



Procena stepena kliničke aktivnosti reumatoidnog artritisa na osnovu koncentracija citokina TNF-alfa, IL-12, IL-15 i IL-18 u serumu i sinovijalnoj tečnosti

Evaluation of the degree of clinical rheumatoid arthritis activity based on the concentrations of cytokines TNF- α , IL-12, IL-15, and IL-18 in serum and synovial fluid

Ljiljana Petrović-Rackov

Vojnomedicinska akademija, Klinika za reumatologiju i kliničku imunologiju, Beograd

Apstrakt

Uvod/Cilj. Eksperimentna istraživanja in vitro i in vivo na mišjem modelu potvrdila su da citokini, tumor nekroza faktor- α (TNF- α), interleukini IL-12, IL-15 i IL-18 učestvuju u patogenezi erozivnog inflamacijskog artritisa. Cilj istraživanja bio je da se utvrdi klinički značaj koncentracija citokina u proceni aktivnosti reumatoidnog artritisa (RA). **Metode.** U četvorogodišnjem periodu pratili smo 64 bolesnika sa RA, novonastalim ili u fazi pogoršanja bolesti. Pratili smo kliničke manifestacije bolesti na osnovu kojih smo bolesnike podelili u tri grupe: bolesnici sa visokoaktivnim RA, bolesnici sa umereno aktivnim RA i bolesnici sa blago aktivnim RA. Kontrolnu grupu (25 bolesnika) činili su bolesnici sa osteoartrózom i artritisom kolena. Svim bolesnicima je u uzorcima određivana koncentracija citokina, TNF- α , IL-12, IL-15 i IL-18 imunoenzimskim metodama korišćenjem kitova za humane interleukine. **Rezultati.** Poređenjem koncentracija citokina kod 30 bolesnika sa visoko, 14 sa umereno i 20 bolesnika sa blago aktivnim RA utvrđeno je da bolesnici sa visokim stepenom aktivnosti oboljenja imaju značajno veće koncentracije ispitivanih citokina u krvi i sinovijalnoj tečnosti u odnosu na bolesnike sa umereno i blago aktivnim oboljenjem ($p < 0,01$; $p < 0,05$) i da postoji povezanost ($p < 0,01$) koncentracija citokina u krvi i sinovijalnoj tečnosti sa vrednostima skora aktivnosti bolesti (*Disease Activity Score*) 28. **Zaključak.** Koncentracije citokina mogu biti korisni pokazatelji stepena opšte aktivnosti RA. Rad može pružiti doprinos razjašnjenju nedovoljno poznate uloge i značaja određivanja IL-18, IL-15, IL-12 i TNF- α u patogenezi RA.

Cljučne reči:

arthritis, reumatoidni; bolest, indeks težine; citokini; interleukini; faktor nekroze tumora- α ; sinovijalna tečnost.

Abstract

Background/Aim. Experimental in vitro and in vivo investigations in a mouse model have proved that TNF- α , IL-12, IL-15 and IL-18 participate in the pathogenesis of erosive inflammatory arthritis. The aim of this research was to determine the clinical significance of cytokines in the evaluation of the activity of rheumatoid arthritis (RA). **Methods.** Inside a 4-year period we followed-up 64 patients with RA as newly occurred or in the phase of worsening. We observed the clinical manifestation of the disease upon which we divided the patients in to 3 groups: the patients with low active RA, patients with moderate active RA, and the patients with wild active RA. The control group ($n = 25$ patients) included the patients with osteoarthritis (OA), and arthritis of the knee. In the samples of serum of all of the patients the concentration of cytokines TNF- α , IL-12, IL-15, and IL-18 were determined using the immunoenzymatic methods in mice for human interleukines. By comparing the concentrations in 30 patients with the high, 14 patients with moderate, and 20 patients with the mild activity of RA it was determined that the patients with the high degree of the disease activity, had significantly high ($p < 0.01$; $p < 0.05$) concentrations of the examined cytokines in blood and synovial fluid as compared to the patients with the moderate and mild active disease. There was a relationship ($p < 0.01$) between the concentrations of cytokines in blood and synovial fluid with the quantity of the Disease Activity Score in 28 joints. **Conclusions.** Cytokines concentrations could be good indicators of the degree of the general activity of RA. This research could contribute to the interpretation of insufficiently well known views of the pathogenesis role and significance of cytokines in an active disease.

