog 2), sedimentaciju nakon 1 sat izraženu u mm, bolesnikovu procjenu aktivnosti bolesti koja se mjeri na vizualnoj analognoj skali od 100 mm (VAS, izraženu u mm). Vrijednost DAS28 indeksa dobijena je prema slijedećoj formuli:

$$\text{DAS28(SE)} = 0,56 \times \sqrt{(\text{broj otečenih zglobova})} + 0,28 \times \sqrt{(\text{broj bolnih zglobova})} + 0,7 \times \ln(\text{SE}) + 0,0142 \times \text{VAS}.$$

Svi navedeni parametri uvršteni su u kalkulator za brzi izračun DAS28. Visokom aktivnosti bolesti smatra se DAS28 vrijednosti  $>5,1$ ; vrijednost  $<3,2$  znak je slabe aktivnosti bolesti; vrijednost između 3,2 i 5,1 smatra se umjerenom aktivnost bolesti; dok vrijednost  $<2,6$  predstavlja remisiju bolesti. Klinički značajnim smatra se poboljšanje DAS vrijednosti za najmanje 0,6 (153).

### **3.2.3. Procjena funkcionalnog statusa**

Ispunjavanjem Upitnika za procjenu funkcionalne sposobnosti (engl. *Health Assessment Questionnaire disability indeks; HAQ-DI*) procijenjen je utjecaj RA na funkcionalnu sposobnost ispitanika (Prilog 3). Upitnik sadrži 20 pitanja podijeljenih u osam kategorija koje predstavljaju svakodnevne radnje u prethodnih tjedan dana (oblačenje, ustajanje, hranjenje, hodanje, higijena, dohvaćanje, hvatanje i uobičajene aktivnosti). Za svako pitanje odgovori se ocjenjuju na ljestvici 0-3. Nula znači da ispitanik radnju može obaviti bez ikakvih teškoća; 1 da radnju može obaviti s nešto teškoća; 2 s puno teškoća; 3 znači da je nesposoban za obavljanje radnje. Iz svake od 8 kategorija uzima se odgovor s najvišom ocjenom koji se zatim zbroje i podjele s brojem kategorija. Ukupna vrijednost indeksa za procjenu funkcionalne sposobnosti izražava se u rasponu 0-3. Vrijednost HAQ-Di indeksa 0-1 izražava blagu do umjerenu nesposobnost, 1-2 umjerenu do težu i 2-3 govori o teškoj do vrlo teškoj nesposobnosti (154).

### **3.2.4. Radiološka dijagnostika**

Ispitanici su upućeni na radiološko snimanje šaka i stopala, a specijalist radiologije je ocijenio stupanj strukturnih promjena prema Larsenu. Prvi stupanj označava male promjene, drugi stupanj prema Larsenu označava definitivne rane promjene, erozije i suženje zglobnog prostora, treći stupanj označava srednje velike destruktivne promjene, četvrti stupanj označava jake destruktivne promjene, a peti stupanj mutilirajuće promjene (140). Svaki proksimalni interfalangealni zglob i svaki metakarpofalangealni zglob šake ocjenjuje se ocjenom od 0 do 5, a ručni zglob ocjenom od 0 do 25 (osnovni skor se pomnoži s 5). Tako se dobije maksimalni iznos od 150 bodova za obje šake i ručne zglobove. Svaki metatarzofalangealni zglob stopala ocjenjuje se ocjenom od 0 do 5, čime se za oba stopala dobiva ukupni skor od 50 bodova. Sveukupni Larsenov skor može iznositi od 0 do 200 bodova. Što je veći broj bodova veće je strukturno oštećenje zglobova (Prilog 4).

### **3.2.5. Laboratorijski testovi**

U jutarnjim satima uzeta je venepunkcijom krv iz kubitalne vene za određivanje sedimentacije, C-reaktivnog proteina, RF, anti-CCP-a i alela HLA-DRB1 gena. Za određivanje sedimentacije uzeto je 1,6 ml venske krvi u epruvetu s podtlakom u kojoj se

nalazi 0,4 ml Na-citrata (129 mmol/L). U drugu epruvetu s podtlakom uzeto je 7 ml krvi, zatim je u laboratoriju odvojen serum i određen CRP, RF i anti- CCP. U još dvije epruvete s podtlakom uzeto je po 5 ml venske krvi za određivanje alela HLA-DRB1 gena.

C-reaktivni protein određen je imunoturbidimetrijskom metodom na česticama lateksa koristeći ARCHITECTcSystems (Abbott, Njemačka). Referentnim vrijednostima se smatraju one <5 mg/L.

Kvantitativno određivanje reumatoidnog faktora (RF) IgM klase usmjereno na Fc fragment vlastitog imunoglobulina IgG određeno je metodom imunoturbidimetrije koristeći AEROSET i ARCHITECTcSystem (Abbott, Španjolska). Referentni interval je 0-30 međunarodnih jedinica na ml krvi.

Antitijela na cikličke citrulinirane peptide određena su metodom elektrokemiluminiscencije (ECLIA) koristeći ARCHITECTiSystem (Abbott, Njemačka). Referentni interval je 0-2,9 jedinica/ml.

### **3.2.6. Izolacija DNA**

DNA je izolirana iz 2 ml periferne krvi ispitanika pomoću komercijalnog seta za izolaciju (*High Pure PCR Template Preparation Kit-Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany*), prema uputama koje je naveo proizvođač. Metoda se temelji na uporabi kolumni sa silikatnom membranom koja specifično veže molekule DNA. Stanice se liziraju inkubacijom uzoraka krvi s puferom za lizu i proteinazom K. Dodavanjem etanola lizatu, DNA se veže za silikatnu membranu u odgovarajućoj NukleoSpin Blood kolumni. Vežanje DNA je reverzibilno i specifično za nukleinske kiseline. Naredna dva ispiranja DNA s puferima za ispiranje uklanjaju nečistoće. Čista DNA se na kraju eluira s membrane elucijskim puferom.

### **3.2.7. Metode određivanja alela HLA-DRB1 gena**

Za određivanje alela HLA-DRB1 gena korištene su dvije metode: metoda lančane reakcije polimerazom primjenom specifičnih oligonukleotidnih proba (engl. *Polymerase Chain Reaction Sequence Specific Oligonucleotide Probe*; PCR-SSO) i metoda lančane reakcije polimerazom primjenom specifičnih početnica za određenu sekvencu DNA (engl. *Polymerase Chain Reaction Sequence Specific Primers*; PCR-SSP).

## Metoda PCR-SSO

Aleli HLA-DRB1 gena određivani su metodom PCR-SSO uz korištenje testova *Gen-Probe Lifecodes (Lifecodes HLA-DRB1 SSO Typing kit, Lifecodes HLA-DRB1 eRES SSO Typing kit; Gen-Probe Inc, Stamford, USA)* i Luminex aparata (*Luminex corporation, Austin, Tx, USA*). Metoda se temelji na klasičnom umnažanju specifičnog dijela DNA pomoću biotinom obilježenih početnica. Umnožena DNA se zatim hibridizira upotrebom mikrosfera na koje su vezane DNA probe specifične za određene oligonukleotidne sljedove. Po završetku hibridizacije reakcijskoj smjesi dodaje se fluorescentna boja SAPE (engl. *streptavidin-phycoerythrin*; SAPE) koja se veže za biotinom označeni dio DNA. Detekcija vezanosti produkta PCR na probe očitana je pomoću Luminex tehnologije (Luminex 200). Analiza rezultata hibridizacije provedena je analitičkim programom Quicktype for lifecodes (verzija 3.5.0) te komercijalnim računalnim programom MATCHIT (verzija 1.2.0).

## Metoda PCR-SSP

Metoda se temelji na umnažanju slijeda DNA upotrebom početnica specifičnih za jedan ili više alela HLA. Početnice se vežu samo za one sljedove DNA s kojima su u potpunosti komplementarne, stoga nastali amplifikoni predstavljaju specifično umnožene alele pojedinog lokusa HLA. Da bi se analizirao ciljni odsječak DNA, postojeći nukleotidni slijed mora se umnožiti u milijunskom broju kopija. Takvo ciljno umnažanje moguće je kada je poznat odsječak ciljne DNA pa se na temelju te sekvence sintetiziraju *in vitro*, početnice, dužine 20-30 pb koje s 5' i 3' kraja omeđuju ciljnu sekvencu. Za gene HLA razreda II umnaža se egzon 2. U svakoj PCR reakciji prisutni su kontrolne početnice i alel/grupno specifične početnice, pufer za odvijanje PCR reakcije, enzim Taq polimeraza i DNA ispitanika. Postupak umnažanja sastoji se od 30-35 uzastopnih ciklusa, a u svakom ciklusu 3 puta dolazi do izmjene temperature. Sve se odvija u aparatu za automatsko umnažanje (engl. *thermocycler*). Uzorci su nakon umnažanja analizirani elektroforezom na 1,5% agaroznom gelu te vizualizirani na ultravioletnom stoliću i dokumentirani fotografiranjem. Za postupak automatskog umnažanja korišteni su setovi „Olerup SSP“ (*DRB1, Olerup SSP AB, Saltsjobaden, Švedska*). Rezultati umnažanja za pojedini lokus HLA uneseni su u program za analizu (Helmberg Score 07).

### **3.2.8. Statistička analiza**

U cilju testiranja postavljenih hipoteza prikupljeni su podatci o zdravstvenim pokazateljima pacijenata s RA s područja Splitsko-dalmatinske županije. Za obradu i statističku analizu podataka korišten je statistički paket Statistica 10 (StatSoft Inc., Dell, USA).

Sve vrijednosti metričkih varijabli navedene su kao srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija. Od testova su korišteni: deskriptivna analiza, Z-test, neparametrijski Mann-Whitney U test, Fisherov egzaktni test i Hi kvadrat test. Statistički značajnom smatrana je P vrijednost  $<0,05$ .



## 4. REZULTATI

### 4.1. Opis istraživanog uzorka

Ispitivanu skupinu čine 74 oboljela od RA s područja Sinjske krajine koji su porijeklom iz Sinjske krajine.

Kontrolnu skupinu čine 74 oboljela od RA s područja ostatka Splitsko-dalmatinske županije koji nisu porijeklom iz Sinjske krajine.

Za usporedbu učestalosti alela HLA-DRB1 gena svaka skupina oboljelih od RA imala je kontrolnu skupinu od 80 zdravih ispitanika koji su se podudarali s ispitivanom skupinom po dobi, spolu, prebivalištu i porijeklu.

### 4.2. Prevalencija reumatoidnog artritisa u Splitsko-dalmatinskoj županiji

U istraživanje je bilo uključeno ukupno 869 stanovnika SDŽ oboljelih od RA, od toga 743 (85,5%) žena i 126 (14,5%) muškaraca. Porast prevalencije RA započinje u dobi od 40 do 49 godina i doseže vrhunac u dobi od 70 do 79 godina. Prevalencija RA veća je u žena (0,39%) nego u muškaraca (0,07%) što rezultira omjerom između žena i muškaraca 5,5:1 (Tablica 7).

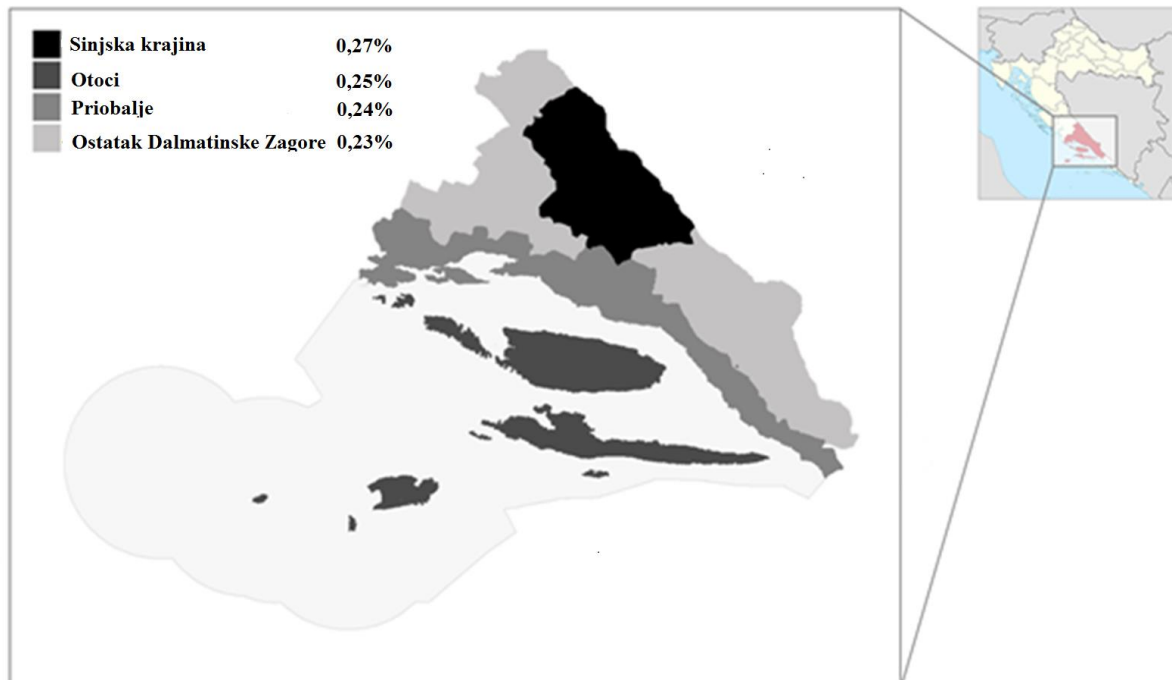
**Tablica 7.** Demografska obilježja pacijenata s RA u Splitsko-dalmatinskoj županiji i prevalencija RA po spolu i dobnim skupinama

	n	(%)	Populacija*	Prevalencija (%)
Spol				
Muškarci	126	14,5	174,873	0,07
Žene	743	85,5	188,626	0,39
Ukupno	869	100,0	363,499	0,24
Dob				
18-29	13	1,5	70,328	0,02
30-39	30	3,5	60,934	0,05
40-49	70	8,1	62,114	0,11
50-59	179	20,6	65,286	0,27
60-69	254	29,2	47,851	0,53
70-79	244	28,1	39,130	0,62
≥ 80	79	9,0	17,856	0,44

\*Samo populacija u dobi od 18 i više godina uzeta u obzir, prema popisu stanovništva RH iz 2011.

Prevalencija RA u Splitsko-dalmatinskoj županiji, u populaciji starijih od 18 godina je 0,24%, a incidencija 238/100 000 stanovnika (155).

Među regijama Splitsko-dalmatinske županije Sinjska krajina ima najveću prevalenciju od 0,27%, potom slijede otoci s 0,25%, priobalje s 0,24% i ostatak Dalmatinske Zagore s 0,23%. Razlika u prevalenciji među regijama SDŽ nije statistički značajna (Slika 4).



**Slika 4.** Prevalencija RA u regijama Splitsko-dalmatinske županije

### 4.3. Raspodjela alela HLA-DRB1 gena u ispitanika

Provedeno je istraživanje raspodjele alela HLA-DRB1 gena u oboljelih od RA s područja SK i zdrave populacije s područja SK te oboljelih od RA s područja ostatka SDŽ i zdrave populacije s područja ostatka Splitsko-dalmatinske županije. Demografska obilježja ispitivane populacije prikazana su u Tablici 8.

**Tablica 8.** Demografska obilježja pacijenata s RA i kontrolne skupine

Obilježja	Pacijenti s RA		P	Kontrolna skupina		P
	Sinjska krajina (n=74)	Ostatak SDŽ (n=74)		Sinjska krajina (n=80)	Ostatak SDŽ (n=80)	
Muškarci, n (%)	13 (17,6)	13 (17,6)	0,500	18 (22,5)	20 (25,0)	0,355
Žene, n (%)	61 (82,4)	61 (82,4)		62 (77,5)	60 (75,0)	
Omjer muškarci: žene	1 : 4,7	1 : 4,7		1 : 3,4	1 : 3,0	
Dob (godine), $\bar{X} \pm SD^*$	61,3 $\pm$ 11,5	60,8 $\pm$ 11,4	0,792	58,9 $\pm$ 10,9	57,8 $\pm$ 9,6	0,507
Dob početka bolesti (godine), $\bar{X} \pm SD$	46,6 $\pm$ 10,4	46,8 $\pm$ 10,2	0,563	–	–	–
Trajanje bolesti (godine), $\bar{X} \pm SD$	11,6 $\pm$ 6,7	13,9 $\pm$ 6,2	0,943	–	–	–

\* $\bar{X}$  – srednja vrijednost; SD – standardna devijacija

## Sinjska krajina

Raspodjela alela HLA-DRB1 gena u pacijenata s RA s područja Sinjske krajine i zdrave populacije s području Sinjske krajine prikazana je u Tablici 9.

**Tablica 9.** Raspodjela HLA-DRB1 alela u pacijenata s RA i u zdravoj populaciji s područja Sinjske krajine

Genotip HLA-DRB1	Sinjska krajina RA 2n=148		Sinjska krajina Kontrolna skupina 2n=160		P
	n	(%)	n	(%)	
DRB1 *01	17	11,5	17	10,6	0,405
DRB1 *03	18	12,3	12	7,5	0,084
DRB1 *04	27	18,2	10	6,2	<0,001
DRB1 *07	12	8,1	14	8,7	0,420
DRB1 *08	2	1,4	7	4,4	0,057
DRB1 *09	0	0,0	2	1,3	0,086
DRB1 *10	3	2,0	0	0,0	0,035
DRB1 *11	17	11,5	27	16,9	0,088
DRB1 *12	3	2,0	8	5,0	0,005
DRB1 *13	7	4,7	21	13,1	0,005
DRB1 *14	7	4,7	2	1,3	0,035
DRB1 *15	11	7,4	15	9,4	0,269
DRB1 *16	13	8,8	17	10,6	0,292
ND	11	7,4	8	5,0	0,188
SE pozitivni	54	36,4	29	18,1	<0,001
DERAA	24	16,2	48	30,0	0,002

ND – Nije definirano; SE (engl. shared epitope) – aleli zajedničkog epitopa (zbroj \*01, \*04, \*10 i \*14); DERAA – zaštitni aleli (zbroj \*11 i \*13)

U pacijenata s RA s područja Sinjske krajine učestalost alela HLA-DRB1\*04 značajno je viša nego u kontrolnoj skupini (18,2% vs 6,2%;  $P<0,001$ ). Nasuprot tome alel HLA-DRB1\*13 značajno je više zastupljen u kontrolnoj skupini nego u oboljelih od RA (13,1% vs 4,7%;  $P=0,005$ ). U usporedbi s kontrolnom skupinom učestalost alela zajedničkog epitopa (SE pozitivni) značajno je viša u pacijenata s RA (36,4% vs 18,1%;  $P<0,001$ ). Nije bilo statistički značajne razlike u učestalosti alela HLA-DRB1\*01 među oboljelima od RA i zdravim ispitanicima s područja Sinjske krajine (11,5% vs 10,6%;  $P=0,405$ ).

### ***Ostatak SDŽ***

Raspodjela alela HLA-DRB1 gena u pacijenata s RA s područja ostatka SDŽ i zdrave populacije s područja ostatka SDŽ prikazana je u Tablici 10.

**Tablica 10.** Raspodjela HLA-DRB1 alela u pacijenata s RA i u zdravoj populaciji s područja ostatka SDŽ

Genotip HLA-DRB1	Ostatak SDŽ RA 2n=148		Ostatak SDŽ Kontrolna skupina 2n=160		P
	n	(%)	n	(%)	
DRB1 *01	24	16,2	12	7,5	<0,001
DRB1 *03	12	8,1	9	5,6	0,194
DRB1 *04	14	9,5	12	7,5	0,268
DRB1 *07	7	4,7	15	9,4	0,057
DRB1 *08	7	4,7	6	3,7	0,335
DRB1 *09	2	1,4	1	0,6	0,260
DRB1 *10	2	1,4	1	0,6	0,260
DRB1 *11	14	9,4	29	18,1	0,014
DRB1 *12	1	0,7	5	3,1	0,060
DRB1 *13	11	7,4	19	11,9	0,094
DRB1 *14	5	3,4	3	1,9	0,204
DRB1 *15	24	16,2	14	8,7	0,023
DRB1 *16	17	11,5	23	14,4	0,226
ND	8	5,4	11	6,9	0,296
SE pozitivni	45	30,5	28	17,5	0,004
DERAA	25	16,8	48	30,0	0,003

ND – Nije definirano; SE (engl. shared epitope) – aleli zajedničkog epitopa (zbroj \*01, \*04, \*10 i \*14); DERAA – zaštitni aleli (zbroj \*11 i \*13)

U pacijenata s RA s područja ostatka SDŽ učestalost alela HLA-DRB1\*01 i HLA-DRB1\*15 značajno je viša nego u kontrolnoj skupini (16,2% vs 7,5%;  $P < 0,001$  i 16,2% vs 8,7%;  $P = 0,023$ ). Nasuprot tome učestalost alela HLA-DRB1\*11 značajno je viša u kontrolnoj skupini (18,1% vs 9,4%;  $P = 0,014$ ). U usporedbi s kontrolnom skupinom učestalost alela zajedničkog epitopa (SE pozitivni) značajno je viša u pacijenata s reumatoidnim artitisom (30,5% vs 17,5%;  $P = 0,004$ ). Nije utvrđena statistički značajna razlika u učestalosti alela HLA-DRB1\*04 između oboljelih od RA i zdravih ispitanika s područja ostatka SDŽ (9,5% vs 7,5%;  $P = 0,268$ ).

U pacijenata s RA s područja SK učestalost alela HLA-DRB1\*04 značajno je viša nego u pacijenata s RA s područja ostatka SDŽ (18,2% vs 9,5%; P=0,014). Alel HLA-DRB1\*15 značajno je više zastupljen u pacijenata s RA s područja ostatka SDŽ nego u pacijenata s područja SK (16,2% vs 7,4%; P=0,010). Nije utvrđena razlika u učestalosti HLA-DRB1\*01 alela između oboljelih (P=0,119). Navedeni rezultati prikazani su u Tablici 11.

**Tablica 11.** Raspodjela HLA-DRB1 alela u pacijenata s RA s područja SK i ostatka SDŽ

Genotip HLA-DRB1	Sinjska krajina RA 2n=148		Ostatak SDŽ RA 2n=148		P
	n	(%)	n	(%)	
	DRB1 *01	17	11,5	24	
DRB1 *03	18	12,3	12	8,1	0,124
DRB1 *04	27	18,2	14	9,5	0,014
DRB1 *07	12	8,1	7	4,7	0,118
DRB1 *08	2	1,4	7	4,7	0,045
DRB1 *09	0	0,0	2	1,4	0,078
DRB1 *10	3	2,0	2	1,4	0,325
DRB1 *11	17	11,5	14	9,4	0,284
DRB1 *12	3	2,0	1	0,7	0,158
DRB1 *13	7	4,7	11	7,4	0,166
DRB1 *14	7	4,7	5	3,4	0,278
DRB1 *15	11	7,4	24	16,2	0,010
DRB1 *16	13	8,8	17	11,5	0,220
ND	11	7,4	8	5,4	0,239
SE pozitivni	54	36,4	45	30,5	0,134
DERAA	24	16,2	25	16,8	0,438

ND – Nije definirano; SE (engl. shared epitope) – aleli zajedničkog epitopa (zbroj \*01, \*04, \*10 i \*14); DERAA – zaštitni aleli (zbroj \*11 i \*13)

#### 4.4. Klinička obilježja pacijenata s reumatoidnim artritisom

Provedeno je određivanje i usporedba titra protutijela (RF i anti-CCP), reaktanata akutne faze (Sedimentacije i CRP), kliničke aktivnosti bolesti (DAS28), funkcionalnog statusa (HAQ-Di) i stupnja radioloških promjena (Larsen) u pacijenata s RA s područja SK i pacijenata s RA s područja ostatka SDŽ i sve navedeno prikazano je u Tablici 12.