Key words:

arthritis, rheumatoid; severity of illness index; cytokines; tumor necrosis factor- α ; interleukins; synovial fluid.

Uvod

Reumatoidni artritis (RA) je idiopatsko hronično oboljenje u čijoj osnovi je perzistentni, progresivni i destruktivni sinovitis autoimunske prirode, koji tokom vremena dovodi do ireverzibilnog anatomskeg oštećenja zglobova, deformacija i ankiloze, čija posledica je invaliditet¹. Većina epidemioloških, patofizioloških, imunoloških i genetičkih aspekata bolesti je dobro poznata, ali pokretač i faktori koji održavaju proces inflamacije još uvek nisu definisani. Zbog toga nije neobična tvrdnja da je RA bolest sa mnogo uzroka ili više bolesti sa jednim uzrokom². Oštećenje sinovije zgloba delovanjem infektivnog agensa ili delovanjem drugih mehanizama predstavlja početak inflamacijskog odgovora. Glavni uzročnici rane imunske reakcije u RA su T-limfociti, posebno CD4+ ćelije koje indukuju pomoć (TH) i pokreću čitav niz daljih događanja³. U prvoj fazi imunske reakcije odvija se prepoznavanje i prezentacija nepoznatog antigena T-ćelijama. Tokom druge faze nastaje proliferacija autoreaktivnih klonova T i B limfocita, migracije inflamacijskih ćelija u zglob i angiogeneza. U trećoj, imunskoj fazi bolesti ćelijske komponente zgloba reaguju na oštećenje promenom funkcionalnog profila, dešavaju se promene u endotelu malih krvnih sudova i hiperplastička reakcija sinovije. U četvrtoj fazi oboljenja formira se panus, metabolički aktivno i autonomno tkivo zgloba. Citokini koje proizvode makrofagi i aktivirani T-limfociti, na prvom mestu interleukin-1 (IL-1), tumor nekroza faktor-alfa (TNF-alfa), interferon-gama (IFN-gama) i mnogi drugi, stimulišu sinovijske ćelije da stvaraju hidrolitičke enzime. Metaloproteinaze učestvuju u degradaciji i remodelovanju ekstracelularnog matriksa menjajući u njemu ravnotežu između proizvodnje i degradacije. U petoj fazi imunske reakcije nastaje destrukcija zglobne hrskavice, kosti i okolnih struktura⁴.

Citokini učestvuju u svim etapama inflamacijskog procesa uključujući adheziju i migraciju ćelija; aktivaciju, diferencijaciju i proliferaciju; angiogenezu u sinoviji; destrukciju i oporavak tkiva i periartikularnu resorpciju kosti⁵. U inflamiranom tkivu citokini su u interakciji međusobno i sa ostalim rastvorljivim medijatorima sa kojima formiraju regulatornu mrežu medijatora unutar sinovije. Ravnoteža citokina regulisana je mehanizmom povratne sprege i njihovim suprotnim efektima. Održavanje inflamacije i njen ishod zavisi od neravnoteže proinlamacijskih i antiinlamacijskih medijatora⁶. TNF-alfa i IL-1 su glavni proinlamacijski citokini koji imaju uticaj na sve aspekte RA^{7,8}. Najnovija istraživanja bazirana na eksperimentnim rezultatima *in vitro* na humanom sinovijskom tkivu i *in vivo* na mišjem modelu artritisa koji je indukovano kolagenom, pokazala su značajnu ulogu nekoliko novih citokina, IL-12, IL-15 i IL-18 u nastanku erozivnog inflamacijskog artritisa⁹⁻¹¹. TNF-alfa indukuje sintezu IL-12 i IL-18, dva citokina koja podstiču stvaranje IFN-gama. Na taj način TNF-alfa direktno i posredno stimulacijom IL-12 i IL-18 pojačava reakciju TH1, povećavajući aktivaciju CD4+ T-ćelija i sintezu IFN-gama. Ovo dovodi do povećane proizvodnje TNF-alfa u makrofagima i do aktivisanja inflamacijske reakcije. Mnoga dosadašnja istraživanja pokazala su da IL-12 ima presudnu ulogu u diferencijaciji

TH1 ćelijskog odgovora stimulišući diferencijaciju prekursora T-ćelija (TH0) u TH1 fenotip¹². Interleukin-15 aktivira T-ćelije i stimuliše njihov međućelijski kontakt sa makrofagima, čime posredno indukuje sintezu TNF-alfa i ostalih citokina makrofaga. Pomoću IL-15 aktivirane sinovijske T-ćelije luče direktno TNF-alfa¹³⁻¹⁵. Otkriće novog proinlamacijskog citokina IL-18, dopunilo je listu medijatora koji stimulišu aktivnost i razvoj TH1 ćelijskog odgovora sposobnošću da indukuje proizvodnju IFN-gama u T-ćelijama^{16,17}. Sinergijski efekat sa IL-12 i IL-15 u indukciji IFN-gama definiše ga kao člana porodice citokina koji indukuju TH1 (IFN-gama, IL-2, IL-12 i IL-15)¹⁸⁻²⁰.

Cilj istraživanja bio je da se utvrdi klinički značaj određivanja koncentracija TNF-alfa, IL-18, IL-15 i IL-12 za procenu aktivnosti reumatoidnog artritisa. Do sada urađena ispitivanja na eksperimentnim modelima potvrdila su da ovi citokini učestvuju u patogenezi RA, ali prema dostupnoj literaturi nije sproveden veliki broj istraživanja *in vivo* na humanoj populaciji, niti su rađene studije u kojima su istovremeno određivane koncentracije sva četiri citokina kod bolesnika koji su imali različitu aktivnost RA. Uloga IL-12, IL-15, IL-18 i TNF-alfa u kliničkom ispoljavanju RA nije do danas dovoljno ispitana. Nije poznato da li njihov nivo u sinovijskoj tečnosti (ST) i/ili krvi može odražavati stepen aktivnosti RA i koji je od navedenih citokina najbolji pokazatelj visoke aktivnosti bolesti.

Metode

U četvorogodišnjem periodu analizirano je 64 bolesnika sa RA, novonastalim ili u fazi pogoršanja bolesti. Kod svih bolesnika dijagnoza je postavljena prema revidiranim kriterijumima za klasifikaciju i dijagnozu RA – *American Rheumatism Association/American College of Rheumatology* (ARA/ACR, 1987. god.)². Analizirali smo kliničke manifestacije bolesnika i grupisali ih u odnosu na aktivnost bolesti u tri grupe: bolesnici sa visoko aktivnim RA (VA) – 30 bolesnika i bolesnici sa umereno aktivnim RA (UA) – 14 bolesnika; bolesnici sa blago aktivnim RA (BA) – 20 bolesnika. Kontrolnu grupu činilo je 25 bolesnika sa osteoartritisom (OA) i artritisom kolena za koje smo pretpostavili da nemaju poremećene imunske parametre u krvi i ST (tabela 1). Ukupna ocena aktivnosti reumatoidnog artritisa određena je na osnovu zbira broja otečenih i zbira broja bolno osetljivih zglobova, vrednosti vizuelne analogne skale (VAS) bola i brzine sedimentacije eritrocita (SE) pomoću kojih je raču-

Tabela 1

Opšte karakteristike ispitanika

Karakteristike	Grupa Kontrolna	Bolesnici
Broj bolesnika (% od ukupnog broja spitanika)	25 (28%)	64 (72%)
Starost (godine)	59,2	57,8
Žene	15	45
Muškarci	10	19
Trajanje bolesti (meseci)	45,2	74,4
Trajanje sadašnjih tegoba (meseci)	5,4	6,0

nat skor aktivnosti bolesti (SAB 28 indeks) (Disease Activity Score 28) – numerički pokazatelj stepena aktivnosti bolesti²¹. Visoku aktivnost bolesti predstavljale su dobijene vrednosti SAB > 5,1, umerenu > 3,2, a blagu aktivnost bolesti davale su dobijene vrednosti SAB > 2,6. U obe grupe urađena je analiza uzoraka seruma (S) i ST i određivane su koncentracije (pg/ml) citokina TNF-alfa, IL-12, IL-15 i IL-18 imunoenzimskim (ELISA) metodama korišćenjem kitova za humane interleukine (R & D, SAD).