**Tablica 12.** Klinička obilježja pacijenata s RA

Obilježja	Sinjska krajina (n=74)	Ostatak SDŽ (n=74)	P
Sedimentacija eritrocita (mm/h), $\bar{X} \pm SD^*$	33,460 $\pm$ 18,84	30,108 $\pm$ 10,02	0,168
CRP (mg/L), $\bar{X} \pm SD$	18,462 $\pm$ 13,07	12,124 $\pm$ 7,63	0,004
RF (IU/ml), $\bar{X} \pm SD$	112,742 $\pm$ 159,60	87,493 $\pm$ 144,42	0,235
RF pozitivni pacijenti, n (%)	47 (63,5)	43 (58,1)	0,251
Anti-CCP (U/ml), $\bar{X} \pm SD$	146,064 $\pm$ 211,32	65,693 $\pm$ 94,70	0,013
Anti-CCP pozitivni pacijenti, n (%)	56 (75,7)	48 (64,9)	0,075
RF i anti-CCP pozitivni pacijenti, n (%)	43 (58,1)	36 (48,6)	0,124
DAS28, $\bar{X} \pm SD$	5,213 $\pm$ 0,88	4,597 $\pm$ 0,757	<0,001
DAS28, n (%)			
Slaba aktivnost bolesti ( $\leq 3,2$ )	1 (1,4)	2 (2,7)	0,093
Umjerena aktivnost bolesti (3,2-5,1)	30 (40,5)	33 (44,6)	0,309
Jaka aktivnost bolesti ( $\geq 5,1$ )	43 (58,1)	39 (52,7)	0,254
HAQ-Di, $\bar{X} \pm SD$	1,727 $\pm$ 0,54	1,388 $\pm$ 0,52	<0,001
HAQ-Di, n (%)			
Blaga do umjerena nesposobnost (0-1)	11 (14,9)	16 (21,6)	0,144
Umjerena do teža nesposobnost (1-2)	34 (45,9)	42 (56,8)	0,094
Teža do vrlo teška nesposobnost (2-3)	29 (39,2)	16 (21,6)	0,010
Larsen, $\bar{X} \pm SD$	76,838 $\pm$ 32,95	65,527 $\pm$ 23,675	0,053

\* $\bar{X} \pm SD$  – srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija; CRP – C-reaktivni protein; RF – reumatoidni faktor; anti-CCP – anticitrulinska protutijela; DAS28 (engl. Disease Activity Score) – indeks aktivnosti bolesti; HAQ-Di (engl. Health Assessment Questionnaire disability indeks) – indeks funkcionalne sposobnosti

C-reaktivni protein značajno je viši u pacijenata s područja SK nego iz ostatka SDŽ (18,462  $\pm$  13,07 vs 12,124  $\pm$  7,63; P=0,004) kao i vrijednost indeksa DAS28 (5,213  $\pm$  0,88 vs 4,597  $\pm$

0,757;  $P < 0,001$ ). Srednja vrijednost HAQ-Di indeksa značajno je viša u pacijenata s područja SK nego u pacijenata s područja ostatka SDŽ ( $1,727 \pm 0,54$  vs  $1,388 \pm 0,52$ ;  $P < 0,001$ ). Značajno veći udio pacijenata s područja SK ima teži do vrlo teški stupanj funkcionalne nesposobnosti (39,19% vs 21,62%;  $P = 0,010$ ).

Od 74 pacijenta s RA s područja Sinjske krajine njih 47 (63,51%) su RF pozitivni, dok su anti-CCP protutijela prisutna u 56 (75,68%) pacijenata. U 43 (58,11%) pacijenta s područja ostatka SDŽ pronađen je povišen titar RF, dok 48 (64,86%) pacijenata ima povišen titar anti-CCP protutijela. Titar anti-CCP protutijela značajno je viši u pacijenata s RA s područja SK nego u pacijenata s područja ostatka SDŽ ( $P = 0,013$ ).

U obje skupine oboljelih veći je udio seropozitivnih nego seronegativnih pacijenata, što je prikazano u Tablici 13.

**Tablica 13.** Prikaz seropozitivnih i seronegativnih pacijenata s RA u SK i ostatku SDŽ

Obilježja	Sinjska krajina (n=74)		Ostatak SDŽ (n=74)	
RF (IU/ml)				
Negativan, n (%)	27	36,49	31	41,89
Pozitivan, n (%)	47	63,51	43	58,11
P vrijednost	<0,001		0,024	
Anti-CCP (U/ml)				
Negativan, n (%)	18	24,32	26	35,13
Pozitivan, n (%)	56	75,68	48	64,87
P vrijednost	<0,001		<0,001	

RF – reumatoidni faktor; anti-CCP – anticitrulinska protutijela



#### 4.5. Povezanost alela HLA-DRB1 gena i težine bolesti

Provedeno je istraživanje povezanosti alela HLA-DRB1 gena s titrom specifičnih protutijela, kliničkom aktivnosti bolesti, funkcionalnim statusom i radiološkim oštećenjem u oboljelih od RA s područja SK i oboljelih od RA s područja ostatka SDŽ.

Za ispitivanje povezanosti alela HLA-DRB1 gena i navedenih parametara pacijenti su podijeljeni u dvije skupine. U skupini SE pozitivni su svi pacijenti koji su nositelji jedne ili dvije kopije alela zajedničkog epitopa (SE/X i SE/SE) dok su u skupini SE negativni svi pacijenti koji nisu nositelji alela zajedničkog epitopa (X/X), što je prikazano u Tablici 14.

**Tablica 14.** Raspodjela alela zajedničkog epitopa u pacijenata s RA i kontrolnoj skupini

	Ispitivana skupina		Kontrolna skupina		P
	n=74	(%)	n=80	(%)	
Sinjska krajina					
SE/SE	10	13,5	2	2,5	0,005
SE/X	34	45,9	24	30,0	0,020
X/X	30	40,6	54	67,5	<0,001
Ostatak SDŽ					
SE/SE	1	1,3	1	1,3	0,487
SE/X	43	58,1	26	32,5	<0,001
X/X	30	40,6	53	66,2	<0,001

SE (engl. shared epitope) – nositelji alela zajedničkog epitopa; X – pacijenti koji nisu nositelji alela zajedničkog epitopa

Iz tablice raspodjele učestalosti alela zajedničkog epitopa može se uočiti da od ukupno 74 pacijenta s područja SK i 74 pacijenta s područja ostatka SDŽ njih 44 (59,4%) nositelji su jednog ili dva alela zajedničkog epitopa. Razlika je vidljiva u raspodjeli SE alela. Deset (13,5%) pacijenata s RA s područja SK nositelji su dva alela zajedničkog epitopa dok je samo jedan pacijent (1,3%) s područja ostatka SDŽ nositelj dva SE alela ( $P=0,002$ ).

Među nositeljima dva alela zajedničkog epitopa s područja SK nema homozigota. Šest pacijenata su HLA-DRB1\*01:01/\*04:04 heterozigoti, jedan je HLA-DRB1\*04:04/\*10 heterozigot, jedan je HLA-DRB1\*04:04/\*14 heterozigot, dva su HLA-DRB1\*04:01/\*14 heterozigoti i jedan je HLA-DRB1\*04:05/\*14 heterozigot. Pacijent s područja ostatka SDŽ je HLA-DRB1\*01:01/\*04:04 heterozigot.

Usporedba povezanosti HLA-DRB1 alela zajedničkog epitopa i protutijela u populaciji oboljelih od RA prikazana je u Tablici 15 te na Slikama 5 i 6.

**Tablica 15.** Povezanost HLA-DRB1 alela zajedničkog epitopa i protutijela (anti-CCP i RF) u pacijenata s RA

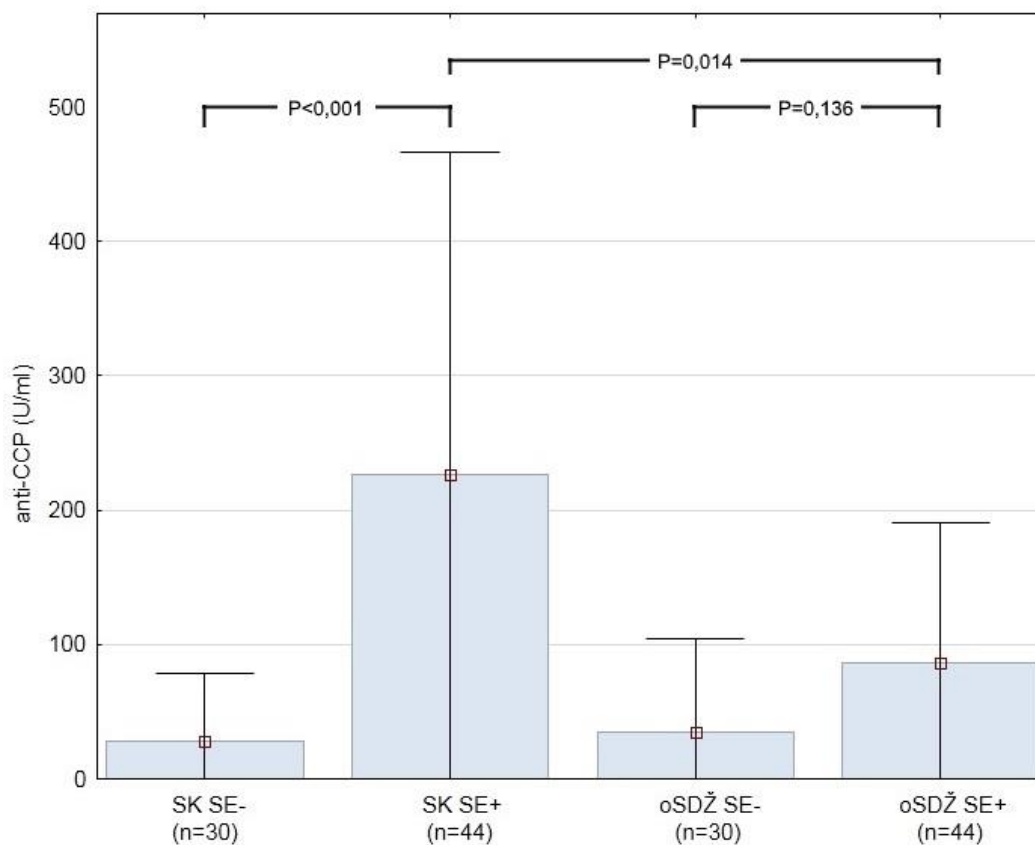
SE status	Sinjska krajina		P	Ostatok SDŽ		P	P*
	SE + (n=44)	SE – (n=30)		SE + (n=44)	SE – (n=30)		
Anti-CCP+, n (%)	40 (90,9)	16 (53,3)	<0,001	32 (72,7)	16 (53,3)	0,136	0,014
Anti-CCP–, n (%)	4 (9,1)	14 (46,7)		12 (27,3)	14 (46,7)		
RF +, n (%)	35 (79,5)	12 (40,0)	0,001	26 (59,1)	17 (56,7)	1,000	0,004
RF –, n (%)	9 (20,5)	18 (60,0)		18 (40,9)	13 (43,3)		

SE + (engl. shared epitope) – nositelji alela zajedničkog epitopa; SE –, pacijenti koji nisu nositelji alela zajedničkog epitopa; RF – reumatoidni faktor; anti-CCP – anticitrulinska protutijela

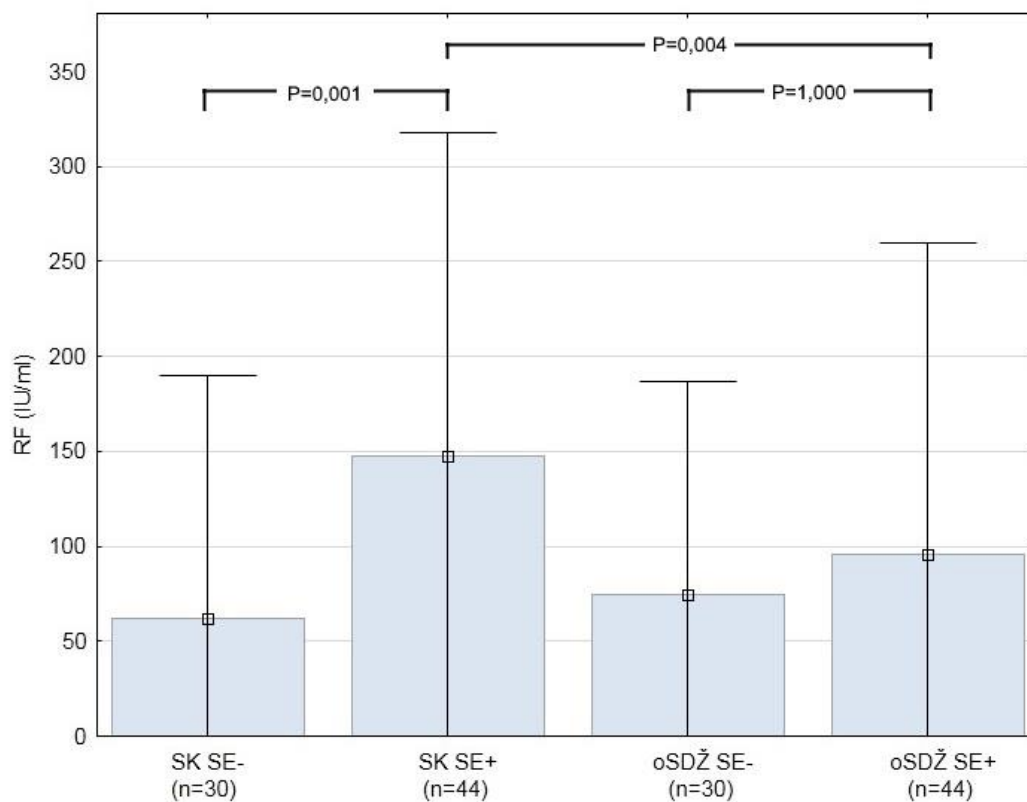
\*Statistička značajnost razlika između SE pozitivnih pacijenata SK i ostatka SDŽ

Ukupno 90,9% pacijenata s RA s područja SK koji su nositelji alela zajedničkog epitopa imaju povišene vrijednosti anti-CCP, dok 53,3% SE negativnih pacijenata ima povišene vrijednosti anti-CCP ( $P < 0,001$ ). U ostatku SDŽ 72,7% SE pozitivnih i 53,3% SE negativnih pacijenata ima povišene vrijednosti anti-CCP protutijela ( $P = 0,136$ ). Nadalje, SE pozitivni pacijenti s područja SK imaju češće povišenu vrijednost anti-CCP u odnosu na SE pozitivne pacijente s područja ostatka SDŽ ( $P = 0,014$ ).

Povišene vrijednosti RF ima 35 (79,5%) SE pozitivnih i 12 (40,0%) SE negativnih pacijenata s područja SK ( $P = 0,001$ ). U ostatku SDŽ povišene vrijednosti RF ima 26 (59,1%) SE pozitivnih i 17 (56,7%) SE negativnih pacijenata ( $P = 1,00$ ). SE pozitivni pacijenti s područja SK imaju češće povišene vrijednosti RF u odnosu na SE pozitivne pacijente s područja ostatka SDŽ ( $P = 0,004$ ).



**Slika 5.** Povezanost HLA-DRB1 alela zajedničkog epitopa i anti-CCP protutijela u pacijenata s RA. anti-CCP – anticitrulinska protutijela; SK – Sinjska krajina; oSDŽ – ostatak Splitsko-dalmatinske županije; SE + (engl. shared epitope) – nositelji alela zajedničkog epitopa; SE –, pacijenti koji nisu nositelji alela zajedničkog epitopa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.



**Slika 6.** Povezanost HLA-DRB1 alela zajedničkog epitopa i RF u pacijenata s RA.

RF – reumatoidni faktor; SK – Sinjska krajina; oSDŽ – ostatak Splitsko-dalmatinske županije; SE + (engl. shared epitope) – nositelji alela zajedničkog epitopa; SE –, pacijenti koji nisu nositelji alela zajedničkog epitopa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

Povezanost HLA-DRB1 alela zajedničkog epitopa i aktivnosti bolesti mjerene DAS28 indeksom u pacijenata s RA prikazana je u Tablici 16 i na Slici 7.

**Tablica 16.** Povezanost HLA-DRB1 alela zajedničkog epitopa i DAS28 indeksa u pacijenata s RA

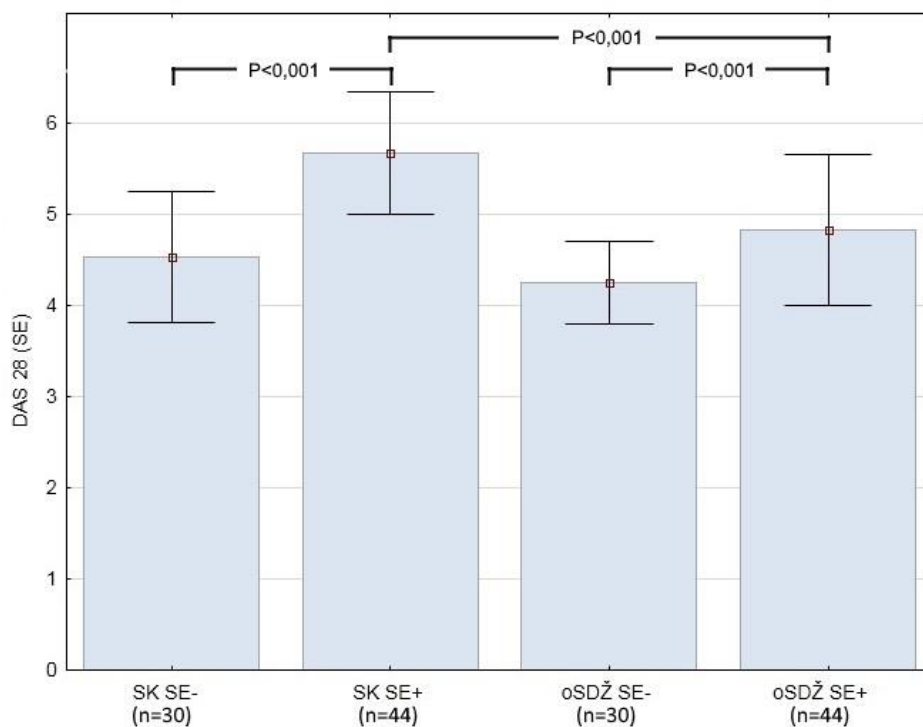
SE status	Sinjska krajina		P	Ostatak SDŽ		P	P*
	SE + (n=44)	SE – (n=29)†		SE + (n=43)†	SE – (n=29)†		
DAS28 aktivnost							
Umjerena, n (%)	7 (15,9)	23 (79,3)	<0,001	18 (41,9)	28 (96,5)	<0,001	0,043
Jaka, n (%)	37 (84,1)	6 (20,7)		25 (58,1)	1 (3,5)		

SE + (engl. shared epitope) – nositelji alela zajedničkog epitopa; SE –, pacijenti koji nisu nositelji alela zajedničkog epitopa; DAS28 – indeks aktivnosti bolesti

\*Statistička značajnost razlika između SE pozitivnih pacijenata SK i ostatka SDŽ

†Iz analize isključen jedan pacijent sa slabom aktivnosti bolesti

Jaka aktivnost bolesti, mjerena DAS28 indeksom, značajno je učestalija u SE pozitivnih pacijenata u odnosu na SE negativne pacijente s područja SK i s područja ostatka SDŽ ( $P < 0,001$ ;  $P < 0,001$ ). Nadalje, SE pozitivni pacijenti (84,1%) s područja SK češće imaju jaču aktivnost bolesti u odnosu na SE pozitivne pacijente (58,1%) s područja ostatka SDŽ ( $P = 0,043$ ).



**Slika 7.** Povezanost HLA-DRB1 alela zajedničkog epitopa i vrijednosti DAS28 indeksa u pacijenata s RA. DAS28 – indeks aktivnosti bolesti; SK – Sinjska krajina; oSDŽ – ostatak Splitsko-dalmatinske županije; SE + (engl. shared epitope) – nositelji alela zajedničkog epitopa; SE –, pacijenti koji nisu nositelji alela zajedničkog epitopa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

Promatrajući povezanost SE statusa i ocjene HAQ-Di indeksa kojim se procjenjuje funkcionalni status pacijenata može se uočiti da 25 SE pozitivnih pacijenata (56,8%) s područja SK ima teži do vrlo teški stupanj funkcionalne nesposobnosti kao što je prikazano u Tablici 17.

Ukupno 23 SE pozitivna pacijenta (52,3%) s područja ostatka SDŽ imaju umjereni do teži stupanj funkcionalne nesposobnosti. Teži do vrlo teški stupanj funkcionalne nesposobnosti češći je u SE pozitivnih pacijenata s područja SK nego u SE pozitivnih pacijenata s područja ostatka SDŽ (56,8% vs 18,2%;  $P < 0,001$ ).

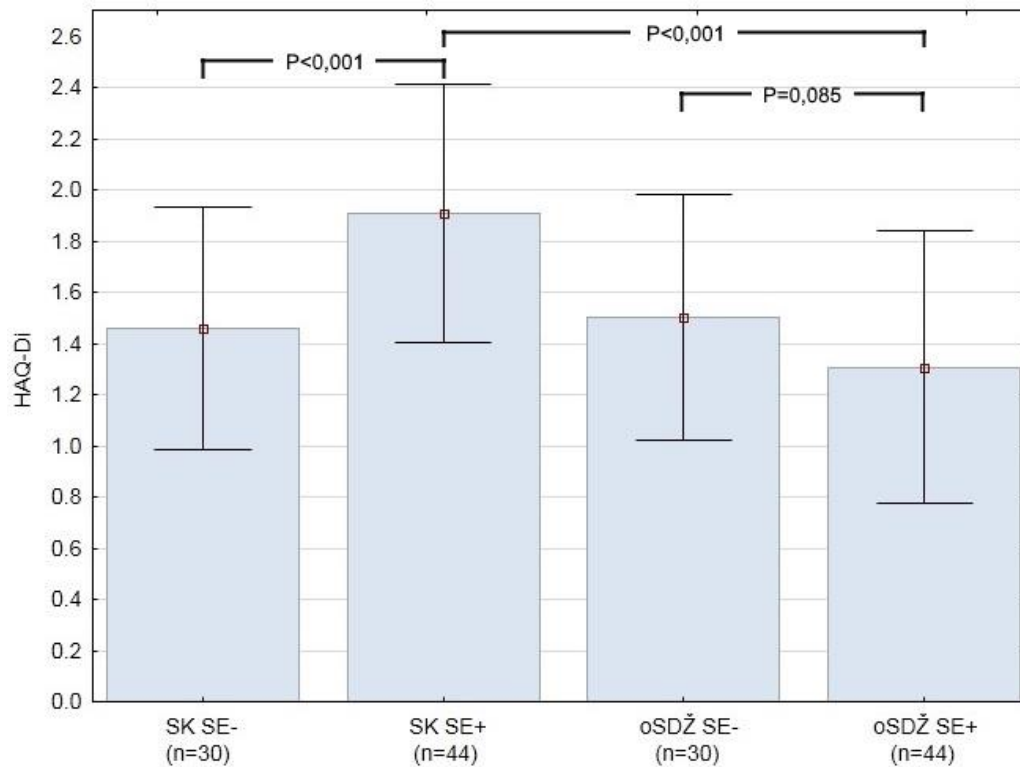
**Tablica 17.** Povezanost HLA-DRB1 alela zajedničkog epitopa i HAQ-Di indeksa u pacijenata s RA

SE status	Sinjska krajina		Ostatak SDŽ		P*
	SE + (n=44)	SE – (n=30)	SE + (n=44)	SE – (n=30)	
HAQ-Di nesposobnost					
Blaga-umjereni, n (%)	4 (9,1)	7 (23,3)	13 (29,5)	3 (10,0)	0,007
Umjereni-teži, n (%)	15 (34,1)	19 (63,3)	23 (52,3)	19 (63,3)	0,042
Teži-vrlo teži, n (%)	25 (56,8)	4 (13,4)	8 (18,2)	8 (26,7)	<0,001

SE + (engl. shared epitope) – nositelji alela zajedničkog epitopa; SE –, pacijenti koji nisu nositelji alela zajedničkog epitopa; HAQ-Di – indeks funkcionalne sposobnosti

\*Statistička značajnost razlika između SE pozitivnih pacijenata SK i ostatka SDŽ

Povezanost HLA-DRB1 alela zajedničkog epitopa i vrijednosti HAQ-Di indeksa u pacijenata s RA prikazana je na Slici 8.



**Slika 8.** Povezanost HLA-DRB1 alela zajedničkog epitopa i vrijednosti HAQ-Di indeksa u pacijenata s RA. HAQ-Di – indeks funkcionalne sposobnosti; SK – Sinjska krajina; oSDŽ – ostatak Splitsko-dalmatinske županije; SE + (engl. shared epitope) – nositelji alela zajedničkog epitopa; SE –, pacijenti koji nisu nositelji alela zajedničkog epitopa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.



U Tablici 18 i na Slici 9 prikazana je povezanost HLA-DRB1 alela zajedničkog epitopa i stupnja radioloških promjena prema Larsenu u oboljelih od RA.

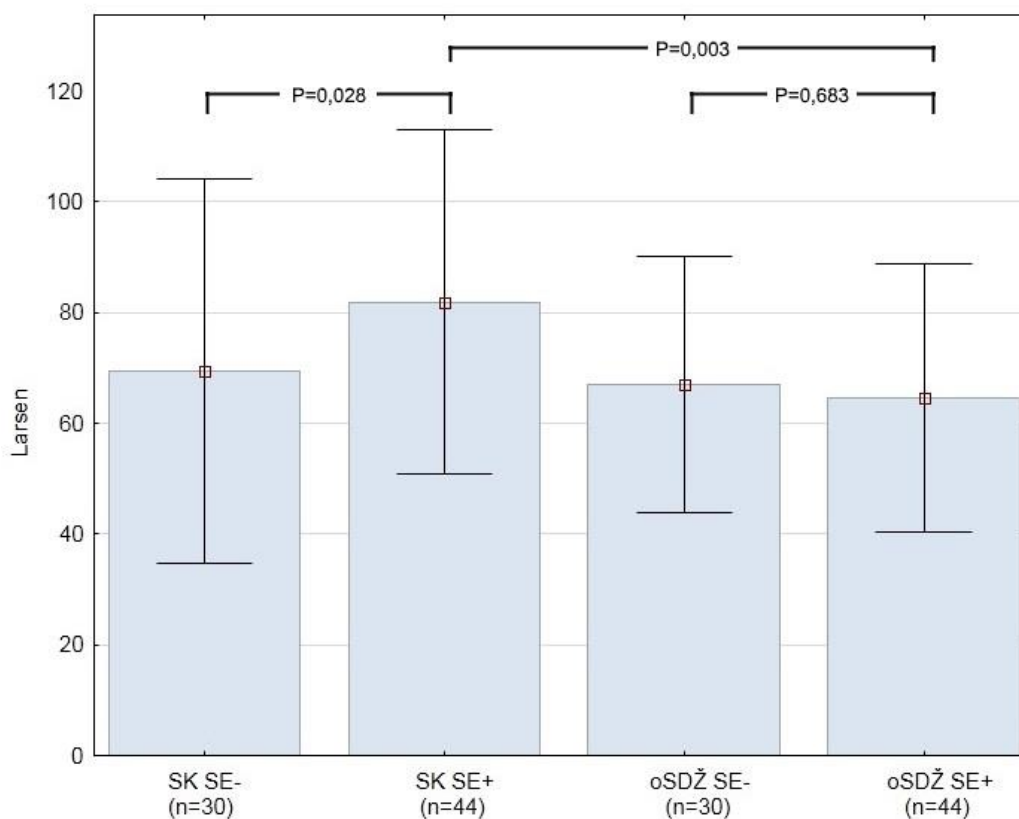
**Tablica 18.** Povezanost HLA-DRB1 alela zajedničkog epitopa i Larsena u pacijenata s RA

	Sinjska krajina		Ostatak SDŽ		P*
	SE + (n=44)		SE + (n=44)		
	vs		vs		
	SE – (n=30)		SE – (n=30)		
	Z	P	Z	P	
Larsen	2,19	0,028	0,40	0,683	0,003

SE + (engl. shared epitope) – nositelji alela zajedničkog epitopa; SE –, pacijenti koji nisu nositelji alela zajedničkog epitopa

\*Statistička značajnost razlika između SE pozitivnih pacijenata SK i ostatka SDŽ

SE pozitivni pacijenti s RA s područja SK imaju značajno veći stupanj radioloških promjena od SE negativnih pacijenta (P=0,028). Nije utvrđena statistički značajna razlika u vrijednosti Larsen skora između SE pozitivnih i SE negativnih pacijenata s RA s područja ostatka SDŽ (P=0,683). Nadalje, SE pozitivni pacijenti s područja SK imaju izraženije radiološke promjene od SE pozitivnih pacijenata s RA s područja ostatka SDŽ (P=0,003).



**Slika 9.** Povezanost HLA-DRB1 alela zajedničkog epitopa i Larsena u pacijenata s RA.

SK – Sinjska krajina; oSDŽ – ostatak Splitsko-dalmatinske županije; SE + (engl. shared epitope) – nositelji alela zajedničkog epitopa; SE –, pacijenti koji nisu nositelji alela zajedničkog epitopa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija.

#### 4.6. Pušenje, anti-CCP i SE status

Ukupno 44,59% pacijenata s RA s područja SK i 32,43% pacijenata s područja SDŽ su pušači. Nije uvrđena značajna razlika u zastupljenosti pušača između RA pacijenata s područja SK i SDŽ. U SE pozitivnih pacijenata s područja SK nije utvrđena značajna razlika u zastupljenosti pušača (n=21) u odnosu na nepušače (n=23) (P=0,319). Utvrđena je značajno veća zastupljenost nepušača (n=28) u odnosu na pušače (n=16) u SE pozitivnih pacijenata s područja SDŽ (P=0,005). Nije dokazana značajna razlika u zastupljenosti pušača između SE pozitivnih pacijenata s područja SK i ostatka SDŽ (P=0,141).

U istraživanju povezanosti pušenja, anti-CCP i SE statusa nije dokazana značajna razlika u titru anti-CCP protutijela između SE pozitivnih pušača i nepušača s područja SK (P=1,000),

dok SE pozitivni pušači s područja SDŽ imaju značajno viši titar anti-CCP protutijela od SE pozitivnih nepušača (P=0,001).

#### 4.7. Raspodjela podtipova HLA-DRB1\*04 alela

Provedena je analiza podtipova HLA-DRB1\*04 alela u pacijenata s RA s područja SK i s područja ostatka SDŽ te kontrolnih skupina. Rezultati su prikazani u Tablici 19.

Nije utvrđena statistički značajna razlika u ekspresiji podtipova alela HLA-DRB1\*04 između pacijenata s RA i kontrolne skupine. Alel HLA-DRB1\*04:01 najučestaliji je alel u pacijenata s RA s područja SK (63,0%) i u pacijenata s područja ostatka SDŽ (76,9%). Iako veći broj pacijenata s područja SK ima HLA-DRB1\*04:01 i \*04:04 alele ta razlika u odnosu na pacijente s područja ostatka SDŽ nije statistički značajna (P=0,191; P=0,167).

**Tablica 19.** Učestalost podtipova alela HLA-DRB1\*04 u pacijenata s RA i kontrolnoj skupini

HLA-DRB1*04 podtipovi	Sinjska krajina		P	Ostatak SDŽ		P	P*
	RA (n=27)	Kontrolna skupina (n=8)		RA (n=13)	Kontrolna skupina (n=11)		
DRB1*04:01†	17 (63,0)	5 (62,5)	0,489	10 (76,9)	6 (54,5)	0,123	0,191
DRB1*04:04†	8 (29,6)	3 (37,5)	0,336	2 (15,4)	5 (45,5)	0,053	0,167
DRB1*04:05†	2 (7,4)	0 (0,0)	0,214	1 (7,7)	0 (0,0)	0,173	0,487

†Rezultati su prikazani kao apsolutna brojčana vrijednost (n) i postotak n(%)

\*Statistička značajnost razlika između pacijenata SK i ostatka SDŽ

#### 4.8. Povezanost alela HLA-DRB1\*04:01 i \*04:04 i težine bolesti

U ispitivanju povezanosti podtipova HLA-DRB1\*04 alela s protutijelima (RF i anti-CCP), aktivnosti bolesti (DAS28), funkcionalnim statusom (HAQ-Di) i stupnjem radioloških promjena (Larsen), zbog male veličine uzorka koja je onemogućavala adekvatnu analizu podataka, testiranje je rađeno sa zbrojem podtipova alela HLA-DRB1\*04:01 i HLA-DRB1\*04:04.

Rezultati Mann-Whitney U testa koji prikazuju povezanost navedenih alela i parametara u pacijenata s RA s područja SK prikazani su u Tablici 20.

**Tablica 20.** Povezanosti alela HLA-DRB1\*04:01 i \*04:04 s protutijelima (RF i anti-CCP), aktivnosti bolesti (DAS28), funkcionalnim statusom (HAQ-Di) i stupnjem radiološkog oštećenja (Larsen) u pacijenata s područja Sinjske krajine

Sinjska krajina	aleli*04:01 i *04:04 (n=16)†		aleli*04:01 i *04:04 (n=16)†	
	vs ostali SE + aleli (n=18)†		vs SE – aleli (n=30)	
	Z	P	Z	P
RF (IU/ml)	1,94	0,051	3,50	<0,001
anti-CCP (U/ml)	2,96	0,003	5,02	<0,001
DAS28	3,26	0,001	4,83	<0,001
HAQ-Di	3,57	<0,001	4,12	<0,001
Larsen	1,32	0,184	2,12	0,033

SE + (engl. shared epitope) – nositelji alela zajedničkog epitopa; SE –, pacijenti koji nisu nositelji alela zajedničkog epitopa; RF – reumatoidni faktor; anti-CCP – anticitrulinska protutijela; DAS-28 – indeks aktivnosti bolesti; HAQ-Di – indeks funkcionalne sposobnosti

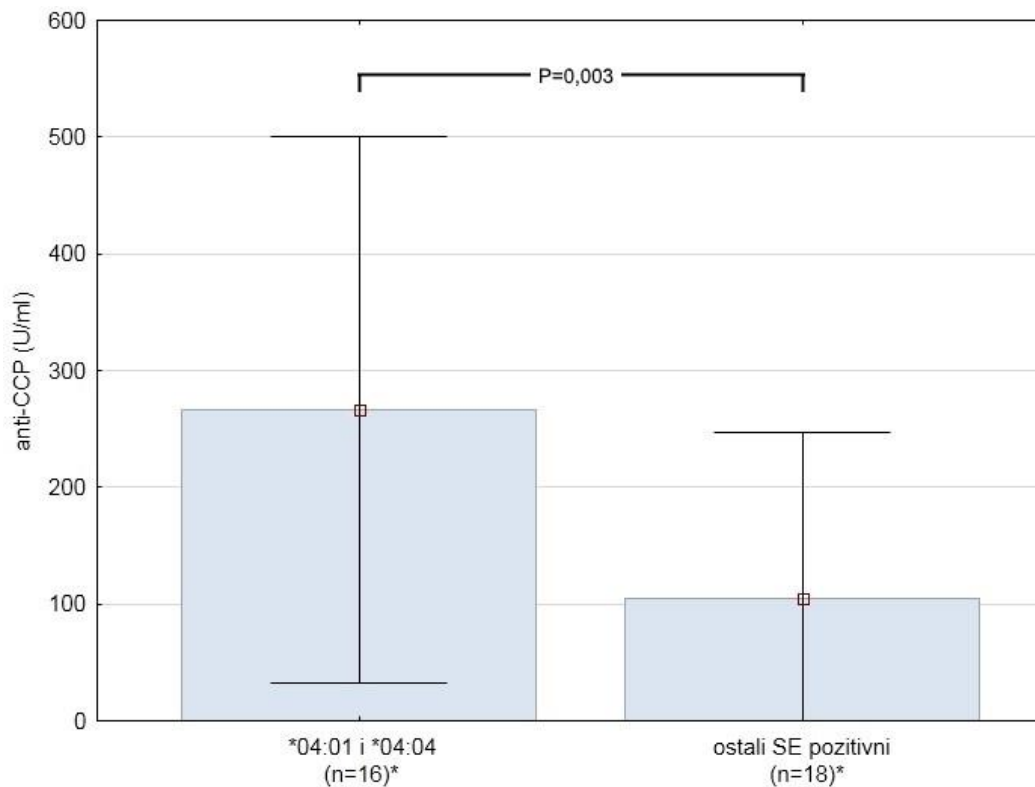
†Iz testiranja isključeni pacijenti nositelji dva SE pozitivna alela

Pacijenti s područja SK koji su nositelji alela HLA-DRB1\*04:01 i HLA-DRB1\*04:04 imaju veću vrijednost anti-CCP-a (P=0,003), veću aktivnost bolesti mjerenu DAS28 indeksom (P=0,001) i veći stupanj funkcionalne nesposobnosti mjerene HAQ-Di indeksom (P<0,001) u odnosu na pacijente koji su nositelji ostalih alela zajedničkog epitopa.

Pacijenti s područja SK koji su nositelji alela HLA-DRB1\*04:01 i HLA-DRB1\*04:04 imaju veću vrijednost RF (P<0,001), anti-CCP-a (P<0,001), veću aktivnost bolesti mjerenu DAS28 indeksom (P<0,001), veći stupanj funkcionalne nesposobnosti mjerene HAQ-Di indeksom

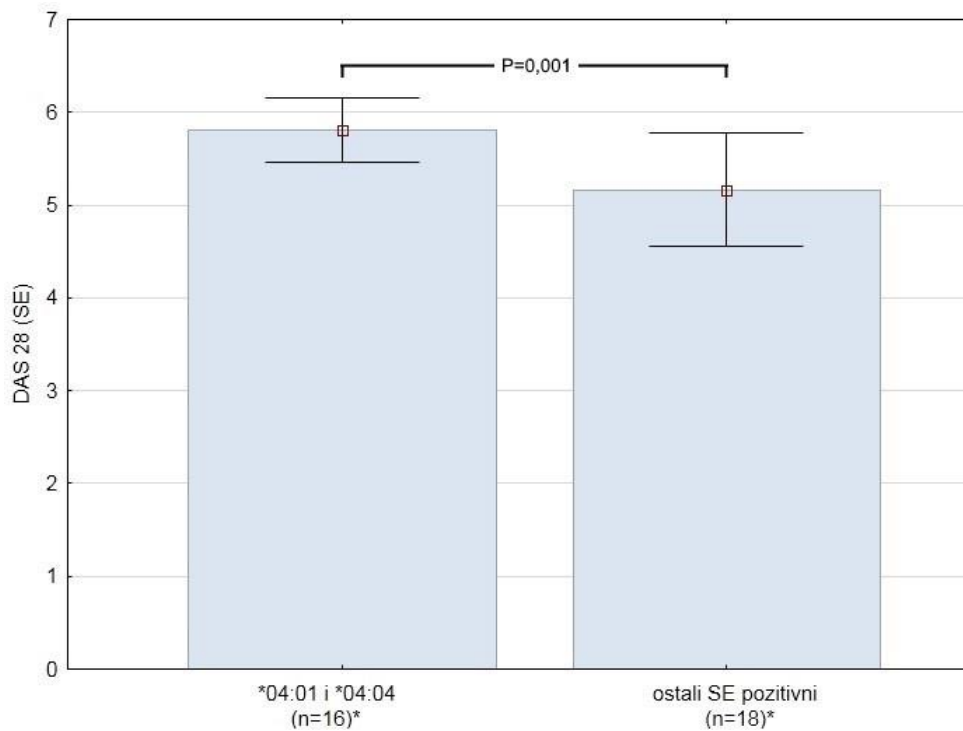
( $P < 0,001$ ) i teži stupanj radiološkog oštećenja prema Larsenu ( $P = 0,033$ ) u odnosu na pacijente koji su nositelji SE negativnih alela.

Na Slikama 10, 11 i 12 prikazana je povezanost alela HLA-DRB1\*04:01 i \*04:04 s titrom anti-CCP protutijela, DAS 28 i HAQ-Di indeksom u pacijenata s područja SK.

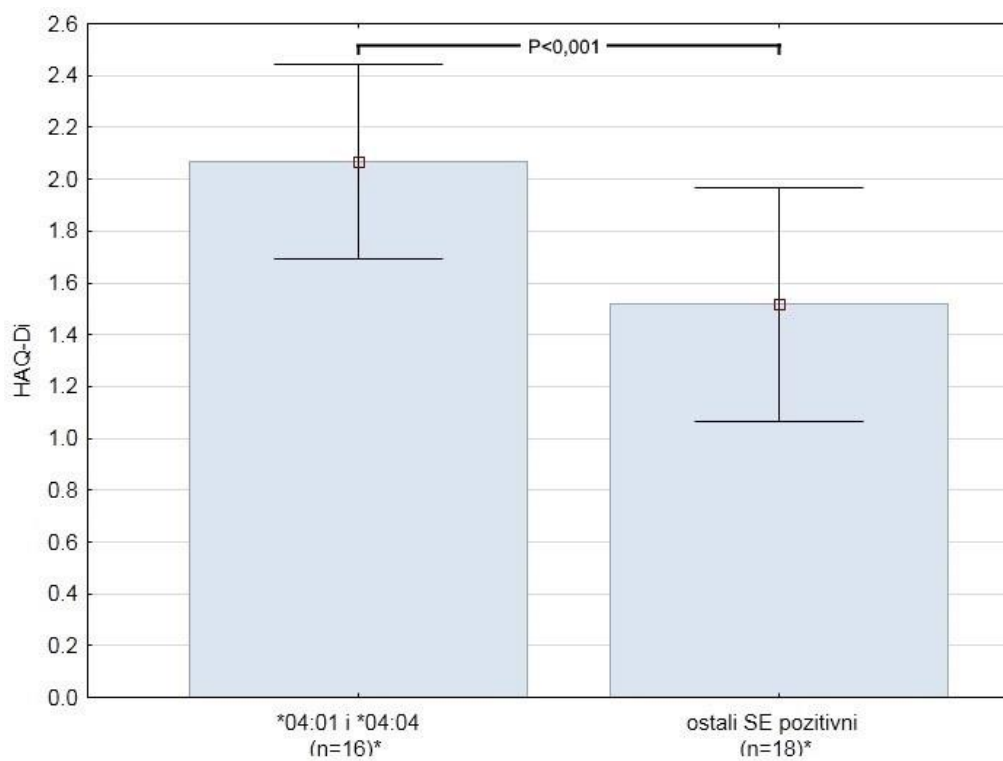


**Slika 10.** Titar anti-CCP protutijela uspoređen Mann-Whitney U testom između HLA-DRB1\*04:01 i \*04:04 pozitivnih pacijenata i ostalih SE pozitivnih pacijenata s područja Sinjske krajine.

anti-CCP – anticitrulinska protutijela; SE (engl. shared epitope) – nositelji alela zajedničkog epitopa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. \*Iz testiranja isključeni pacijenti nositelji dva SE pozitivna alela.



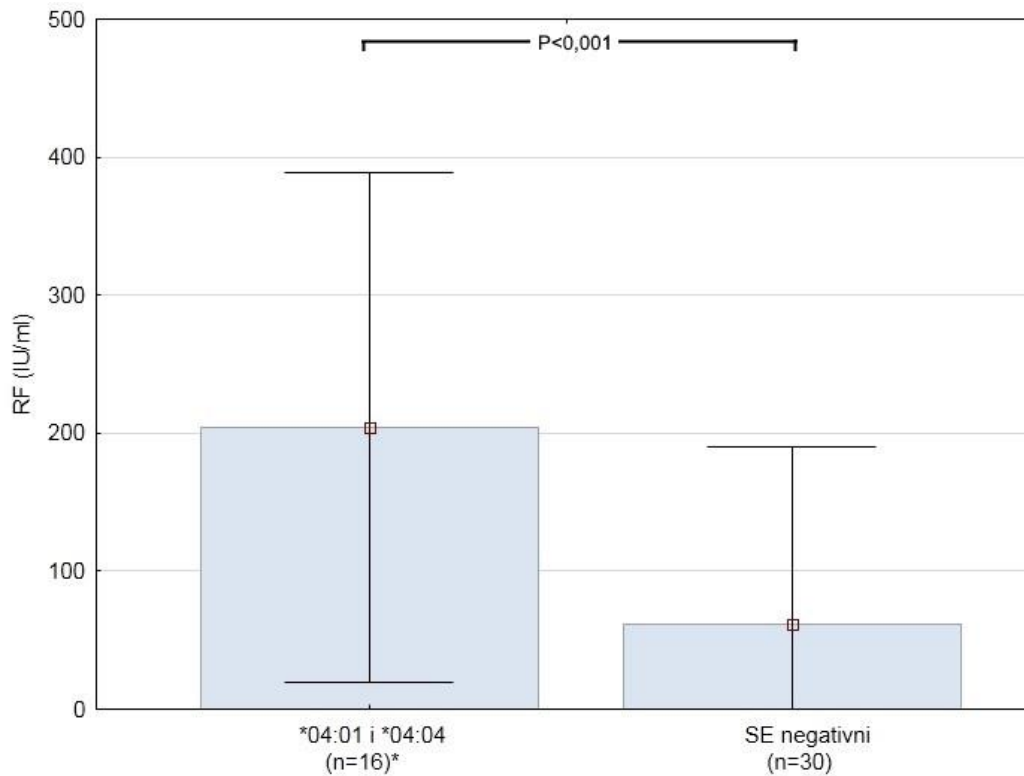
**Slika 11.** Vrijednost DAS28 indeksa uspoređena Mann-Whitney U testom između HLA-DRB1\*04:01 i \*04:04 pozitivnih pacijenata i ostalih SE pozitivnih pacijenata s područja Sinjske krajine. DAS-28 – indeks aktivnosti bolesti; SE (engl. shared epitope) – nositelji alela zajedničkog epitopa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. \*Iz testiranja isključeni pacijenti nositelji dva SE pozitivna alela.



**Slika 12.** Stupanj funkcionalne sposobnosti uspoređen Mann-Whitney U testom između HLA-DRB1\*04:01 i \*04:04 pozitivnih pacijenata i ostalih SE pozitivnih pacijenata s područja Sinjske krajine. HAQ–Di – indeks funkcionalne sposobnosti; SE (engl. shared epitope) – nositelji alela zajedničkog epitopa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

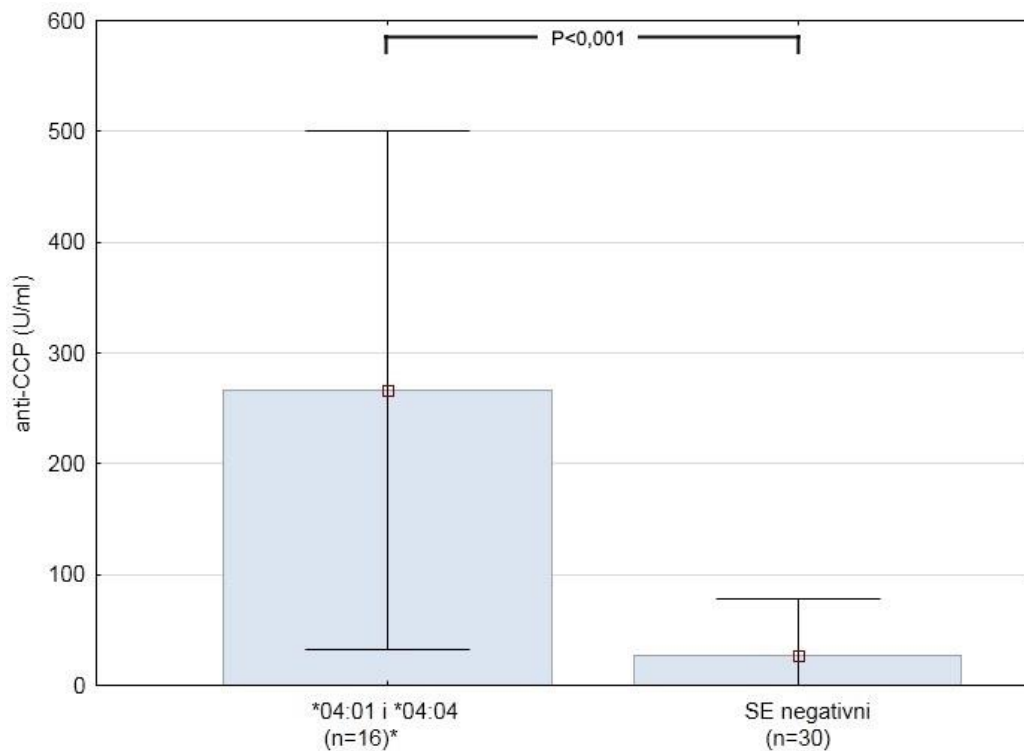
\*Iz testiranja isključeni pacijenti nositelji dva SE pozitivna alela.

Slike 13, 14, 15, 16 i 17 prikazuju povezanost alela HLA-DRB1\*04:01 i \*04:04 s titrom RF, anti-CCP protutijela, DAS 28, HAQ-Di indeksom i Larsenom u odnosu na SE negativne alele u pacijenata s područja SK.



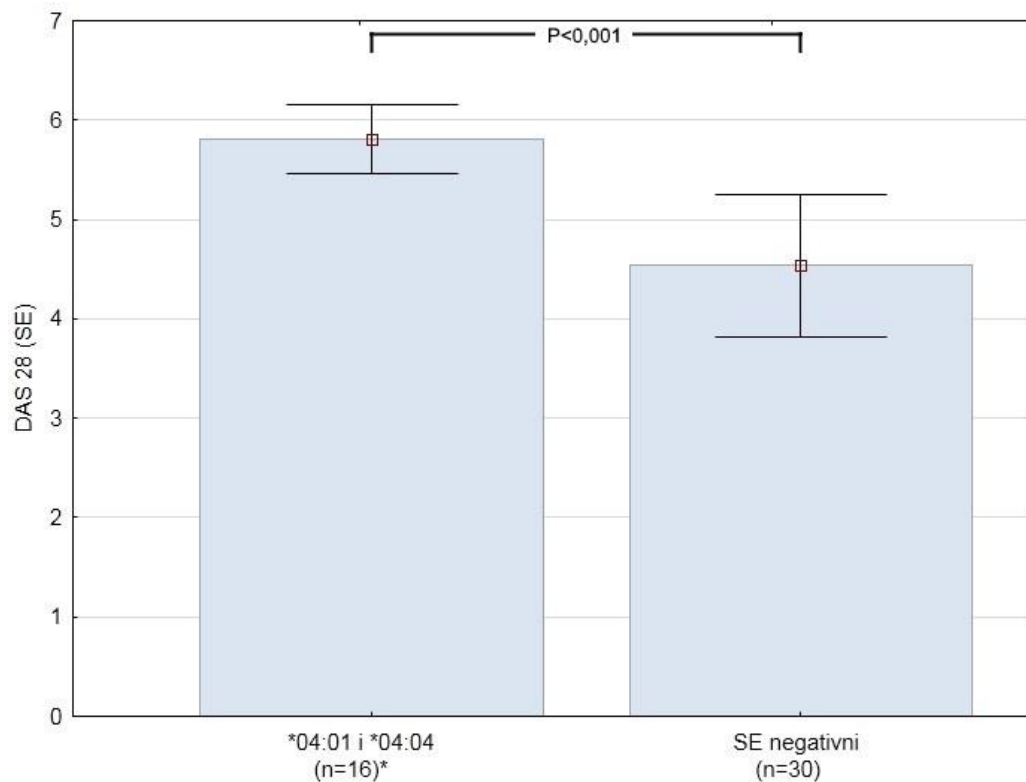
**Slika 13.** Titar RF uspoređen Mann-Whitney U testom između HLA-DRB1\*04:01 i \*04:04 pozitivnih pacijenata i SE negativnih pacijenata s područja Sinjske krajine. RF – reumatoidni faktor; SE negativni (engl. shared epitope) – pacijenti koji nisu nositelji alela zajedničkog epitopa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. \*Iz testiranja isključeni pacijenti nositelji dva SE pozitivna alela.



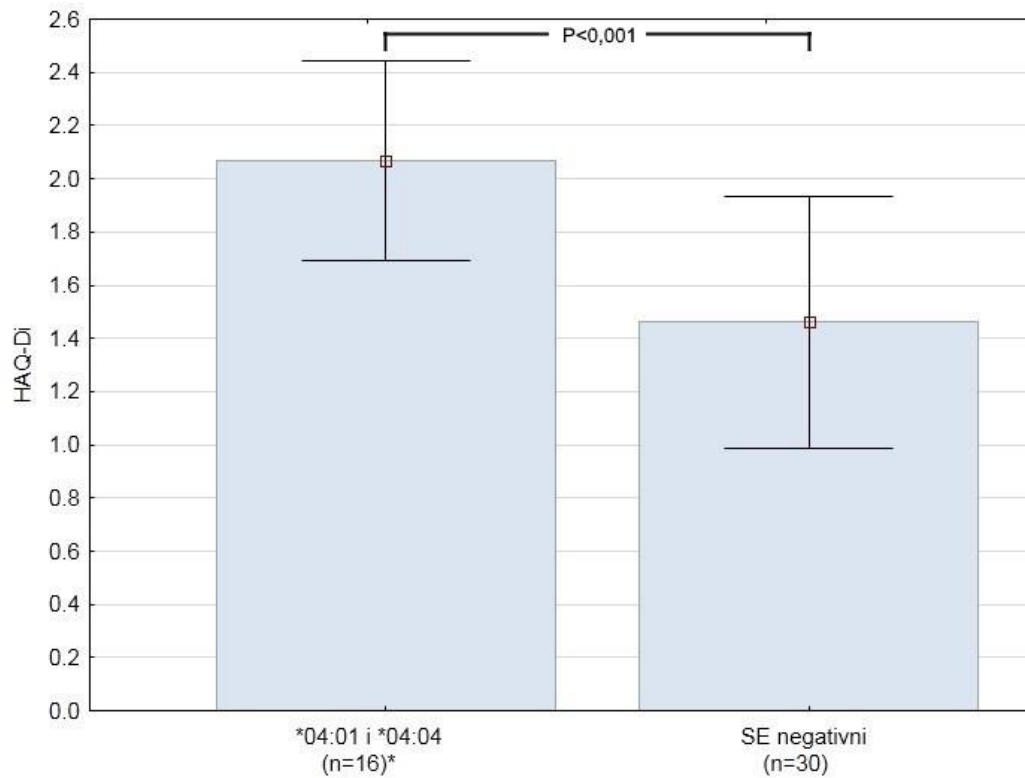


**Slika 14.** Titar anti-CCP protutijela uspoređen Mann-Whitney U testom između HLA-DRB1\*04:01 i \*04:04 pozitivnih pacijenata i SE negativnih pacijenata s područja Sinjske krajine. anti-CCP – anticitrulinska protutijela; SE negativni (engl. shared epitope) – pacijenti koji nisu nositelji alela zajedničkog epitopa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija.

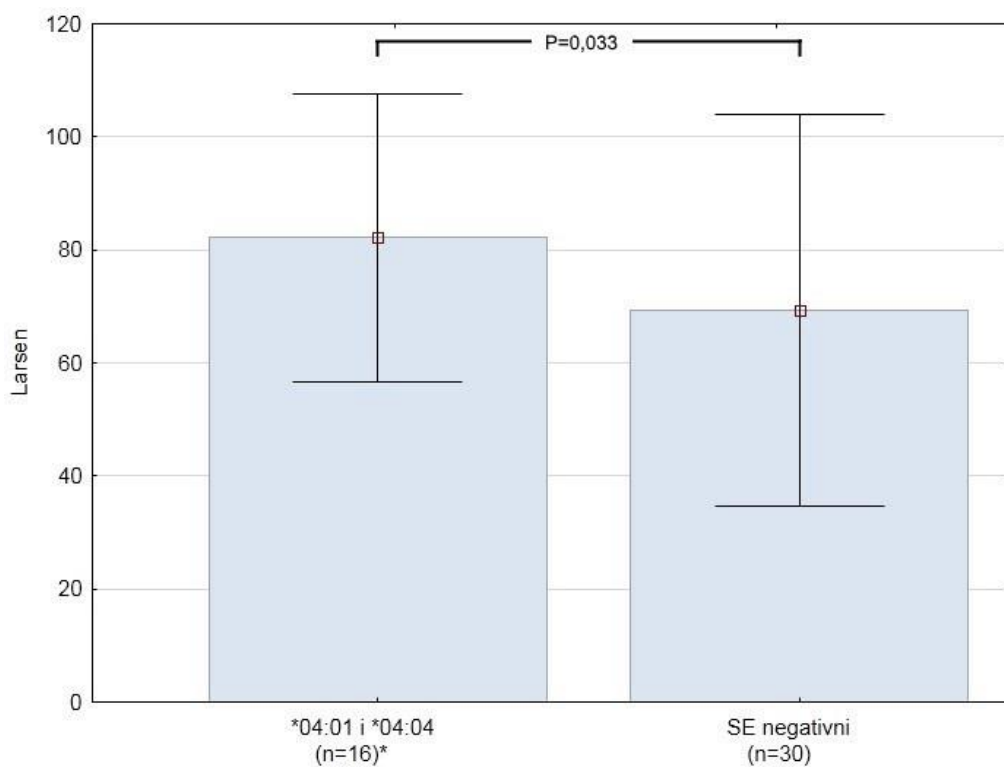
\*Iz testiranja isključeni pacijenti nositelji dva SE pozitivna alela.



**Slika 15.** Vrijednost DAS28 indeksa uspoređena Mann-Whitney U testom između HLA-DRB1\*04:01 i \*04:04 pozitivnih pacijenata i SE negativnih pacijenata s područja Sinjske krajine. DAS-28 – indeks aktivnosti bolesti; SE negativni (engl. shared epitope) – pacijenti koji nisu nositelji alela zajedničkog epitopa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. \*Iz testiranja isključeni pacijenti nositelji dva SE pozitivna alela.



**Slika 16.** Stupanj funkcionalne sposobnosti uspoređen Mann-Whitney U testom između HLA-DRB1\*04:01 i \*04:04 pozitivnih pacijenata i SE negativnih pacijenata s područja Sinjske krajine. HAQ-Di – indeks funkcionalne sposobnosti; SE negativni (engl. shared epitope) – pacijenti koji nisu nositelji alela zajedničkog epitopa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. \*Iz testiranja isključeni pacijenti nositelji dva SE pozitivna alela.



**Slika 17.** Stupanj radioloških promjena prema Larsenu uspoređen Mann-Whitney U testom između HLA-DRB1\*04:01 i \*04:04 pozitivnih pacijenata i SE negativnih pacijenata s područja Sinjske krajine. SE negativni (engl. shared epitope) – pacijenti koji nisu nositelji alela zajedničkog epitopa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standarna devijacija. \*Iz testiranja isključeni pacijenti nositelji dva SE pozitivna alela.

Rezultati Mann-Whitney U testa koji prikazuju povezanost alela HLA-DRB1\*04:01 i \*04:04 i kliničkih obilježja bolesti u pacijenata s RA s područja SDŽ prikazani su u Tablici 21.

**Tablica 21.** Povezanosti alela HLA-DRB1\*04:01 i \*04:04 s protutijelima (RF i anti-CCP), aktivnosti bolesti (DAS28), funkcionalnim statusom (HAQ-Di) i stupnjem radiološkog oštećenja (Larsen) u pacijenata s područja ostatka SDŽ

Ostatak SDŽ	aleli*04:01 i *04:04 (n=11)†		aleli*04:01 i *04:04 (n=11)†	
	vs ostali SE + aleli (n=32)†		vs SE – aleli (n=30)	
	Z	P	Z	P
RF (IU/ml)	0,00	1,000	0,11	0,906
anti-CCP (U/ml)	2,07	0,038	3,48	<0,001
DAS28	3,68	<0,001	4,78	<0,001
HAQ-Di	2,49	0,012	0,55	0,576
Larsen	0,04	0,966	0,27	0,779

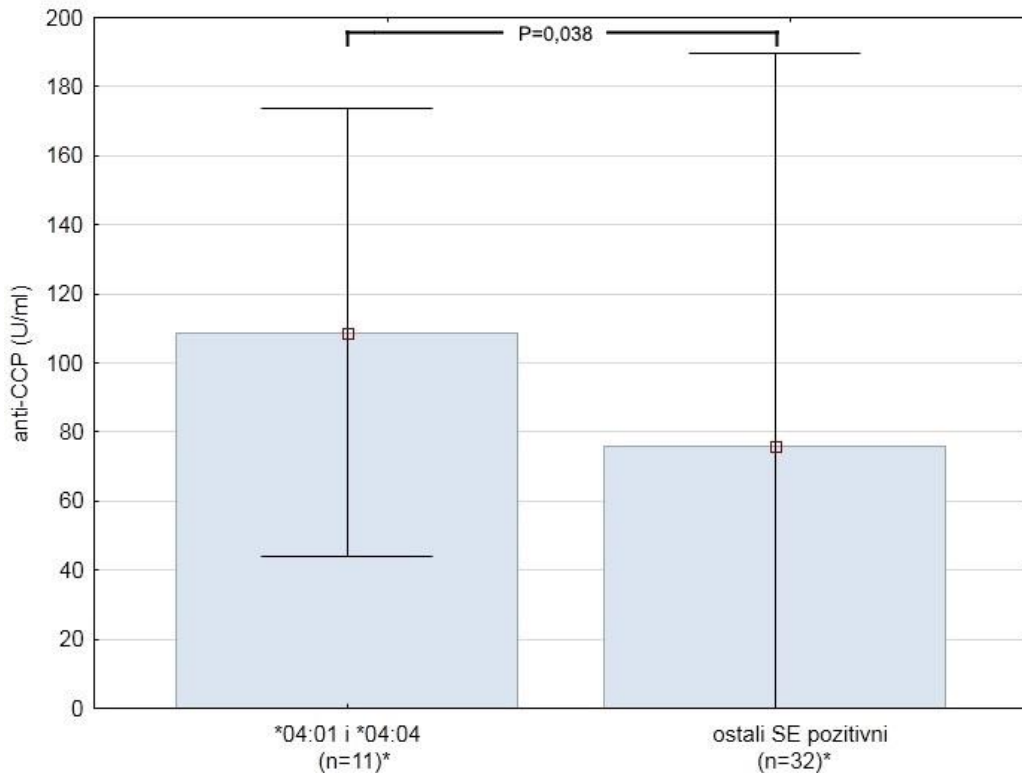
SE + (engl. shared epitope) – nositelji alela zajedničkog epitopa; SE –, pacijenti koji nisu nositelji alela zajedničkog epitopa; RF – reumatoidni faktor; anti-CCP – anticitrulinska protutijela; DAS-28 – indeks aktivnosti bolesti; HAQ-Di – indeks funkcionalne sposobnosti

†Iz testiranja isključeni pacijenti nositelji dva SE pozitivna alela

Pacijenti s područja ostatka SDŽ koji su nositelji alela HLA-DRB1\*04:01 i HLA-DRB1\*04:04 imaju veću vrijednost anti-CCP-a ( $P=0,038$ ), veću aktivnost bolesti mjerenu DAS28 indeksom ( $P<0,001$ ), veći stupanj funkcionalne nesposobnosti mjerene HAQ-Di indeksom ( $P<0,012$ ) u odnosu na pacijente koji su nositelji ostalih alela zajedničkog epitopa.

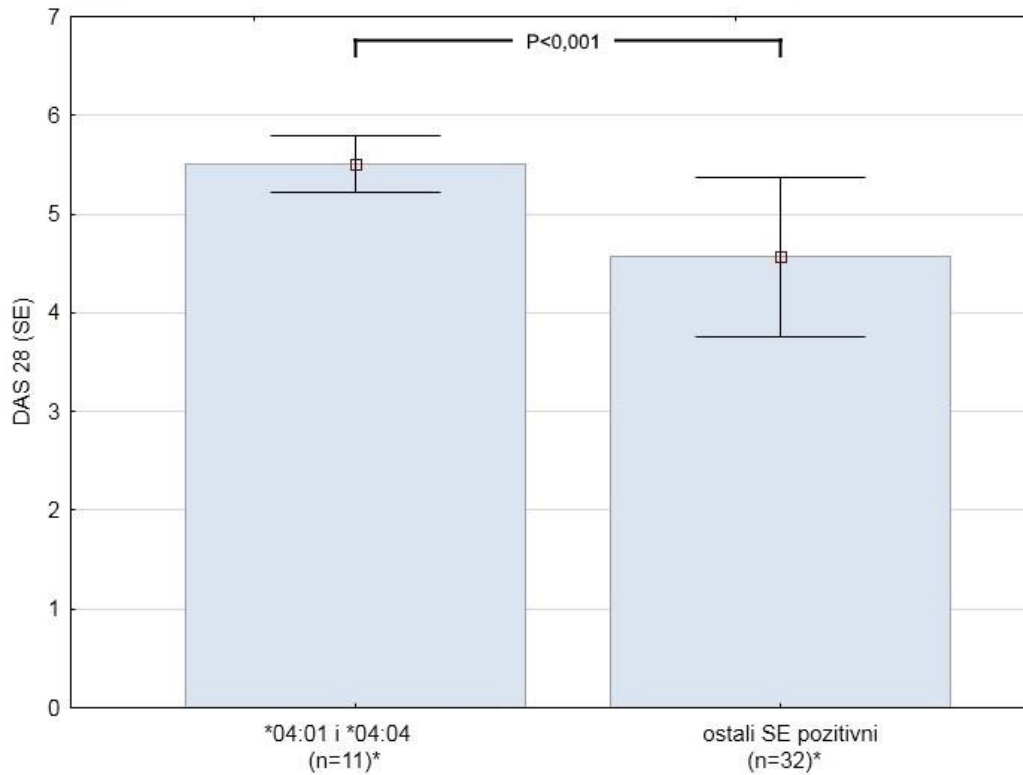
Pacijenti s područja ostatka SDŽ koji su nositelji alela HLA-DRB1\*04:01 i HLA-DRB1\*04:04 imaju veću vrijednost anti-CCP-a ( $P<0,001$ ) i veću aktivnost bolesti mjerenu DAS28 indeksom ( $P<0,001$ ) u odnosu na pacijente koji su nositelji SE negativnih alela.

Na Slikama 18, 19 i 20 prikazana je povezanost alela HLA-DRB1\*04:01 i \*04:04 s titrom anti-CCP protutijela, DAS 28 i HAQ-Di indeksom u pacijenata s RA s područja ostatka SDŽ.



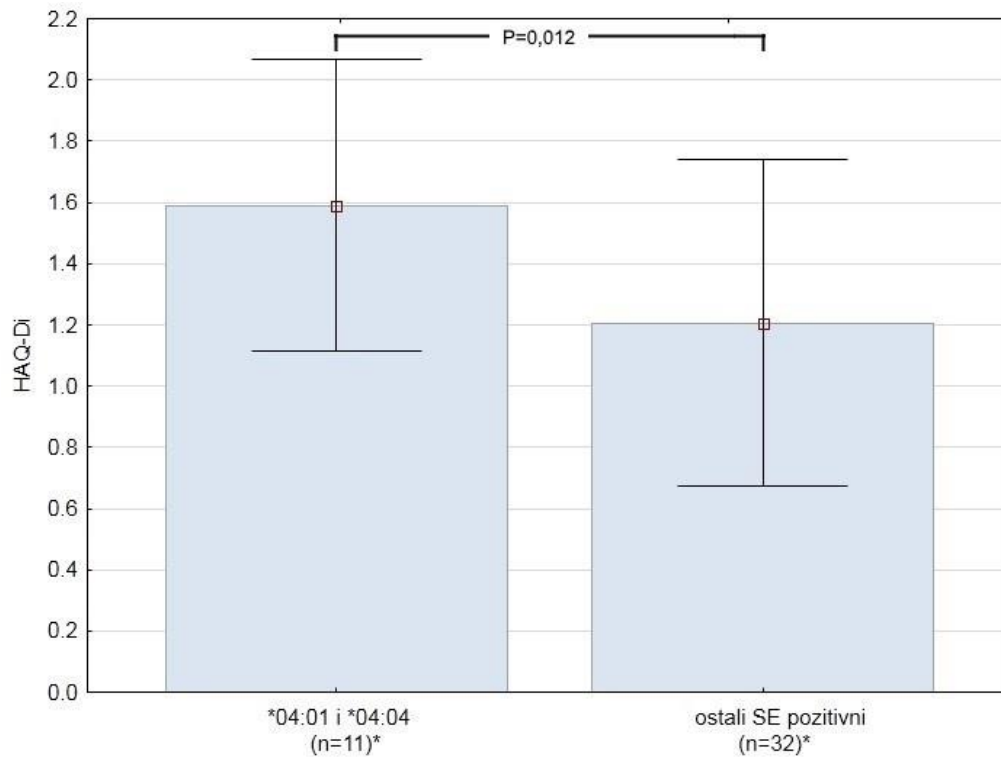
**Slika 18.** Titar anti-CCP protutijela uspoređen Mann-Whitney U testom između HLA-DRB1\*04:01 i \*04:04 pozitivnih pacijenata i ostalih SE pozitivnih pacijenata s područja ostatka Splitsko-dalmatinske županije. anti-CCP – anticitrulinska protutijela; SE (engl. shared epitope) – nositelji alela zajedničkog epitopa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija.

\*Iz testiranja isključeni pacijenti nositelji dva SE pozitivna alela.



**Slika 19.** Vrijednost DAS28 indeksa uspoređena Mann-Whitney U testom između HLA-DRB1\*04:01 i \*04:04 pozitivnih pacijenata i ostalih SE pozitivnih pacijenata s područja ostatka Splitsko-dalmatinske županije. DAS-28 – indeks aktivnosti bolesti; SE (engl. shared epitope) – nositelji alela zajedničkog epitopa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

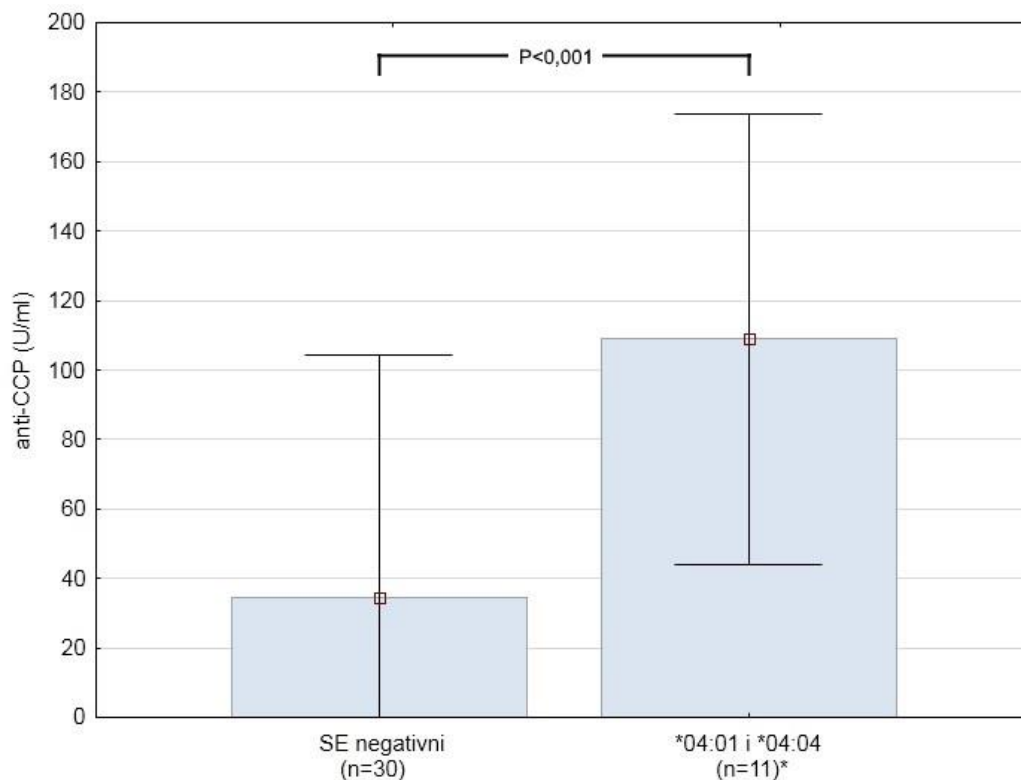
\*Iz testiranja isključeni pacijenti nositelji dva SE pozitivna alela.



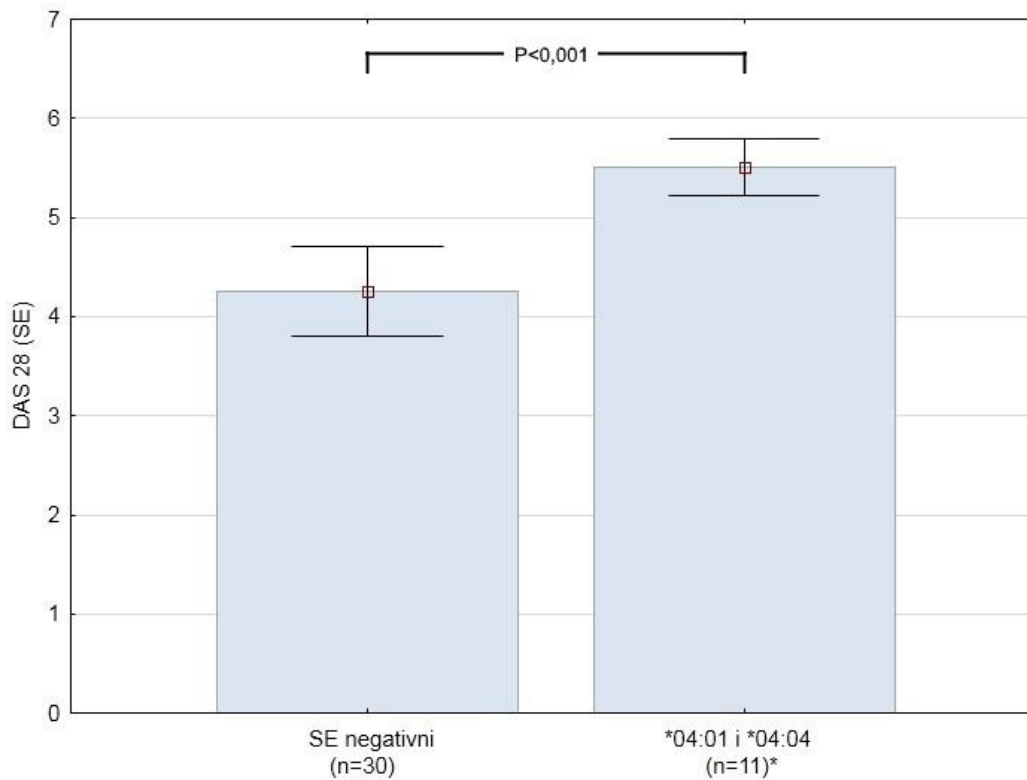
**Slika 20.** Stupanj funkcionalne sposobnosti uspoređen Mann-Whitney U testom između HLA-DRB1\*04:01 i \*04:04 pozitivnih pacijenata i ostalih SE pozitivnih pacijenata s područja ostatka Splitsko – dalmatinske županije. HAQ–Di – indeks funkcionalne sposobnosti; SE (engl. shared epitope) – nositelji alela zajedničkog epitopa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. \*Iz testiranja isključeni pacijenti nositelji dva SE pozitivna alela.



Na Slikama 21 i 22 prikazana je povezanost alela HLA-DRB1\*04:01 i \*04:04 s titrom anti-CCP protutijela i DAS 28 indeksa u odnosu na SE negativne alele.



**Slika 21.** Titar anti-CCP protutijela uspoređen Mann-Whitney U testom između HLA-DRB1\*04:01 i \*04:04 pozitivnih pacijenata i SE negativnih pacijenata s područja ostatka Splitsko–dalmatinske županije. anti-CCP – anticitrulinska protutijela; SE negativni (engl. shared epitope) – pacijenti koji nisu nositelji alela zajedničkog epitopa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. \*Iz testiranja isključeni pacijenti nositelji dva SE pozitivna alela.



**Slika 22.** Vrijednost DAS28 indeksa uspoređena Mann-Whitney U testom između HLA-DRB1\*04:01 i \*04:04 pozitivnih pacijenata i SE negativnih pacijenata s područja ostatka Splitsko–dalmatinske županije. DAS-28 – indeks aktivnosti bolesti; SE negativni (engl. shared epitope) – pacijenti koji nisu nositelji alela zajedničkog epitopa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. \*Iz testiranja isključeni pacijenti nositelji dva SE pozitivna alela.

## 5. RASPRAVA

### 5.1. Prevalencija reumatoidnog artritisa u Splitsko-dalmatinskoj županiji

Ovo istraživanje po prvi put u Hrvatskoj ispituje i uspoređuje prevalenciju te klinička i laboratorijska obilježja RA u pripadnika definiranoga zemljopisnog područja SDŽ za koje je u kliničkom praćenju primijećeno da vrlo često imaju teški oblik RA. Prevalencija RA u SDŽ je 0,24%, s rasponom od 0,23% do 0,27% u pojedinim regijama SDŽ.

Poznato je da se prevalencija RA razlikuje u različitim etničkim skupinama, pa čak i unutar iste zemlje. Prevalencija RA varira diljem europskih zemalja. Viša je u zemljama sjeverne nego u zemljama južne Europe, pokazujući gradijent sjever-jug (9). Tako je prevalencija RA u Švedskoj 0,51%, u Litvi 0,55%, u Finskoj 0,80%, u Engleskoj 0,81% (156-159). Prevalencija RA u zemljama južne Europe iznosi 0,31% u Francuskoj, 0,33% u Italiji, 0,34% u Srbiji, a 0,38% u Turskoj (10,11,160,161). Osim niže prevalencije, pacijenti iz zemalja južne Europe, a posebno iz mediteranskog područja, imaju blaži oblik bolesti s manje vanzglobnih obilježja. Pretpostavlja se da uz genetske čimbenike, mediteranska prehrana i klimatski čimbenici imaju zaštitni učinak na razvoj i težinu bolesti (7,9).

Rezultati ovog istraživanja, u skladu s prethodno iznesenim, pokazuju nisku prevalenciju RA među odraslim stanovnicima SDŽ, regije koja pripada Mediteranu.

Razlike u prevalenciji i incidenciji RA između populacija različitih regija mogu se objasniti izloženošću različitim čimbenicima okoliša, klimatskim utjecajima i različitim učincima genetskih čimbenika (13,162,163). Ipak, važno je napomenuti da uspoređivanje prevalencija ima određena ograničenja i to zbog primjene različitih dijagnostičkih kriterija, razlike u metodologiji prikupljanja podataka i prikaza rezultata istraživanja (5,164). Osim gradijenta prevalencije sjever-jug i razlike među pojedinim zemljama, mnoga epidemiološka istraživanja RA ukazala su na regionalne razlike u prevalenciji bolesti unutar iste zemlje (12,165). Rezultati ovog istraživanja pokazali su da prevalencija RA među stanovnicima Sinjske krajine iznosi 0,27% te je nešto viša, iako ne statistički značajno u usporedbi s ukupnom prevalencijom među stanovnicima SDŽ (0,24%) i ostalih regija SDŽ (155).

Prema literaturi, prevalencija RA je tri puta češća u žena nego u muškaraca (8). Rezultati ovog istraživanja pokazali su veću prevalenciju RA među ženama, što je rezultiralo omjerom između žena i muškaraca 5,5:1. Slični rezultati dobiveni su u Francuskoj (5,6:1), Italiji (4,8:1), Turskoj (5,1:1) te Španjolskoj (4:1) (10-12,161). Također je poznato da se razlika u prevalenciji između spolova smanjuje u starijim dobnim skupinama (1,8), što je potvrđeno i

rezultatima ovog istraživanja. Naime, u populaciji oboljelih SDŽ najmanja razlika u prevalenciji RA između žena i muškaraca bila je u dobnoj skupini od  $\geq 80$  (2,2:1). Nadalje, poznato je da se prevalencija RA povećava s dobi (1,8). Slični rezultati dobiveni su u ovom istraživanju u kojem se pokazalo kako porast prevalencije započinje u dobi od 40-49 godina, najviša je bila u dobi od 70-79 godina, a nakon toga pokazuje tendenciju pada.

## **5.2. Raspodjela alela HLA-DRB1 gena u ispitivanoj populaciji**

Razlike u prevalenciji i incidenciji RA u različitim etničkim skupinama mogu se dijelom objasniti različitom učestalošću i tipom HLA-DRB1 rizičnih alela u pojedinim populacijama. Reumatoidni artritis povezan je s nekoliko HLA-DRB1 alela (DRB1\*01:01, DRB1\*01:02, DRB1\*04:01, DRB1\*04:04, DRB1\*04:05, DRB1\*04:08, DRB1\*10:01 i DRB1\*14:02) koji su poznati kao aleli zajedničkog epitopa (31,166).

Rezultati ovog istraživanja potvrdili su da oboljeli od RA imaju višu učestalost alela zajedničkog epitopa (SE pozitivni) u odnosu na kontrolnu zdravu populaciju, ali i da postoje razlike u učestalosti SE alela u istraživanoj populaciji. Naime, u Sinjskoj krajini je alel HLA-DRB1\*04 češći u pacijenata s RA nego u zdravih ispitanika (18,24% vs 6,25%), a u ostatku SDŽ je alel HLA-DRB1\*01 češći u pacijenata s RA nego u zdravih ispitanika (16,22% vs 7,50%). Nadalje, alel HLA-DRB1\*04 je češći u pacijenata s RA s područja Sinjske krajine nego u pacijenata s RA s područja ostatka SDŽ (18,24% vs 9,46%), dok je alel HLA-DRB1\*01 gotovo podjednako zastupljen u obje skupine oboljelih.

U istraživanju pojavnosti gena HLA razreda II u pacijenata s RA utvrđena je povezanost HLA-DRB1\*01 alela s nastankom RA dok nije utvrđena povezanost HLA-DRB1\*04 alela i RA u hrvatskoj populaciji (49). U studiji raspodjele HLA-DRB1 gena u hrvatskih bolesnika s artritismom (nediferencirani, rani i razvijeni RA) kao najčešći predisponirajući alel utvrđen je \*01:01 (43,3%), potom \*04:01 (17,7%) i \*04:04 (10%) (167). Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je alel HLA-DRB1\*01 najučestaliji predisponirajući alel u pacijenata s RA s područja ostatka SDŽ, što je u skladu s rezultatima dobivenim pri istraživanju pacijenata s RA u Hrvatskoj. Iako je učestalost alela HLA-DRB1\*01 u Sinjskoj populaciji oboljelih od RA visoka, najzastupljeniji alel u toj populaciji ipak je HLA-DRB1\*04.

U zemljama južne Europe tj. mediteranskim zemljama najčešći predisponirajući aleli jesu HLA-DRB1\*01:01 i HLA-DRB1\*10:01, što se podudara s opisanom učestalošću alela u SDŽ, području Hrvatske koja zemljopisno pripada mediteranskim zemljama (9,48-50,167).

Povezanost RA s različitim alelima zajedničkog epitopa u dvije skupine oboljelih od RA u SDŽ potvrđuje da se raspodjela i učestalost rizičnih alela razlikuju u različitim skupinama unutar iste zemlje. Reviron i sur. proveli su istraživanje povezanosti HLA-DRB1 alela i RA u pacijenata s RA u tri zemljopisna područja Francuske. U sva tri područja 80% pacijenata su nositelji alela zajedničkog epitopa. Međutim, raspodjela alela zajedničkog epitopa nije ista. U Rennesu, u zapadnoj Francuskoj, alel HLA-DRB1\*04:01 najučestaliji je SE pozitivni alel. S druge strane, u Marseilleu, u Jugoistočnoj Francuskoj, alel HLA-DRB1\*01 najčešći je SE-pozitivni alel u pacijenata s RA. U Besanconu, u sjeveroistočnoj Francuskoj, najčešći SE pozitivni alel je HLA-DRB1\*01:01, a nešto manje je zastupljen HLA-DRB1\*04:01 (168). Istraživanja provedena u populaciji oboljelih od RA u južnoj Španjolskoj utvrdila su povezanost alela HLA-DRB1\*01:01, HLA-DRB1\*10:01 i HLA-DRB1\*04:05 s RA (39,169, 170). U populaciji oboljelih od RA u pokrajini Lugo u sjeverozapadnom dijelu Španjolske najučestaliji je alel HLA-DRB1\*04:01 (39,171).

Slično, u populaciji oboljelih od RA istočne Crnomorske regije Turske utvrđena je povezanost RA s alelima HLA-DRB1\*01, \*04 i \*09 (172), dok je u jugoistočnoj Anatoliji RA povezan s HLA-DRB1\*10 alelom (173). Aleli HLA-DRB1\*01:01 i HLA-DRB1\*10:01 povezani su s RA u Grčkoj i Izraelskoj populaciji (47,174), a u populaciji oboljelih od RA u Italiji najučestaliji su aleli HLA-DRB1\*01 i HLA-DRB1\*04 (48,175).

Aleli HLA-DRB1\*04:01, HLA-DRB1\*04:04 i HLA-DRB1\*04:08 najučestaliji su u pacijenata s RA u zemljama sjeverne i zapadne Europe. Aleli HLA-DRB1\*04:01 i HLA-DRB1\*04:04 najučestaliji su pacijenata s RA u zemljama Sjeverne Amerike, dok je alel HLA-DRB1\*14:02 najučestaliji u Indijanaca (9,46,47,174). HLA-DRB1\*04:05 alel najčešći je u populaciji oboljelih od RA u zemljama Istočne Azije (176).

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je u pacijenata s RA s područja ostatka SDŽ značajno viša zastupljenost alela HLA-DRB1\*15 nego u populaciji oboljelih s područja SK (16,22% vs 7,43%), što se čini prilično zanimljivim s obzirom da alel HLA-DRB1\*15 ne pripada alelima zajedničkog epitopa te se stoga ne povezuje s RA (52,54,177). Ipak, pretpostavlja se da bi mehanizam različit od teorije zajedničkog epitopa mogao objasniti povezanost alela HLA-DRB1\*15 s RA starije dobi opisanog u Japanskoj populaciji (177). Također istraživanja provedena u Švedskoj i Mađarskoj pokazala su da HLA-DRB1\*15 pozitivni pacijenti imaju više razine anti-CCP protutijela te je povećana proizvodnja anti-CCP protutijela povezana s HLA-DRB1\*15 pozitivnošću u pacijenata s RA (27,52,54).

Brojne studije dokazale su da pojedini aleli HLA-DRB1 gena smanjuju rizik nastajanja RA (33,178). Rezultati ovog istraživanja utvrdili su da su DERAA aleli značajno više zastupljeni

u zdravoj populaciji SK i SDŽ te je pokazano da je alel HLA-DRB1\*11 mogući zaštitni alel za nastajanje RA u populaciji s područja ostatka SDŽ, dok je alel HLA-DRB1\*13 mogući zaštitni alel u populaciji Sinjske krajine. U hrvatskoj populaciji alel HLA-DRB1\*11 mogući je zaštitni alel za razvitak RA (49). Rezultati slični rezultatima ovog istraživanja opisani su u populaciji Francuske, Španjolske, Turske, Mađarske, Norveške, Švedske i Nizozemske (27,34,46,172).

### **5.3. Povezanost alela HLA-DRB1 gena i težine bolesti**

U višegodišnjoj kliničkoj praksi na Kliničkom odjelu za reumatologiju i kliničku imunologiju Klinike za unutarnje bolesti i Zavodu za fizikalnu medicinu i rehabilitaciju s reumatologijom KBC Split, primijećeno je da velik broj oboljelih od RA s područja Sinjske krajine ima teži, brzo napredujući, erozivni oblik bolesti, što su potvrdili rezultati ovog istraživanja u kojem je određivana vrijednosti reaktanata akutne faze, titar specifičnih protutijela za RA, klinička aktivnost bolesti, funkcionalni status i stupanj radioloških promjena u oboljelih.

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da su C-reaktivni protein i titar anti-CCP protutijela značajno viši u pacijenata s RA s područja SK nego u pacijenata s područja ostatka SDŽ. Također, aktivnost bolesti mjerena DAS28 indeksom i srednja vrijednost indeksa funkcionalne sposobnosti (HAQ-Di) značajno su veće u pacijenata s RA s područja SK nego u pacijenata s područja ostatka SDŽ. Osim toga, među pacijentima s područja SK veći je udio pacijenata koji prema HAQ-Di indeksu ima težu do vrlo tešku funkcionalnu nesposobnost. Iako stupanj radioloških promjena nije značajno viši u pacijenata s područja SK, zabilježena je viša vrijednost Larsen skora u ovoj populaciji.

Prema svjetskim istraživanjima težina bolesti u oboljelih od RA povezana je s alelima zajedničkog epitopa, osobito s HLA-DRB1\*04 alelom, znatno rjeđe s alelima HLA-DRB1\*01 i HLA-DRB1\*10. Dodatni čimbenici rizika za nastajanje teškog, erozivnog oblika bolesti su povišena vrijednost anti-CCP protutijela, povišen reumatoidni faktor i povišeni reaktanti akutne faze, posebno C-reaktivni protein (37,179-181).

Osim toga, aleli zajedničkog epitopa, prvenstveno HLA-DRB1\*04 alel i njegovi podtipovi HLA-DRB1\*04:01, \*04:04, \*04:05 i \*04:08 povezani su s nastajanjem anti-CCP-a, što je dokazano u istraživanjima koja su provedena u zemljama sjeverne i južne Europe. Ta je povezanost znatno manje izražena u nositelja HLA-DRB1\*01 alela (22,43,45,46,48).

Brojna istraživanja provedena u mediteranskim zemljama ukazala su da pacijenti s RA iz mediteranskih zemalja imaju blaži, sporo napredujući oblik bolesti u odnosu na pacijente iz zemalja sjeverne Europe što se povezuje s niskom učestalošću HLA-DRB1\*04 alela i većom zastupljenošću alela HLA-DRB1\*01 i HLA-DRB1\*10 u pacijenata s RA u ovim zemljama (9, 48-50,182,183).

Povećana učestalost alela HLA-DRB1\*04 u pacijenata s RA s područja SK i niža učestalost u pacijenata s RA s područja ostatka SDŽ mogla bi objasniti ove značajne razlike u težini bolesti koje su uočene u pacijenata s RA s područja Sinjske krajine, stoga je provedeno daljnje istraživanje povezanosti alela zajedničkog epitopa (SE+) s navedenim obilježjima bolesti.

Dokazano je da su jednak broj pacijenta s RA (44; 59,46%) s područja SK i s područja ostatka SDŽ nositelji jednog ili dva alela zajedničkog epitopa. Međutim, vidljiva je razlika u raspodjeli SE alela. Deset pacijenata s RA s područja SK nositelji su dva alela zajedničkog epitopa, dok je samo jedan pacijent s područja ostatka SDŽ nositelj dva SE pozitivna alela.

Rezultati ovog istraživanja potvrđuju prethodne dokaze povezanosti pojedinih HLA-DRB1 alela i stvaranja autoprotutijela u RA. Ovim istraživanjem dokazana je pozitivna povezanost HLA-DRB1 SE pozitivnih alela i nastajanja autoprotutijela u pacijenata s RA s područja Sinjske krajine. Značajno veći broj SE pozitivnih pacijenata s područja SK ima povišen titar RF i anti-CCP protutijela, dok ta povezanost nije dokazana u SE pozitivnih pacijenata s područja ostatka SDŽ. Nadalje, SE pozitivni pacijenti s područja SK imaju češće povišenu vrijednost RF i anti-CCP u odnosu na SE-pozitivne pacijente s područja ostatka SDŽ ( $P=0,004$ ,  $P=0,014$ ).

Nedvojbena povezanost HLA-DRB1 SE pozitivnih alela i anti-CCP-a dokazana je u istraživanjima koja su provedena u europskim zemljama i zemljama Sjeverne Amerike (125, 184-187). S druge strane, povezanost HLA-DRB1 SE pozitivnih alela i RF u nekim je istraživanjima dokazana, a u drugima nije (60,186).

Poznato je da je alel HLA-DRB1\*15, koji ne pripada SE pozitivnim alelima, povezan s većim titrom anti-CCP (52,54) te da je alel HLA-DRB1\*01, koji je SE pozitivan alel, manje povezan s nastajanjem anti-CCP-a od HLA-DRB1\*04 alela. Kako pacijenti s područja ostatka SDŽ imaju veću učestalost HLA-DRB1\*15 i HLA-DRB1\*01 alela, a manju učestalost alela HLA-DRB1\*04 možda je to jedan od razloga zbog čega u ovom istraživanju nije utvrđena povezanost SE pozitivnih alela s RF i anti-CCP protutijelima u ovoj populaciji.

Brojnim studijama dokazana je povezanost pušenja i stvaranja anti-CCP protutijela osobito u nositelja alela zajedničkog epitopa (76,77). Ovim istraživanjem dokazana je povezanost pušenja, anti-CCP protutijela i alela zajedničkog eipotopa u SE pozitivnih pušača s područja SDŽ.

Iako genetska pozadina težine RA još nije u potpunosti poznata, nema sumnje da su aleli zajedničkog epitopa povezani s nastajanjem RA i da imaju utjecaj na težinu bolesti (22,45,144,168,188). Povezanost SE pozitivnih alela i težine RA dokazana je i varira u različitim etničkim skupinama (39,143).

SE pozitivni pacijenti s područja SK i SE pozitivni pacijenti s područja ostatka SDŽ imaju značajnu veću aktivnost bolesti mjerenu DAS28 indeksom i veći stupanj funkcionalne nesposobnosti mjerene HAQ-Di indeksom u odnosu na SE negativne pacijente.

Nadalje, SE pozitivni pacijenti s područja SK češće imaju veću aktivnost bolesti i teži do vrlo teški stupanj funkcionalne nesposobnosti u odnosu na SE pozitivne pacijente s područja SDŽ. Povezanost SE pozitivnih alela i aktivnosti bolesti dokazana je u brojnim istraživanjima koja su provedena u zemljama sjeverne Europe (38,189), Nizozemskoj (125), sjevernoj Italiji (48), Mađarskoj (54) i među bijelcima u Sjevernoj Americi (190,191). U istraživanjima koja su provedena u Turskoj, Grčkoj i Siriji ta povezanost nije dokazana (192-194).

Dobro je poznata povezanost aktivnosti bolesti i funkcionalnog statusa mjenog HAQ-Di indeksom u RA pacijenata. Naime, pacijenti koji imaju veću aktivnost bolesti obično imaju i teži stupanj funkcionalne nesposobnosti (195).

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da veći stupanj radiološkog oštećenja imaju SE pozitivni pacijenti s područja SK u odnosu na SE negativne pacijente, dok ta razlika nije uočena između SE pozitivnih i SE negativnih pacijenata s područja ostatka SDŽ. Nadalje, SE pozitivni pacijenti s područja SK imaju veći stupanj radioloških promjena od SE pozitivnih pacijenata s područja ostatka SDŽ.

Poznato je da su predskazatelji strukturnog oštećenja zglobova povišen titar RF i anti-CCP protutijela (20,45,61,196), povišeni reaktanti akutne faze, visoka aktivnost bolesti mjerena DAS28 indeksom, HLA-DRB1\*04 alel i visok stupanj funkcionalne nesposobnosti mjen HAQ indeksom (45,144,181,188).

Stoga bi se utvrđena razlika u povezanosti SE pozitivnih alela i radioloških promjena u pacijenata s područja SK i ostatka SDŽ mogla objasniti razlikom u učestalosti pojedinih alela zajedničkog epitopa, prvenstveno HLA-DRB1\*04 alela, ali također i većom učestalošću povišenih vrijednosti reaktanata akutne faze, anti-CCP protutijela, RF, vrijednosti DAS28 i HAQ-Di indeksa.



Podtipovi HLA-DRB1\*04 alela, HLA-DRB1\*04:01 i \*04:04 povezani su s povišenim titrom anti-CCP-a, većom aktivnosti bolesti i većim stupnjem funkcionalne nesposobnosti u obje ispitivane skupine. Dosadašnja istraživanja pokazala su da su podtipovi HLA-DRB1\*04:01 i \*04:04 tijesno povezani s težinom i aktivnosti bolesti te stvaranjem anti-CCP protutijela (28, 29,45).

#### **5.4. Ograničenja i prednosti istraživanja**

Kao svako presječno istraživanje i ovo je ograničeno dizajnom koji onemogućava donošenje zaključaka o uzročno-posljedičnoj povezanosti između rizičnih čimbenika, razvoja i težine bolesti. Vjerojatno mali udio RA pacijenata nije uključen u istraživanje. Također, s obzirom da je istraživana populacija oboljelih od RA s ograničenog geografskog područja, ukupan broj oboljelih nije bio dostatan za otkrivanje razlika u slučaju raščlambe podtipova HLA-DRB1\*04 alela. Razlika u raspodjeli i učestalosti alela HLA-DRB1 gena između pacijenata s RA s područja SK i pacijenata s RA s područja SDŽ može se dijelom objasniti genetskom razlikom kontrolnih skupina. Unatoč navednim ograničenjima, dobiveni su zanimljivi rezultati koji mogu poslužiti kao osnova za daljnja istraživanja.

Osnovni je zahtjev suvremene reumatologije postaviti ranu dijagnozu bolesti, prepoznati bolesnike koji će razviti teški, brzo napredujući erozivni artritis kako bi se pravovremeno mogla započeti intenzivna terapija, a sve s ciljem izbjegavanja nastanka nepopravljivih oštećenja zglobova i trajne nesposobnosti te postizanje remisije bolesti. Štoviše, poznato je da se autoimunost razvija i do par godina prije pojave prvih simptoma bolesti. Stoga bi bilo važno u osoba u kojih je otkrivena autoimunost, a nositelji su alela koji nose povećani rizik za teški, brzo napredujući oblik RA, na vrijeme preventivno djelovati u smislu smanjivanja izloženosti čimbenicima rizika koji ili potiču nastanak bolesti ili ubrzavaju njezino napredovanje. Odgađanje početka ili usporavanje napredovanja bolesti definitivno predstavlja vrlo atraktivan pristup u reumatologiji, međutim, potrebna su daljnja istraživanja koja će u potpunosti rasvijetliti etiološke čimbenike, patogenezu bolesti i moguću povezanost pojedinih alela s kliničkim obilježjima i prognozom RA (71). Glavna prednost određivanja alela HLA-DRB1 gena jest otkrivanje pacijenata u ranoj fazi bolesti s povećanim rizikom za razvoj teškog oblika bolesti, što može olakšati donošenje odluke za primjenu intenzivne terapije. Štoviše, Tan i suradnici su 2010. god. dokazali da 30-40% pacijenata ima slab ili nikakav odgovor i na primjenu intenzivne biološke terapije što može biti genetski predodređeno

(197). Pretpostavlja se da će u budućnosti genetske analize i farmakogenetika pomoći u odabiru terapije koja je primjerena za svakog pojedinog pacijenta.

Dakle, studija koja se bavi istraživanjem prevalencije, različitih rizičnih čimbenika te genetskih, kliničkih i laboratorijskih obilježja bolesti omogućava dodatno razumijevanje nastanka i tijeka ove česte i teške bolesti. Istraživanja poput ovog važna su za širenje znanja o RA, a prikazani rezultati mogu biti korisni u daljnjim istraživanjima prevalencije i težine RA u Hrvatskoj.

## 6. ZAKLJUČAK

Prevalencija RA u SDŽ u populaciji starijih od 18 godina je niska i iznosi 0,24%, a incidencija je 238/100 000 stanovnika. Veća je u žena (0,39%) nego u muškaraca (0,07%) te je veća u starijim dobnim skupinama. Među regijama SDŽ Sinjska krajina ima učestalost od 0,27%, potom slijede otoci s 0,25%, priobalje s 0,24% i ostatak Dalmatinske Zagore s 0,23%.

Dokazano je da pacijenti s RA s područja SK imaju teži oblik bolesti od pacijenata s područja ostatka SDŽ. U pacijenata s RA s područja SK učestalost alela HLA-DRB1\*04 značajno je viša nego u pacijenata s RA s područja ostatka SDŽ, a među podtipovima alela HLA-DRB1\*04 najučestaliji su HLA-DRB1\*04:01 i HLA-DRB1\*04:04 aleli.

Među pacijentima s RA s područja SK značajno je veći broj seropozitivnih pacijenata u odnosu na seronegativne te je titar anti-CCP protutijela značajno viši u pacijenata s RA s područja SK nego u pacijenata s područja ostatka SDŽ.

Dokazana je povezanost alela HLA-DRB1\*04:01 i HLA-DRB1\*04:04 s većom aktivnosti bolesti, lošijim funkcionalnim statusom i većim stupnjem radioloških promjena zglobova.

## 7. SAŽETAK

Reumatoidni artritis je kronična, sistemska upalna bolest nepoznatog uzroka. Razlika u prevalenciji i incidenciji RA u različitim etničkim skupinama može se dijelom objasniti različitom učestalošću i tipom alela zajedničkog epitopa HLA-DRB1 gena u pojedinim populacijama, koji su ujedno i čimbenici rizika za teži oblik bolesti. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi prevalenciju RA u SDŽ te istražiti povezanost genetskih i kliničkih obilježja bolesti u pacijenata s RA s područja SK.

Prikupljanje podataka za utvrđivanje prevalencije RA u SDŽ provedeno je uvidom u medicinsku dokumentaciju, pregledom reumatologa i anketnim upitnikom. Provedena je HLA-DRB1 genotipizacija (DRB1\*01 - DRB1\*16) u 74 RA pacijenta i 80 zdravih ispitanika s područja SK i s područja ostatka SDŽ metodom PCR-SSO te određivanje podtipova HLA-DRB1\*04 alela pomoću PCR-SSP. Utvrđivanje težine bolesti provedeno je pregledom reumatologa, određivanjem reaktanata akutne faze, protutijela (RF, anti-CCP), aktivnosti bolesti (DAS28), stupnja funkcionalne sposobnosti (HAQ-Di) i radiološkog oštećenja zglobova (Larsen). Istražene su razlike u povezanosti alela HLA-DRB1 gena s navedenim parametrima između pacijenata s RA s područja SK i pacijenata s područja SDŽ.

Prevalencija RA u SDŽ iznosi 0,24% i veća je u žena (0,39%) nego u muškaraca (0,07%). U pacijenata s RA s područja SK učestalost alela HLA-DRB1\*04 značajno je viša nego u pacijenata s RA s područja ostatka SDŽ (18,2% vs 9,5%;  $P=0,014$ ). Alel HLA-DRB1\*15 značajno je više zastupljen u pacijenata s RA s područja ostatka SDŽ nego u pacijenata s područja Sinjske krajine (16,2% vs 7,4%;  $P=0,010$ ). Nije utvrđena razlika u učestalosti HLA-DRB1\*01 alela između oboljelih ( $P=0,119$ ). Pacijenti s područja SK koji su nositelji alela zajedničkog epitopa češće imaju povišenu vrijednost anti-CCP-a ( $P=0,014$ ) i RF ( $P=0,004$ ), jaču aktivnost bolesti ( $P=0,043$ ), teži do vrlo teški stupanj funkcionalne nesposobnosti ( $P<0,001$ ) i izraženije radiološke promjene ( $P=0,003$ ) u odnosu na pacijente nositelje alela zajedničkog epitopa s područja ostatka SDŽ.

Raspodjela i učestalost alela zajedničkog epitopa različita je u pacijenata s RA s područja SK u odnosu na pacijente s područja ostatka SDŽ. Pacijenti s RA s područja SK imaju teži oblik bolesti od pacijenata s područja SDŽ. Povećana učestalost HLA-DRB1\*04 alela i podtipova \*04:01 i \*04:04 u pacijenata s RA s područja SK i niža učestalost u pacijenata s RA s područja ostatka SDŽ mogla bi objasniti navedene razlike u težini bolesti koje su utvrđene u pacijenata s RA s područja Sinjske krajine.

## 8. SUMMARY

Rheumatoid arthritis is a chronic, systemic inflammatory disease of unknown cause. The difference in the prevalence and incidence of RA in different ethnic groups can be partly explained by different frequency and type of shared epitope alleles HLA-DRB1 gene in some populations, which are also risk factors for severe forms of the disease. The aim of this study was to evaluate the prevalence of RA in Split-Dalmatia County and to investigate the association of genetic and clinical characteristics of the disease in patients with RA in Sinj region.

The collection of data for determining the prevalence of RA in the Split-Dalmatia County was conducted by examining the medical records, examination of rheumatologists and survey questionnaire. HLA-DRB1 genotyping was performed (DRB1\*01 - DRB1\*16) by using PCR-SSO in 74 RA patients and 80 healthy subjects from the Sinj region as well as in 74 patients with RA and 80 healthy subjects from the rest of the Split-Dalmatia County. Subtypes of HLA-DRB1\*04 alleles were determined by using PCR-SSP. The assessment of the severity of the disease was conducted by rheumatologist's examination, the determining of acute phase reactants, antibodies (RF and ACPA), disease activity (DAS28), the degree of functional ability (HAQ-DI) and radiological joint damage (Larsen). Differences in association of alleles HLA-DRB1 gene with the specified clinical parameters between RA patients from the Sinj region and RA patients from the rest of the Split-Dalmatia County were investigated.

The prevalence of RA in the Split-Dalmatia County was 0.24% and it was higher among females (0.39%) than males (0.07%). In patients with RA from the Sinj region frequency of HLA-DRB1\*04 allele was significantly higher than in patients with RA from the rest of the Split-Dalmatia County (18.2% vs 9.5%;  $P=0.014$ ). Allele HLA-DRB1\*15 was significantly more prevalent in patients with RA from the rest of the Split-Dalmatia County than in patients from the Sinj region (16.2% vs 7.4%;  $P=0.010$ ). There was no difference in the frequency of HLA-DRB1\*01 allele between patients ( $P=0.119$ ).

The frequency of ACPA and RF antibodies was higher in shared epitope (SE) positive patients from the Sinj region compared with the SE-positive patients from the rest of the Split-Dalmatia County ( $P=0.014$ , and  $P=0.004$ , respectively). SE-positive patients from the Sinj region had stronger activity of the disease ( $P=0.043$ ), more severe degree of functional disability ( $P<0.001$ ) and more severe radiological changes ( $P=0.003$ ), compared with the SE-positive patients from the rest of the Split-Dalmatia County.

The distribution and frequency of shared epitope alleles is different in RA patients from the Sinj region compared with the RA patients from the rest of Split-Dalmatia County. RA patients from the Sinj region have a more severe form of the disease than RA patients from the rest of Split-Dalmatia County. Increased frequency of HLA-DRB1\*04 allele and subtypes \*04:01 and \*04:04 in RA patients from the Sinj region and a lower incidence in RA patients from the rest of Split-Dalmatia County could explain differences in the severity of the disease that have been identified in patients with RA from the Sinj region.

## 9. POPIS LITERATURE

1. Imboden JB. The immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Annu Rev Pathol* 2009;4:417-34.
2. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2010;376:1094-108.
3. Entezami P, Fox DA, Clapham PJ, Chung KC. Historical Perspective on the Etiology of Rheumatoid Arthritis. *Hand Clin.* 2011;27:1-10.
4. Scher JU, Abramson SB. The microbiome and rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2011;7:569-78.
5. Alamanos Y, Voulgari PV, Drosos AA. Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis, based on the 1987 American College of Rheumatology criteria: a systematic review. *Semin Arthritis Rheum* 2006;36:182-8.
6. Carmona L, Cross M, Williams B, Lassere M, March L. Rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2010;24:733-45.
7. Tobon GJ, Youinou P, Saraux A. The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. *J Autoimmun* 2010;35:10-4.
8. Silman AJ, Pearson JE. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2002;4:265-72.
9. Alamanos Y, Voulgari PV, Drosos AA. Rheumatoid arthritis in southern Europe: Epidemiological, Clinical, Radiological and Genetic Considerations. *Curr Rheumatol Rev* 2005;1:33-6.
10. Guillemin F, Saraux A, Guggenbuhl P, Roux CH, Fardellone P, Le Bihan E, et al. Prevalence of rheumatoid arthritis in France:2001. *Ann Rheum Dis* 2005;64:1427-30.
11. Cimmino MA, Parisi M, Moggiana G, Mela GS, Accardo S. Prevalence of rheumatoid arthritis in Italy: the Chiavari Study. *Ann Rheum Dis* 1998;57:315-8.
12. Carmona L, Villaverde V, Hernández-García C, Ballina J, Gabriel R, Laffon A. The prevalence of rheumatoid arthritis in the general population of Spain. *Rheumatology (Oxford).* 2002;41:88-95.
13. Anagnostopoulos I, Zinzaras E, Alexiou I, Papathanasiou AA, Davas E, Koutroumpas A, et al. The prevalence of rheumatic diseases in central Greece: a population survey. *BMC Musculoskelet Disord* 2010;11:98.
14. Myasoedova E, Davis JM, Crowson CS, Gabriel SE. Epidemiology of rheumatoid arthritis: rheumatoid arthritis and mortality. *Curr Rheumatol Rep.* 2010;12:379-85.

15. Rodriguez-Rodriguez L, López-Mejias R, García-Bermúdez M, González-Juanatey C, González-Gay MA, Martín J. Genetic markers of cardiovascular disease in rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm.* 2012;2012:574817.
16. Rodriguez-Rodriguez L, López-Mejias R, Fernández-Gutiérrez B, Balsa A, González-Gay MA, Martín J. Rheumatoid arthritis: genetic variants as biomarkers of cardiovascular disease. *Curr Pharm Des.* 2015;21:182-201.
17. Pukšić S, Morović-Vergles J. Komorbiditet u bolesnika s reumatoidnim artritismom. *Reumatizam* 2014;61:31-36.
18. Choy E, Ganeshalingam K, Semb AG, Szekanecz Z, Nurmohamed M. Cardiovascular risk in rheumatoid arthritis: recent advances in the understanding of the pivotal role of inflammation, risk predictors and the impact of treatment. *Rheumatology (Oxford).* 2014;53:2143-54.
19. Simon TA, Thompson A, Gandhi KK, Hochberg MC, Suissa S. Incidence of malignancy in adult patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Arthritis Res Ther.* 2015;17:212.
20. Bax M, van Heemst J, Huizinga TWJ, Toes REM. Genetics of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Immunogenetics* 2011;63:459-66.
21. MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K, et al. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum.* 2000;43:30-7.
22. Viatte S, Plant D, Raychaudhuri S. Genetic and epigenetics of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2013;9:141-53.
23. Thorsby E. A short history of HLA. *Tissue Antigens.* 2009;74:101-16.
24. Murphy KP, Travers P, Walport M. *Janeway's Immunobiology.* 8th Edition. New York: Taylor & Francis; 2010. 868 str.
25. Stastny P. Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 1978;298:869-71.
26. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The Shared Epitope Hypothesis: an approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1987;300:1205-13.
27. Kurko J, Besenyei T, Laki J, Glant TT, Mikecz K, Szekanecz Z. Genetics of Rheumatoid Arthritis- a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2013;45:170-79.
28. Kurko J, Ling S, Holoshitz J. New insights into the functional role of the rheumatoid arthritis share epitope. *FEBS Lett.* 2011;585:3619-26.



29. Holoshitz J. The rheumatoid arthritis HLA-DRB1 shared epitope. *Curr Opin Rheumatol* 2010;22:293-98.
30. Firestein GS. The disease formerly known as rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2014;16:114.
31. Holoshitz J. The quest for better understanding of HLA-disease association: scenes from a road less travelled by. *Discov Med.* 2013;16:93-101.
32. Lundstrom E, Kallberg H, Smolnikova M, Ding B, Rönnelid J, Alfredsson L et al. Opposing effects of HLA-DRB1\*13 alleles on the risk of developing anti-citrullinated protein antibody-positive and anti-citrullinated protein antibody-negative rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2009;60:924-30.
33. Feitsma AL, van der Helm-van Mil AH, Huizinga TW, de Vries RR, Toes RE. Protection against rheumatoid arthritis by HLA: nature and nurture. *Ann Rheum Dis.* 2008;67:iii61-3.
34. van der Woude D, Lie BA, Lundstrom E, Balsa A, Feitsma AL, Houwing-Duistermaat JJ. Protection against anti-citrullinated protein antibody-positive rheumatoid arthritis is predominantly associated with HLA-DRB1\*1301:a meta-analysis of HLA-DRB1 associations with anti-citrullinated protein antibody-positive and anti-citrullinated protein antibody-negative rheumatoid arthritis in four European populations. *Arthritis Rheum* 2010;62:1236-45.
35. Oka S, Furukawa H, Kawasaki A, Shimada K, Sugii S, Hashimoto A et al. Protective effect of the HLA-DRB1\*13:02 allele in Japanese rheumatoid arthritis patients. *PloS One.* 2014;9:e99453.
36. Pavelić J. Novi uzročni čimbenik razvoja reumatoidnog artritisa. *Medix* 2014;113/114:142-44.
37. Meyer JM, Evans TI, Small RE, Redford TW, Han J, Singh R, et al. HLA-DRB1 genotype influences risk for severity of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1999;26:1024-34.
38. Gorman JD, Lum RF, Chen JJ, Suarez-Almazor ME, Thomson G, Criswell LA. Impact of shared epitope genotype and ethnicity on erosive disease. *Arthritis Rheum.* 2004;50:400-12.
39. Gonzales-Gay MA, Garcia-Porrúa C, Hajeer AH. Influence of Human Leukocyte Antigen-DRB1 on the Susceptibility and Severity of Rheumatoid Arthritis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism.* 2002;31:355-60.
40. Turesson C, Schaid DJ, Weyand CM, Jacobsson LTH, Goronzy JJ, Petersson IF, et al. The impact of HLA-DRB1 genes on extraarticular disease manifestations in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Therapy* 2005;7:1386-93.

41. Gonzales-Gay MA, Gonzales-Yuanatey C, Lopez-Diaz MJ, Pineiro A, Garcia-Porrúa C, Miranda-Filloy JA, et al. HLA-DRB1 and persistent chronic inflammation contribute to cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2007;57:125-32.
42. van der Woude D, Alemayehu WG, Verduijn W, de Vries RR, Houwing-Duistermaat JJ, Huizinga TW, et al. Gene-environment interaction influences the reactivity of autoantibodies to citrullinated antigens in rheumatoid arthritis. *Nat Genet.* 2010; 42:814-16.
43. Huizinga TW, Amos CI, van der Helm-van Mil AH, Chen W, van Gaalen FA, Jawaheer D, et al. Refining the complex rheumatoid arthritis phenotype based on specificity of the HLA-DRB1 shared epitope for antibodies to citrullinated proteins. *Arthritis Rheum.* 2005;52:3433-8.
44. Scott IC, Steer S, Lewis CM, Cope AP. Precipitating and perpetuating factors of rheumatoid arthritis immunopathology: linking the triad of genetic predisposition, environmental risk factors and autoimmunity to disease pathogenesis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2011;25:447-68.
45. Viatte S, Plant D, Han B, Fu B, Yarwood A, Thomson W, et al. Association of HLA-DRB1 haplotypes with rheumatoid arthritis severity, mortality and treatment response. *JAMA.* 2015;313:1645-56.
46. Balandraud N, Picard C, Revirón D, Landais C, Toussirot E, Lambert N, et al. HLA-DRB1 genotypes and the risk of developing anti citrullinated protein antibody (ACPA) positive rheumatoid arthritis. *PLoS One.* 2013;8:e64108.
47. Alvarez I, Collado J, Daura X, Colome N, Rodríguez-García M, Gallart T, et al. The rheumatoid arthritis-associated allele HLA-DR10 (DRB\*1001) shares part of its repertoire with HLA-DR1 (DRB1\*0101) and HLA-DR4 (DRB\*0401). *Arthritis Rheum.* 2008;58:1630-39.
48. Salvarani C, Macchioni L, Mantovani W, Bragliani M, Collina E, Cremonesi T, et al. HLA-DRB1 alleles associated with rheumatoid arthritis in Northern Italy: correlation with disease activity. *Br J Rheumatol* 1998;37:165-9.
49. Žunec R, Grubić Z, Jurčić Z, Dumić M, Kadrnka-Lovrenčić M, Kaštelan D, et al. Molecular Characterization of HLA Class II Genes in Three Autoimmune Disease in Croatian Patients. *Coll Antropol* 1996;20:43-6.
50. Benazet JF, Revirón D, Mercier P, Roux H, Roudier J. HLA-DRB1 alleles associated with rheumatoid arthritis in southern France. Absence of extraarticular disease despite expression of the shared epitope. *J Rheumatol* 1995;2:607-10.

51. Raychaudhuri S, Sandor C, Stahl EA, Freudenberg J, Lee HS, Jia X, et al. Five amino acids in three HLA proteins explain most of the association between MHC and seropositive rheumatoid arthritis. *Nat Genet.* 2012;44:291-6.
52. Laki J, Lundstrom E, Snir O, Rönnelid J, Ganji I, Catrina AI, et al. Very high levels of anti-citrullinated protein antibodies are associated with HLA-DRB1\*15 non-shared epitope allele in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2012;64:2078-84.
53. van der Helm-van Mil AH, Verpoort KN, le Cessie S, Huizinga TW, de Vries RR, Toes RE. The HLA-DRB1 shared epitope alleles differ in the interaction with smoking and predisposition to antibodies to cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum.* 2007;56:425-32.
54. Kapitány A, Szabó Z, Lakos G, Aleksza M, Végvári A, Soós L, et al. Associations between serum anti-CCP antibody, rheumatoid factor levels and HLA-DR4 expression in Hungarian patients with rheumatoid arthritis. *Isr Med Assoc J.* 2008;10:32-6.
55. Matthey DL, González-Gay MA, Hajeer AH, Dababneh A, Thomson W, García-Porrúa C, et al. Association between HLA-DRB1\*15 and secondary Sjögren's syndrome in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2000;27:2611-6.
56. Tokunaga NK, Noda R, Kaneoka H, Ogahara S, Murata T, Hiratsuka T, et al. Association between HLA-DRB1\*15 and Japanese patients with rheumatoid arthritis complicated by renal involvement. *Nephron.* 1999;81:165-71.
57. van der Helm-van Mil AH, Wesoly JZ, Huizinga TW. Understanding the genetic contribution to rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2005;17:299:304.
58. Irigoyen P, Lee AT, Wener MH, Li W, Kern M, Batliwalla F, et al. Regulation of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in rheumatoid arthritis: contrasting effects of HLA-DR3 and the shared epitope alleles. *Arthritis Rheum.* 2005;52:3813-18.
59. Verpoort KN, van Gaalen FA, van der Helm-van Mil AH, Schreuder GM, Breedveld FC, Huizinga TW, et al. Association of HLA-DR3 with anti-cyclic citrullinated peptide antibody-negative rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2005;52:3058-62.
60. Terao C, Ohmura K, Ikari K, Kochi Y, Maruya E, Katayama M, et al. ACPA-negative RA consists of two genetically distinct subsets based on RF positivity in Japanese. *PLoS One.* 2012;7:e40067.
61. Korczowska I. Rheumatoid arthritis susceptibility genes: An overview. *World J Orthop.* 2014;5:544-49.
62. Begovich AB, Carlton VE, Honigberg LA, Schrodi SJ, Chokkalingam AP, Alexander HC, et al. A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine

- phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet.* 2004;75:330-37.
63. Liang YL, Wu H, Shen X, Li PQ, Yang XQ, Liang L, et al. Association of STAT4 rs7574865 polymorphism with autoimmune diseases: a meta-analysis. *Mol Biol Rep.* 2012;39:8873-82.
  64. Plenge RM, Seielstad M, Padyukov L, Lee AT, Remmers EF, Ding B, et al. TRAF1-C5 as a risk locus for rheumatoid arthritis-a genomewide study. *N Engl J Med.* 2007;357:1199-209.
  65. Suzuki A, Yamada R, Chang X, Tokuhira S, Sawada T, Suzuki M, et al. Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat.Genet.* 2003;34:395-402.
  66. Chang X, Zhao Y, Sun S, Zhang Y, Zhu Y. The expression of PADI4 in synovium of rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2009;29:1411-16.
  67. van der Linden MP, Feitsma AL, le Cessie S, Kern M, Olsson LM, Raychaudhuri S, et al. Association of a single-nucleotide polymorphism in CD40 with the rate of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2009;60:2242-47.
  68. Kim YO, Kim HJ, Kim SK, Chung JH, Hong SJ. Association of the CD28/CTLA4/ICOS polymorphisms with susceptibility to rheumatoid arthritis. *Clin Chem Lab Med* 2010;48:345-53.
  69. Mohan VK, Ganesan N, Gopalakrishnan R. Association of susceptible genetic markers and autoantibodies in rheumatoid arthritis. *J Genet.* 2014;93:597-05.
  70. Klein K, Gay S. Epigenetic modifications in rheumatoid arthritis, a review. *Curr Opin Pharmacol.* 2013;13:420-25.
  71. Deane KD. Can rheumatoid arthritis be prevented? *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2013;27:467-85.
  72. Sugiyama D, Nishimura K, Tamaki K, Tsuji G, Nakazawa T, Morinobu A, et al. Impact of smoking as a risk factor for developing rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. *Ann Rheum Dis.* 2010;69:70-81.
  73. Chang K, Yang SM, Kim SH, Han KH, Park SJ, Shin JI. Smoking and rheumatoid arthritis. *Int J Mol Sci.* 2014;15:22279-95.
  74. Abhishek A, Butt S, Gadsby K, Zhang W, Deighton CM. Anti-TNF-alpha agents are less effective for the treatment of rheumatoid arthritis in current smokers. *J Clin Rheumatol.* 2010;16:15-8.
  75. Di Giuseppe D, Discacciati A, Orsini N, Wolk A. Cigarette smoking and risk of rheumatoid arthritis: a dose-response meta-analysis. *Arthritis Res Ther.* 2014;16:R61.

76. Klareskog L, Padyukov L, Rönnelid J, Alfredsson L. Genes, environment and immunity in the development of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Immunol.* 2006;18:650-5.
77. Källberg H, Padyukov L, Plenge RM, Rönnelid J, Gregersen PK, van der Helm-van Mil AHM, et al. Gene-Gene and Gene-Environment Interactions Involving HLA-DRB1, PTPN22, and Smoking in Two Subsets of Rheumatoid Arthritis. *Am J Hum Genet.* 2007;80:867-75.
78. Taylor LH, Twigg S, Worthington J, Emery P, Morgan AW, Wilson AG, et al. Meta-analysis of the association of smoking and PTPN22 R620W genotype on autoantibody status and radiological erosions in rheumatoid arthritis *J Rheumatol.* 2013;40:1048-53.
79. Baka Z, Buzás E, Nagy G. Rheumatoid arthritis and smoking: putting the pieces together. *Arthritis Res Ther.* 2009;11:238.
80. Shi J, Knevel R, Suwannalai P, van der Linden MP, Janssen GM, van Veelen PA, et al. Autoantibodies recognizing carbamylated proteins are present in sera of patients with rheumatoid arthritis and predict joint damage. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011;108:17372-7.
81. Brentano F, Kyburz D, Schorr O, Gay R, Gay S. The role of Toll-like receptor signalling in the pathogenesis of arthritis. *Cell Immunol.* 2005;233:90.
82. Rosengren S, Hoffman HM, Bugbee W, Boyle DL. Expression and regulation of cryopyrin and related proteins in rheumatoid arthritis synovium. *Ann Rheum Dis.* 2005;64:708.
83. Koziel J, Mydel P, Potempa J. The link between periodontal disease and rheumatoid arthritis: an updated review. *Curr Rheumatol Rep.* 2014;16:408.
84. Scher JU, Szczesnak A, Longman RS, Segata N, Ubeda C, Bielski C, et al. Expansion of intestinal *Prevotella copri* correlates with enhanced susceptibility to arthritis. *Elife.* 2013;2:e01202.
85. Lu B, Hiraki LT, Sparks JA, Malspeis S, Chen CY, Awosogba JA, et al. Being overweight or obese and risk of developing rheumatoid arthritis among women: a prospective cohort study. *Ann Rheum Dis.* 2014;73:1914-22.
86. Ellerby N, Matthey DL, Packham J, Dawes P, Hider SL. Obesity and comorbidity are independently associated with a failure to achieve remission in patients with established rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2014;73:e74.
87. Sandberg ME, Bengtsson C, Källberg H, Wesley A, Klareskog L, Alfredsson L, et al. Overweight decreases the chance of achieving good response and low disease activity in early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2014;73:2029-33.
88. Versini M, Jeandel PY, Rosenthal E, Shoenfeld Y. Obesity in autoimmune diseases: not a passive bystander. *Autoimmun Rev.* 2014;13:981-1000.

89. Di Giuseppe D, Alfredsson L, Bottai M, Askling J, Wolk A. Long term alcohol intake and risk of rheumatoid arthritis in women: a population based cohort study. *BMJ*. 2012;345:e4230.
90. Jin Z, Xiang C, Cai Q, Wei X, He J. Alcohol consumption as a preventive factor for developing rheumatoid arthritis: a dose-response meta-analysis of prospective studies. *Ann Rheum Dis*. 2014;73:1962-7.
91. Lahiri M, Morgan C, Symmons DP, Bruce IN. Modifiable risk factors for RA: prevention, better than cure? *Rheumatology (Oxford)*. 2012;51:499-512.
92. Bengtsson C, Nordmark B, Klareskog L, Lundberg I, Alfredsson L. Socioeconomic status and the risk of developing rheumatoid arthritis: results from the Swedish EIRA study. *Ann Rheum Dis*. 2005;64:1588-94.
93. Webber MP, Moir W, Zeig-Owens R, Glaser MS, Jaber N, Hall C, et al. Nested case-control study of selected systemic autoimmune diseases in World Trade Center rescue/recovery workers. *Arthritis Rheumatol*. 2015;67:1369-76.
94. Lang TJ. Estrogen as an immunomodulator. *Clin Immunol*. 2004;113:224-30.
95. Pedersen M, Jacobsen S, Klarlund M, Pedersen BV, Wiik A, Wohlfahrt J, et al. Environmental risk factors differ between rheumatoid arthritis with and without auto-antibodies against cyclic citrullinated peptides. *Arthritis Res Ther*. 2006;8:R133.
96. Marder W, Somers EC. Is pregnancy a risk factor for rheumatic autoimmune diseases? *Curr Opin Rheumatol*. 2014;26:321-8.
97. Jawaheer D, Lum RF, Gregersen PK, Criswell LA. Influence of male sex on disease phenotype in familial rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2006;54:3087-94.
98. Smolen JS, Aletaha D, Redlich K. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: new insights from old clinical data? *Nat Rev Rheumatol*. 2012;8:235-43.
99. Furst DE, Emery P. Rheumatoid arthritis pathophysiology: update on emerging cytokine and cytokine-associated cell targets. *Rheumatology (Oxford)*. 2014;53:1560-9.
100. Burmester GR, Feist E, Dörner T. Emerging cell and cytokine targets in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2014;10:77-8.
101. Muller-Ladner U, Ospelt C, Gay S, Distler O, Pap T. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther* 2007;9:223.
102. Poubelle PE, Chakravarti A, Fernandes MJ, Doiron K, Marceau AA. Differential expression of RANK, RANK-L, and osteoprotegerin by synovial fluid neutrophils from patients with

- rheumatoid arthritis and by healthy human blood neutrophils. *Arthritis Res Ther.* 2007;9:R25.
103. McInnes IB, Georg Schett G. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med* 2011;365:2205-19.
  104. Paleolog EM. The vasculature in rheumatoid arthritis: cause or consequence? *Int J Exp Pathol.* 2009;90:249-61.
  105. Lee DM, Weinblatt ME. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2001;358:903-11.
  106. Turesson C, McClelland RL, Christianson TJ, Matteson EL. Severe extra-articular disease manifestations are associated with an increased risk of first ever cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2007;66:70-5.
  107. Sayah A, English JC. Rheumatoid arthritis: a review of the cutaneous manifestations. *J Am Acad Dermatol.* 2005;53:191-209.
  108. Genta MS, Genta RM, Gabay C. Systemic rheumatoid vasculitis: a review. *Semin Arthritis Rheum.* 2006;36:88-98.
  109. Gabriel SE. Heart Disease and Rheumatoid Arthritis: Understanding the Risks. *Ann Rheum Dis.* 2010;69:61-64.
  110. Amital A, Shitrit D, Adir Y. The lung in rheumatoid arthritis. *Presse Med.* 2011;40:31-48.
  111. Vignesh AP, Srinivasan R. Ocular manifestations of rheumatoid arthritis and their correlation with anti-cyclic citrullinated peptide antibodies. *Clin Ophthalmol.* 2015;9:393-7.
  112. Vinicki JP, Pellet SC, De Rosa G, Dubinsky D, Laborde HA, Marini A, et al. Analysis of 65 Renal Biopsies From Patients With Rheumatoid Arthritis (1976-2015): Change in Treatment Strategies Decreased Frequency and Modified Histopathological Findings. *J Clin Rheumatol.* 2015;21:335-40.
  113. Balint GP, Balint PV. Felty's syndrome. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2004;18:631-45.
  114. Masuko K. Rheumatoid cachexia revisited: a metabolic co-morbidity in rheumatoid arthritis. *Front Nutr.* 2014;1:20.
  115. Haugeberg G, Ørstavik RE, Kvien TK. Effects of rheumatoid arthritis on bone. *Curr Opin Rheumatol.* 2003;15:469-75.
  116. Baecklund E, Iliadou A, Askling J, Ekbom A, Backlin C, Granath F, et al. Association of chronic inflammation, not its treatment, with increased lymphoma risk in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006;54:692-701.
  117. Raaschou P, Simard JF, Holmqvist M, Askling J; ARTIS Study Group. Rheumatoid arthritis, anti-tumour necrosis factor therapy, and risk of malignant melanoma: nationwide population based prospective cohort study from Sweden. *BMJ.* 2013;8:346:f1939.

118. Gabriel SE, Michaud K. Epidemiological studies in incidence, prevalence, mortality, and comorbidity of the rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther*. 2009;11:229.
119. Shen R, Ren X, Jing R, Shen X, Chen J, Ju S, et al. Rheumatoid Factor, Anti-Cyclic Citrullinated Peptide Antibody, C-Reactive Protein, and Erythrocyte Sedimentation Rate for the Clinical Diagnosis of Rheumatoid Arthritis. *Lab Med*. 2015;46:226-9.
120. Spengler J, Lugonja B, Jimmy Ytterberg A, Zubarev RA, Creese AJ, Pearson MJ, et al. Release of Active Peptidyl Arginine Deiminases by Neutrophils Can Explain Production of Extracellular Citrullinated Autoantigens in Rheumatoid Arthritis Synovial Fluid. *Arthritis Rheumatol*. 2015;67:3135-45.
121. Nishimura K, Sugiyama D, Kogata Y, Tsuji G, Nakazawa T, Kawano S, et al. Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med*. 2007;146:797-08.
122. de Vries-Bouwstra JK, Goekoop-Ruiterman YP, Verpoort KN, Schreuder GM, Ewals JA, Terwiel JP et al. Progression of joint damage in early rheumatoid arthritis: association with HLA-DRB1, rheumatoid factor, and anti-citrullinated protein antibodies in relation to different treatment strategies. *Arthritis Rheum*. 2008;58:1293-8.
123. Newkirk MM. Rheumatoid factors: what do they tell us? *J Rheumatol*. 2002;29:2034-40.
124. Klareskog L, Rönnelid J, Lundberg K, Padyukov L, Alfredsson L. Immunity to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:651-75.
125. Van Gaalen FA, Linn-Rasker SP, van Venrooij WJ, de Jong BAW, Breedveld FC, Verweij CL, et al. Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to rheumatoid arthritis in patients with undifferentiated arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50:709-15.
126. Rantapää-Dahlqvist S. What happens before the onset of rheumatoid arthritis? *Curr Opin Rheumatol*. 2009;21:272-8.
127. Avouac J, Gossec L, Dougados M. Diagnostic and predictive value of anti-cyclic citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: a systematic literature review. *Ann Rheum Dis* 2006;65:845-51.
128. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, et al. 2010 Rheumatoid Arthritis Classification criteria, An American College of Rheumatology/European League against Rheumatism Collaborative Initiative. *Arthritis Rheum* 2010;62:2569-81.
129. Seegobin SD, Ma MH, Dahanayake C, Cope AP, Scott DL, Lewis CM, et al. ACPA-positive and ACPA-negative rheumatoid arthritis differ in their requirements for



- combination DMARDs and corticosteroids: secondary analysis of a randomized controlled trial. *Arthritis Res Ther.* 2014;16:R13.
130. Rehman HU. Antinuclear antibodies: when to test and how to interpret findings. *J Fam Pract.* 2015;64:E5-8.
131. Potočki K, Bajramović D. Primjena radioloških metoda u reumatoidnom artritisu. *Reumatizam.* 2014;61:37-42.
132. van der Heijde DM. Joint erosions and patients with early rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol.* 1995;34:74-8.
133. Brown AK, O'Connor PJ, Roberts TE, Wakefield RJ, Karim Z, Emery P. Ultrasonography for rheumatologists: the development of specific competency based educational outcomes. *Ann Rheum Dis.* 2006;65:629-36.
134. Felson DT, Anderson JJ, Boers M, Bombardier C, Chernoff M, Fried B, et al. The american college of rheumatology preliminary core set of disease activity measures for rheumatoid arthritis clinical trials. *Arthritis Rheum* 1993;36:729-40.
135. Smolen JS, Breedveld FC, Schiff MH, Kalden JR, Emery P, Eberl G, et al. A simplified disease activity index for rheumatoid arthritis for use in clinical practice. *Rheumatology (Oxford).* 2003;42:244-57.
136. Aletaha D, Nell VP, Stamm T, Uffmann M, Pflugbeil S, Machold K, et al. Acute phase reactants add little to composite disease activity indices for rheumatoid arthritis: validation of a clinical activity score. *Arthritis Res Ther.* 2005;7:R796-806.
137. Wolfe F, Kleinheksel SM, Cathey MA, Hawley DJ, Spitz PW, Fries JF. The clinical value of the Stanford Assessment Questionnaire functional disability index in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 1988;15:1480-8.
138. Wolfe F, Michaud K, Gefeller O, Choi HK. Predicting mortality in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003;48:1530-42.
139. Landewé R, van der Heijde D. Radiographic progression in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2005;23:S63-S68.
140. Larsen A, Dale K, Eek M. Radiographic evaluation of rheumatoid arthritis and related conditions by standard reference films. *Acta Radiol Diagn* 1977;18:481-91.
141. Smolen JS, Aletaha D. Patients with rheumatoid arthritis in clinical care. *Ann Rheum Dis* 2004;63:221-25.
142. Markatseli TE, Voulgari PV, Alamanos Y, Drosos AA. Prognostic factors of radiological damage in rheumatoid arthritis: a 10-year retrospective study. *J Rheumatol.* 2011;38:44-52.

143. Suzuki T, Ikari K, Yano K, Inoue E, Toyama Y, Taniguchi A, et al. PADI4 and HLA-DRB1 are genetic risks for radiographic progression in RA patients, independent of ACPA status: results from the IORRA cohort study. *PLoS One*. 2013;8:e61045.
144. Jilani AA, Mackworth-Young CG. The role of citrullinated protein antibodies in predicting erosive disease in rheumatoid arthritis: a systematic literature review and meta-analysis. *Int J Rheumatol*. 2015;2015:728610.
145. Felson DT, Smolen JS, Wells G, Zhang B, van Tuyl LH, Funovits J, et al. American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism provisional definition of remission in rheumatoid arthritis for clinical trials. *Arthritis Rheum*. 2011;63:573-86.
146. Smolen JS, Aletaha D, Bijlsma JW, Breedveld FC, Boumpas D, Burmester G, et al. Treating rheumatoid arthritis to target: recommendations of an international task force. *Ann Rheum Dis*. 2010;69:631-7.
147. Smolen JS, Landewé R, Breedveld FC, Buch M, Burmester G, Dougados M, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2013 update. *Ann Rheum Dis*. 2014;73:492-509.
148. Crofford LJ. Use of NSAIDs in treating patients with arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 2013;15:S2.
149. Wassenberg S, Rau R, Steinfeld P, Zeidler H. Very low-dose prednisolone in early rheumatoid arthritis retards radiographic progression over two years: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum*. 2005;52:3371-80.
150. Smolen JS, van der Heijde D, Machold KP, Aletaha D, Landewé R. Proposal for a new nomenclature of disease-modifying antirheumatic drugs. *Ann Rheum Dis*. 2014;73:3-5.
151. Daien CI, Morel J. Predictive Factors of Response to Biological Disease Modifying Antirheumatic Drugs: Towards Personalized Medicine. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:386148.
152. Botica I. Franjevački samostan i crkva Sv. Marije u podgrađu Cetini pod Sinjem (primjer povijesnoga diskontinuiteta). *Povijesni prilozi* 2010;38:9-29.
153. Prevoo ML, van't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL. Modified disease activity scores that include twenty-eight –joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995;38:44-8.
154. Bruce B, Fries JF. The Health Assessment Questionnaire (HAQ). *Clin Exp Rheumatol* 2005;23:14-8.

155. Marinović I, Kaliterna DM, Smoljanović M, Radić M, Čečuk-Jeličić E, Bogdanić D, et al. The prevalence of rheumatoid arthritis in Split-Dalmatia County in southern Croatia is 0.24. *Joint Bone Spine*. 2015;pii: S1297-319X(15)00163-3.
156. Simonsson M, Bergman S, Jacobsson LT, Petersson IF, Svensson B. The prevalence of rheumatoid arthritis in Sweden. *Scand J Rheumatol* 1999; 28: 340-3.
157. Adomaviciute D, Pileckyte M, Baranauskaite A, Morvan J, Dadoniene J, Guillemain F. Prevalence survey of rheumatoid arthritis and spondyloarthropathy in Lithuania. *Scand J Rheumatol* 2008;37:113-9.
158. Aho K, Kaipiainen-Seppänen O, Heliövaara M, Klaukka T. Epidemiology of rheumatoid arthritis in Finland. *Semin Arthritis Rheum* 1998;27:325-34.
159. Symmons D, Turner G, Webb R, Asten P, Barrett E, Lunt M, et al. The prevalence of rheumatoid arthritis in the United Kingdom: new estimates for a new century. *Rheumatology (Oxford)* 2002;41:793-800.
160. Zlatković-Švenda M, Stojanović RM, B Šipetić-Grujičić S, Guillemain F. Prevalence of rheumatoid arthritis in Serbia. *Rheumatol Int* 2014;34:649-58.
161. Kaçar C, Gilgil E, Tuncer T, Bütün B, Urhan S, Arikan V, et al. Prevalence of rheumatoid arthritis in Antalya, Turkey. *Clin Rheumatol* 2005;24:212-4.
162. Costenbader KH, Chang SC, Laden F, Puett R, Karlson EW. Geographic variation in rheumatoid arthritis incidence among women in the United States. *Arch Intern Med* 2008;168:1664-70.
163. Roux CH, Saraux A, Le Bihan E, Fardellone P, Guggenbuhl P, Fautrel B, et al. Rheumatoid arthritis and spondyloarthropathies: geographical variations in prevalence in France. *J Rheumatol* 2007;34:117-22.
164. Jordan K, Clarke AM, Symmons DP, Fleming D, Porcheret M, Kadam UT, et al. Measuring disease prevalence: a comparison of musculoskeletal disease using four general practice consultation databases. *Br J Gen Pract* 2007;57:7-14.
165. Andrianakos A, Trontzas P, Christoyiannis F, Kaskani E, Nikolia Z, Tavaniotou E, et al. Prevalence and management of rheumatoid arthritis in the general population of Greece-the ESORDIG study. *Rheumatology* 2006;45:1549-54.
166. de Almeida DE, Ling S, Holoshitz J. New insights into the functional role of the rheumatoid arthritis share epitope. *FEBS Lett*. 2011;585:3619-26.
167. Laktašić Žerjavić N, Soldo Jureša D, Babić-Naglić Đ, Ćurković B, Potočki K, Žunec R, et al. Raspodjela HLA-DRB1 gena u hrvatskih bolesnika s artritismom. *Reumatizam* 2005;52:12-6.

168. Reviron D, Perdriger A, Toussiro E, Wendling D, Balandraud N, Guis S, et al. Influence of shared epitope negative alleles on genetic susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2001;44:535-54.
169. Yelamos J, Garcia-Lozano JR, Moreno I, Aguilera I, Gonzalez MF, Garcia A, et al. Association of HLA-DR4-Dw15 (DRB1\*0405) and DR10 with rheumatoid arthritis in a Spanish population. *Arthritis Rheum.* 1993;36:811-4.
170. Pascual M, Nieto A, López-Nevot MA, Ramal L, Matarán L, Caballero A, et al. Rheumatoid arthritis in southern Spain: toward elucidation of a unifying role of the HLA class II region in disease predisposition. *Arthritis Rheum.* 2001;44:307-14.
171. Hajeer AH, Dababneh A, Makki RF, Thomson W, Poulton K, González-Gay MA, et al. Different gene loci within the HLA-DR and TNF regions are independently associated with susceptibility and severity in Spanish rheumatoid arthritis patients. *Tissue Antigens.* 2000;55:319-25.
172. Uçar F, Karkucak M, Alemdaroglu E, Capkin E, Yücel B, Sönmez M, et al. HLA-DRB1 allele distribution and its relation to rheumatoid arthritis in eastern Black Sea Turkish population. *Rheumatol Int* 2012;32:1003-7.
173. Batmaz I, Sariyildiz MA, Dilek B, Yidiz I, Nas K, Ayyıldız O, et al. HLA-DRB1 Alleles Distribution in Patients With Rheumatoid Arthritis in A Tertiary Center in the Southeastern Anatolia Region of Turkey. *Turk J Phys Med Rehab* 2013;59:123-7.
174. Hughes LB, Morrison D, Kelley JM, Padilla MA, Vaughan LK, Westfall AO, et al. The HLA-DRB1 shared epitope is associated with susceptibility to rheumatoid arthritis in African Americans through European genetic admixture. *Arthritis Rheum.* 2008;58:349-58.
175. Bongio SM, Porfirio B, Rombolà G, Palasciano A, Beneforti E, Bianucci G. Shared-epitope HLA-DRB1 alleles and sex ratio in Italian patients with rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine.* 2004;71:24-8.
176. Jun KR, Choi SE, Cha CH, Oh HB, Heo YS, Ahn HY, et al. Meta-analysis of the association between HLA-DRB1 allele and rheumatoid arthritis susceptibility in Asian populations. *J Korean Med Sci.* 2007;22:973-80.
177. Yukioka M, Wakitani S, Murata N, Toda Y, Ogawa R, Kaneshige T, et al. Elderly-onset rheumatoid arthritis and its association with HLA-DRB1 alleles in Japanese. *Br J Rheumatol.* 1998;37:98-101.
178. Seidl C, Körbitzer J, Badenhoop K, Seifried E, Hoelzer D, Zanelli E, et al. Protection against severe disease is conferred by DERAAs-bearing HLA-DRB1 alleles among HLA-DQ3 and HLA-DQ5 positive rheumatoid arthritis patients. *Hum Immunol.* 2001;62:523-9.

179. Szodoray P, Szabo Z, Kapitany A, Gyetvai A, Lakos G, Szántó S, et al. Anti-citrullinated protein/peptide autoantibodies in association with genetic and environmental factors as indicators of disease outcome in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev.* 2010;9:140-43.
180. Wagner U, Kaltenhauser S, Sauer H, Arnold S, Seidel W, Hantzchel H, et al. HLA markers and prediction of clinical course and outcome in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1997;40:341-51.
181. Emery P, McInnes IB, van Vollenhoven R, Kraan MC. Clinical identification and treatment of a rapidly progressing disease state in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2008;47:392-8.
182. Balsa A, Minaur NJ, Pascual-Salcedo D, McCabe C, Balas A, Fiddament B, et al. Class II MHC antigens in early rheumatoid arthritis in Bath (UK) and Madrid (Spain). *Rheumatology (Oxford)*. 2000;39:844-9.
183. de Vries N, Rønningen KS, Tilanus MG, Bouwens-Rombouts A, Segal R, Egeland T. HLA-DR1 and rheumatoid arthritis in Israeli Jews:sequencing reveals that DRB1\*0102 is the predominant HLA-DR1 subtype. *Tissue Antigens*. 1993;41:26-30.
184. van der Helm-van Mil AH, Verpoort KN, Breedveld FC, Huizinga TW, Toes RE, de Vries RR. The HLA-DRB1 shared epitope alleles are primarily a risk factor for anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and are not an independent risk factor for development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2006;54:1117-21.
185. Newton JL, Harney SM, Wordsworth BP, Brown MA. A review of the MHC genetics of rheumatoid arthritis. *Genes Immun*. 2004;5:151-7.
186. Mackie SL, Taylor JC, Martin SG, Wordsworth P, Steer S. A spectrum of susceptibility to rheumatoid arthritis within HLA-DRB1: stratification by autoantibody status in a large UK population. *Genes Immun*. 2012;13:120-8.
187. Scally SW, Petersen J, Law SC, Dudek NL, Nel HJ, Loh KL, et al. A molecular basis for the association of the HLA-DRB1 locus, citrullination, and rheumatoid arthritis. *J Exp Med*. 2013;210:2569-82.
188. Suzuki A, Yamamoto K. From genetics to functional insights into rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2015;33(4 Suppl 92):S40-3.
189. Tuokko J, Nejentsev S, Luukkainen R, Toivanen A, Ilonen J. HLA haplotype analysis in Finnish patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2001;44:315-22.
190. Fries JF, Wolfe F, Apple R, Erlich H, Bugawan T, Holmes T, et al. HLA-DRB1 genotype associations in 793 white patients from a rheumatoid arthritis inception cohort: frequency, severity, and treatment bias. *Arthritis Rheum*. 2002;46:2320-9.

191. Mewar D, Coote A, Moore DJ, Marinou I, Keyworth J, Dickson MC, et al. Independent associations of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor with radiographic severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2006;8:R128.
192. Boki KA, Drosos AA, Tzioufas AG, Lanchbury JS, Panayi GS, Moutsopoulos HM. Examination of HLA-DR4 as a severity marker for rheumatoid arthritis in Greek patients. *Ann Rheum Dis.* 1993;52:517-9.
193. Kinikli G, Ateş A, Turgay M, Akay G, Kinikli S, Tokgoz G. HLA-DRB1 genes and disease severity in rheumatoid arthritis in Turkey. *Scand J Rheumatol* 2003;32:277-80.
194. Mourad J, Monem F. HLA-DRB1 allele association with rheumatoid arthritis susceptibility and severity in Syria. *Rev Bras Reumatol.* 2013;53:47-56.
195. Karlson EW, Ding B, Keenan BT, Liao K, Costenbader KH, Klareskog L, et al. Association of environmental and genetic factors and gene-environment interactions with risk of developing rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2013;65:1147-56.
196. de Vries R. Genetics of rheumatoid arthritis: time for a change! *Curr Opin Rheumatol* 2011; 23:227–32.
197. Tan RJ, Gibbons LJ, Potter C, Hyrich KL, Morgan AW, Wilson AG, et al. Arthritis Research Campaign Epidemiology Unit, University of Manchester, UK. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2010;69:1029-35.

## 10. PRILOZI

### Prilog 1.

#### ANKETNI UPITNIK ZA OBOLJELE OD REUMATOIDNOG ARTRITISA

1. Liječnik: \_\_\_\_\_
2. Ustanova u kojoj se liječi: \_\_\_\_\_
3. Datum ispunjavanja ankete: \_\_\_\_\_
4. Anketar: \_\_\_\_\_

#### I Opći podatci o bolesniku:

1. Ime i prezime: \_\_\_\_\_
2. Šifra: \_\_\_\_\_
3. Spol:           **1 M**           **2 Ž**
4. Telefon: \_\_\_\_\_
5. E-mail: \_\_\_\_\_
6. Mjesto stanovanja: \_\_\_\_\_
7. Adresa: \_\_\_\_\_
8. Datum i mjesto rođenja: \_\_\_\_\_
9. Mjesto rođenja oca: \_\_\_\_\_
10. Mjesto rođenja majke: \_\_\_\_\_
11. Mjesto rođenja bake po ocu: \_\_\_\_\_
12. Mjesto rođenja djeda po ocu: \_\_\_\_\_
13. Mjesto rođenja bake po majci: \_\_\_\_\_
14. Mjesto rođenja djeda po majci: \_\_\_\_\_
15. Bračni status:  
**1 oženjen/udata 2 neoženjen/neudata 3 rastavljen/-a 4 udovac/-ica**
16. Stupanj obrazovanja:  
**1 bez osnovne škole 2 završena osnovna škola 3 završena srednja škola**  
**4 završena viša škola 5 završen fakultet 6 magisterij, doktorat i sl.**
17. Zanimanje: \_\_\_\_\_
18. Radni status: **1 zaposlen 2 nezaposlen 3 u mirovini**
19. Ako ste umirovljeni razlog umirovljenja je:  
**1 nesposobnost zbog RA 2 starosna mirovina 3 napunjene godine staža 4 drugo**
20. Ukoliko ste koristili bolovanje zbog RA navedite broj dana u proteklih 12 mjeseci:  
\_\_\_\_\_

21. Ukoliko ste nezaposleni navedite koliko ste puta u tijeku godine posjetili doktora zbog smetnji uzrokovanih RA: \_\_\_\_\_

22. Mjesečna primanja:

**1** manja od 4000 kn **2** 4000-6000 **3** 6000- 8000 **4** 8000-12000 kn

**5** veća od 12 000 kn

23. Koliko članova obitelji živi od navedenih primanja: \_\_\_\_\_

## II Funkcije i navike:

1. Tjelesna visina \_\_\_\_\_ cm; tjelesna težina \_\_\_\_\_ kg

BMI \_\_\_\_\_ (<18.5 kg / m<sup>2</sup> ; 18.5 do <25 kg / m<sup>2</sup> , 25 do < 30kg/cm<sup>2</sup> >30 kg /cm<sup>2</sup>)

Krvni tlak : \_\_\_\_\_ mmHg

2. Menarhe \_\_\_\_\_ Poroda \_\_\_\_\_ Spontani pobačaji \_\_\_\_\_

Arteficijalni pobačaji \_\_\_\_\_ Menopauza \_\_\_\_\_

3. Oralni kontraceptivi:

**1** DA Koji? \_\_\_\_\_ Trajanje terapije? \_\_\_\_\_

**2** NE

4. Hormonalna nadomjesna terapija:

**1** DA Koja? \_\_\_\_\_ Trajanje terapije? \_\_\_\_\_

**2** NE

5. Pušenje:

**1** nepušač **2** bivši pušač **3** pušač

Ako ste pušač/bivši pušač molim Vas odgovorite na slijedeća pitanja:

a) Koje godine ste počeli pušiti? \_\_\_\_\_

b) Što pušite/ste pušili? **1** cigarete \_\_\_\_\_ **2** cigare **3** lulu

c) Koliko cigareta dnevno popušite/ ste pušili? \_\_\_\_\_

d) Koje godine ste prestali pušiti? \_\_\_\_\_

6. Alkohol:

**1** ne pije **2** prestao/la piti **3** pije

Ako pijete alkohol molim Vas odgovorite na slijedeća pitanja:

a) Koliko ste često tijekom proteklog mjeseca konzumirali alkoholna pića (barem jedno alkoholno piće dnevno)?

**1** nijedan dan **2** 1-5 dana **3** 6-10 dana **4** >10 dana

Koliko alkoholnih pića popijete tijekom jednog tjedna?

**1** 0 pića tjedno **2** 0-5 **3** 5-10 **4** 10-15 **5** Više od 15

7. Koliko kava popijete dnevno?: **1** nijednu **2** 1 **3** 2-3 **4** više od 3

8. Koliko sati spavate dnevno?: **1** 8 sati **2** 6-8 sati **3** 4-6 sati **4** manje od 4 sata

9. Rekreacija: **1** Ne **2** Svakodnevno **3** 2-3x tjedno



### III Obiteljska anamneza:

(1- otac 2- majka, 3- brat ili sestra, 4- bliski rođak, 5- daljnji rođak 6- više članova uze obitelji 7- više članova daljnje obitelji 8- nema nitko)

1 artritis (nepoznate etiologije) Ako DA, tko u obitelji? \_\_\_\_\_

2 osteoartritis Ako DA, tko u obitelji? \_\_\_\_\_

3 giht Ako DA, tko u obitelji? \_\_\_\_\_

4 juvenilni kronični artritis Ako DA, tko u obitelji? \_\_\_\_\_

5 SLE Ako DA, tko u obitelji? \_\_\_\_\_

6 reumatoidni artritis Ako DA, tko u obitelji? \_\_\_\_\_

7 ankilozantni spondilitis Ako DA, tko u obitelji? \_\_\_\_\_

8 osteoporoza Ako DA, tko u obitelji? \_\_\_\_\_

9 kolitis Ako DA, tko u obitelji? \_\_\_\_\_

10 psorijaza Ako DA, tko u obitelji? \_\_\_\_\_

11 tuberkuloza Ako DA, tko u obitelji? \_\_\_\_\_

12 dijabetes Ako DA, tko u obitelji? \_\_\_\_\_

13 struma Ako DA, tko u obitelji? \_\_\_\_\_

### IV Osobna anamneza- komorbiditet:

1. opći \_\_\_\_\_

2. očni poremećaji \_\_\_\_\_

3. uho, grlo, nos \_\_\_\_\_

4. respiratorni poremećaji \_\_\_\_\_

5. kardiovaskularni poremećaji \_\_\_\_\_

6. gastrointestinalni poremećaji \_\_\_\_\_

7. genitourinarni poremećaji \_\_\_\_\_

8. muskuloskeletni poremećaji \_\_\_\_\_

9. neurološki poremećaji \_\_\_\_\_

10. endokrini/metabolički poremećaji \_\_\_\_\_

11. hematološki poremećaji \_\_\_\_\_

12. kožne promjene \_\_\_\_\_

13. psihijatrijski poremećaji \_\_\_\_\_

14. alergije \_\_\_\_\_

15. drugo \_\_\_\_\_

Jeste li preboljeli neku od ovih upalnih infektivnih bolesti?:

- 1 mononukleozu \_\_\_\_\_
- 2 upalu zubnog mesa \_\_\_\_\_
- 3 upalu urogenitalnog trakta \_\_\_\_\_
- 4 upalu gastrointestinalnog trakta \_\_\_\_\_
- 5 respiratorne upale \_\_\_\_\_
- 6 kožne upale \_\_\_\_\_

Jesu li vam ikad tijekom života iz tjelesnih uzoraka izolirani neki od ovih uzročnika upale?:

- 1 Parvo B19
- 2 Epstein-Barr virus
- 3 Mycobacterium tuberculosis
- 4 Proteus mirabilis
- 5 Escherichia coli
- 6 Retrovirusi
- 7 Mycoplasma pneumoniae
- 8 Chlamydia
- 9 Ostalo

**V. Podatci vezani uz bolest / RA /**  
*(Ove podatke unosi liječnik/anketar)*

1. Početak zglobnih simptoma: \_\_\_\_\_ godina
2. Dijagnoza RA prema ACR kriterijima: – godina
3. Funkcionalni stadij bolesti / ACR / : I II III IV
4. Aktivnost bolest DAS 28 (SE) \_\_\_\_\_
5. broj bolnih zglobova \_\_\_\_\_ broj otečenih zglobova \_\_\_\_\_
6. Funkcionalna sposobnost HAQ
7. Bol VAS \_\_\_\_\_
8. Bolesnikova procjena aktivnosti bolesti VAS (0-100) \_\_\_\_\_
9. Liječnikova procjena aktivnosti bolesti VAS (0-100) \_\_\_\_\_
10. Strukturne promjene / Rtg šaka i stopala / stupanj prema LARSENUI II III IV- V
11. Laboratorij: SE \_\_\_\_\_ CRP \_\_\_\_\_
12. Anti CCP 1 pozitivan \_\_\_\_\_ 2 negativan
13. RF 1 pozitivan \_\_\_\_\_ 2 negativan
14. antigeni HLA / serološka tipizacija / HLA- DR \_\_\_\_
15. geni HLA / molekularna tipizacija / HLA DR B1 \_\_\_\_
16. ultrazvuk srca
17. rtg pluća
18. markeri hepatitisa
19. kvantiferonski test za TBC i PPD

### Vanzglobne manifestacije RA:

- 1 Reumatoidni čvorići    2 Vaskulitis    3 Sicca sindrom    4 Limfadenopatija  
5 Pleuritis    6 Intersticijska / nodozna bolest pluća    7 Perikarditis  
8 Amiloidoza    9 Splenomegalija    10 Feltijev sindrom  
11 Perifernaneuropatija    12 Episkleritis, skleritis  
13 Sekundarni antifosfolipidni sindrom    14 Drugo \_\_\_\_\_

### Kirurški zahvati zbog RA

- 1 TEP kuk koljeno  
2 sinovijektomija \_\_\_\_\_  
3 ostalo \_\_\_\_\_

### VI Terapija reumatoidnog artritisa:

#### DMARD

Naziv lijeka	Doza(mg/dan)	Trajanje liječenja
• Klorokin	_____	_____
• Sulfasalazin	_____	_____
• Metotreksat	_____	_____
• Arava	_____	_____
• Soli zlata	_____	_____
• Azatioprin	_____	_____
• Ciklosporin	_____	_____

#### BIOLOŠKA TERAPIJA

Naziv lijeka	Doza(mg/dan)	Trajanje liječenja
• Etanercept	_____	_____
• Infliksimab	_____	_____
• Adalimumab	_____	_____
• Golimumab	_____	_____
• Rituksimab	_____	_____
• Tocilizumab	_____	_____
• Abatacept	_____	_____

**GLUKOKORTIKOIDI**

Naziv lijeka	Način primjene (pulsna terapija, lokalne infiltracije)	Doza(mg/dan)	Trajanje liječenja
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____

**NSAR**

Naziv lijeka	Doza(mg/dan)	Trajanje liječenja
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

**Ostala terapija:**

Naziv lijeka	Doza(mg/dan)	Trajanje liječenja
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

Je li bilo nuspojava na gore navedene lijekove (ukoliko je odgovor potvrđan, navedite koje su to nuspojave bile):      1 Da      2 Ne \_\_\_\_\_

Koristite li još neke lijekove za neku drugu bolest (ukoliko je odgovor potvrđan, navedite koji su to lijekovi):      1 Da      2 Ne \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Kliničko ispitivanje      1 Da      2 Ne

\_\_\_\_\_  
*Potpis ispitanika*

\_\_\_\_\_  
*Potpis voditelja istraživanja*

## Prilog 2.

### DAS28 INDEKS

Ime:

Prezime:

Datum rođenja:

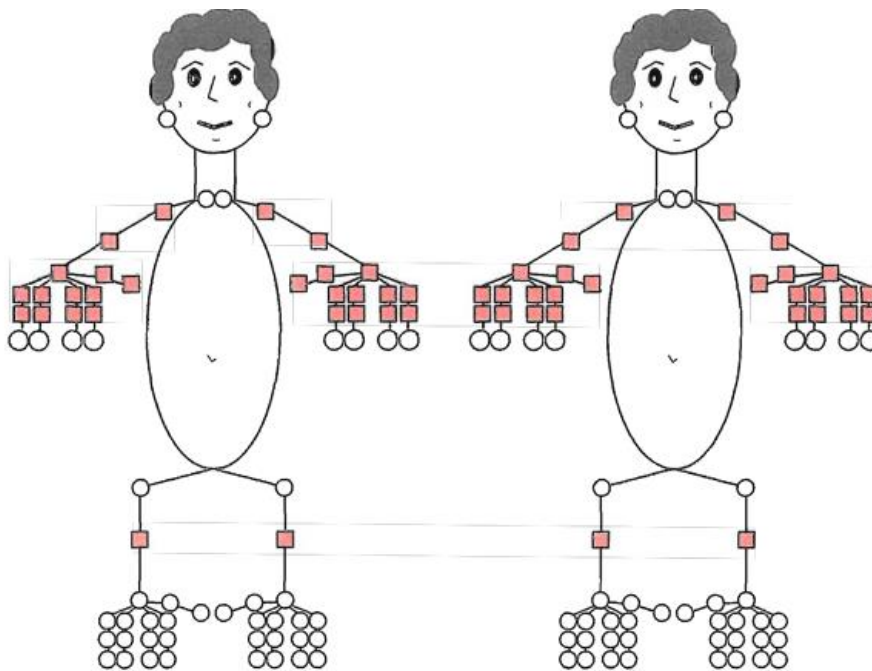
Datum pregleda:

ZGLOBOVI BOLNI NA DODIR

(br. zbd.):

OTEČENI ZGLOBOVI

(br. oz.):



Sedimentacija eritrocita (SE) nakon 1h (mm):

Bolesnikova procjena aktivnosti bolesti (VAS; mm):

0

100

Nema  
aktivnosti

Najjača moguća  
aktivnost

$$\text{DAS28} = 0,56 \times \sqrt{\text{br.zbd.}} + 0,28 \times \sqrt{\text{br.oz.}} + 0,7 \times \ln(\text{SE}) + 0,0142 \times \text{VAS}$$

Potpis liječnika:

### Prilog 3.

## HAQ-DI UPITNIK

Ime i prezime:

Datum ispitivanja:

Molimo znakom x označite u odgovarajućim kvadratićima onaj odgovor koji opisuje Vaše mogućnosti tijekom proteklog tjedna :

	Bez ikakvih teškoća 0	Snešto teškoća 1	S puno teškoća 2	Nesposoban za to 3
<b>1. OBLAČENJE I NJEGA</b> Možete li:				
a) Sami obući, zavezati cipele i zakopčati gumbe?				
b) oprati kosu?				
<b>2. USTAJANJE</b> Možete li:				
a) ustati iz stolca bez oslanjanja na ruke?				
b) ući i izaći iz postelje?				
<b>3. HRANJENJE</b> Možete li:				
a) narezati meso?				
b) podignuti napunjenu čašu ili šalicu do usta?				
c) otvoriti mlijeko u kartonskom pakiranju?				
<b>4. HODANJE</b> Možete li:				
a) šetati po ravnom?				
b) popeti se uz 5 stepenica?				

<b>5. HIGIJENA</b>				
Možete li:				
a) oprati i obrisati cijelo tijelo?				
b) okupati se u kadi?				
c) sjesti i dignuti se sa zahodske školjke?				
<b>6. DOHVATANJE</b>				
Možete li:				
a) dohvatiti i spustiti predmet težak 3 kg koji je iznad vaše glave?				
b) sagnuti se i podignuti odjeću s poda?				
<b>7. HVATANJE</b>				
Možete li:				
a) otvoriti vrata automobila?				
b) otvoriti staklenke koje su već bile otvorene?				
c) otvoriti i zatvoriti slavinu				
<b>8. AKTIVNOSTI</b>				
Možete li:				
a) obavljati svakodnevne poslove i kupovinu?				
b) sjesti u auto i izići iz auta?				
c) usisavati prašinu ili raditi lakše poslove u kući ili vrtu?				

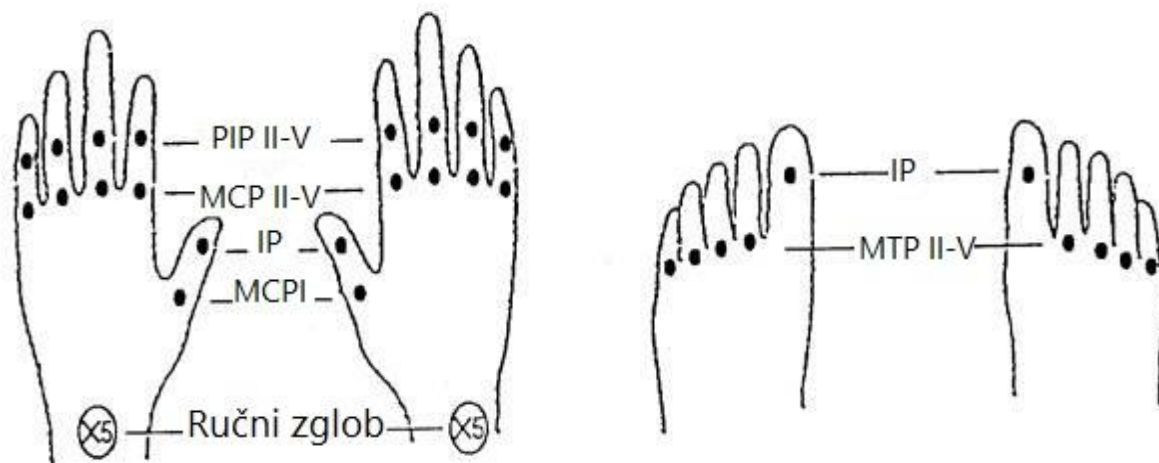
HAQ bodovi (0-3): \_\_\_\_\_

## Prilog 4.

### ODREĐIVANJE STUPNJA RADIOLOŠKIH PROMJENA PREMA LARSENU

Ime i prezime :

Datum ispitivanja:



**0.** stupanj : normalan nalaz

**1.** stupanj : paraartikularna oteklina mekih tkiva

paraartikularna osteoporoza

blago suženje zglobnog prostora

**2.** stupanj : erozije i suženje zglobnog prostora ,osim nosivih zglobova

**3.** stupanj : srednje velike destruktivne promjene

erozije i suženje zglobnog prostora odgovarajući standardu

(suženje zglobnog prostora za više od  $\frac{1}{2}$  zgloba)

**4.** stupanj: jake destruktivne promjene

erozije i suženje zglobnog prostora odgovarajući standardu

koštane deformacije nosivih zglobova

**5.** stupanj: mutilirajuće promjene

nema normalne zglobne površine

velike koštane deformacije nosivih zglobova

Potpis ispitivača:



## 11. ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Splitu 27. 12. 1961. godine, gdje sam završila osnovnu i srednju školu. Diplomirala sam na Medicinskom studiju u Splitu, Medicinskog fakulteta Zagreb, 1987. godine s prosjekom ocjena 4.67. Pripravnički staž obavila sam u KBC Split. Tri godine radila sam kao liječnik obiteljske medicine u DZ Omiš. 1995. godine položila sam specijalistički ispit iz fizikalne medicine i rehabilitacije. 2008. godine položila sam subspecijalistički ispit iz reumatologije. Predavač sam na dodiplomskom i diplomskom studiju Fizioterapije Sveučilišta u Splitu. Asistent sam na katedri Fizikalna i rehabilitacijska medicina Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu. U ulozi mentora sudjelujem u specijalističkom usavršavanju specijalizanata fizikalne medicine i rehabilitacije. Član sam Hrvatskoga reumatološkog društva, Hrvatskog društva za fizikalnu medicinu i rehabilitaciju, Hrvatske liječničke komore i Hrvatskoga liječničkog zbora. Koautor sam 10 znanstvenih radova od kojih su 4 indeksirana u Current Contents-u.

Ivanka Marinović, dr. med.

Zavod za fizikalnu medicinu i rehabilitaciju s reumatologijom

KBC Split

Šoltanska 1

imarinovic27@net.hr