Za procenu statističke značajnosti razlike između pojedinih obeležja posmatranja među grupama ispitanika i bolesnika sa različitim stepenom aktivnosti RA koristili smo Mann-Whitneyev *U* test i Kruskal-Wallisov test. Za procenu povezanosti kvantitativnih parametara sa pojedinim obeležjima posmatranja urađena je korelaciona analiza pri čemu je korišćen test jednostruke linearne korelacije po Pearsonu. Nivo značajnosti u svim primenjenim metodama bio je u granici od 0,05.

Rezultati

Opšte karakteristike bolesnika prikazane su u tabeli 1. Najveći broj bolesnika, 47% (30/64), imao je visoku aktivnu bolest, umerenu 22% bolesnika (14/64), a blagu aktivnost bolesti imalo je 31% bolesnika (20/64). Prosečna vrednost SAB indeksa kod bolesnika sa RA iznosila je 6,7. Najveća vrednost SAB bila je u grupi VA (10,1), dok su bolesnici u grupi UA (4,7) i BA (2,9) imali značajno niže vrednosti. Bolesnici sa RA, podeljeni prema stepenu aktivnosti bolesti koja je merena vrednostima indeksa SAB, značajno su se razlikovali prema težini kliničkih manifestacija oboljenja ($p <$

0,01). Od 64 bolesnika 26 (41%) je lečeno u prethodnom periodu, dok veći broj obolelih, njih 38 (59%), nije dobio imunomodulatornu terapiju. Prisustvo antiimunoglobulinskih antitela IgM klase u krvi (reuma faktor-RF „seropozitivan“) utvrđeno je kod 57 od 64 bolesnika (89%) sa inflamacijskim artritisom.

Poređenje srednjih vrednosti TNF-alfa, IL-18, IL-15, IL-12 pokazalo je da su vrednosti citokina značajno veće ($p < 0,01$) u uzorcima seruma i ST bolesnika sa RA u odnosu na uzorke kontrolne grupe (tabela 2 i 3).

Poređenje prosečnih vrednosti citokina kod bolesnika sa RA prema aktivnosti oboljenja pokazuje da kod svih posmatranih parametara postoje visoko statistički značajne razlike ($p < 0,01$), koje nastaju zato što su prosečne koncentracije citokina uvek bile veće u grupi VA u odnosu na UA i BA. Jedino za koncentracije IL-12 u sinovijalnoj tečnosti razlika je bila statistički značajna ($p < 0,05$). Poređenja između tri grupe prema aktivnosti bolesti unutar grupe bolesnika sa RA, pokazala su postojanje statistički značajne razlike kod svih bolesnika i uvek su koncentracije citokina u serumu i sinovijalnoj tečnosti bile najveće u VA, a najmanje u BA. Jedine situacije kada razlike između grupa nisu bile značajne ($p > 0,05$) je kod TNF-alfa u serumu između VA i UA, IL-12 i u serumu i ST gde razlika nije bila značajna između UA i BA (tabela 4).

Povezanost vrednosti SAB sa koncentracijama TNF-alfa, IL-18, IL-15 i IL-12 u serumu i ST kod bolesnika sa aktivnim RA pokazuje da je za sve analizirane parametre nađena visoko značajna povezanost pozitivnog smera sa SAB, što znači da je porast koncentracija citokina u serumu i ST bolesnika sa RA značajno povezan sa porastom vrednosti SAB i obrnuto (slike

Tabela 2
Koncentracije citokina u uzorcima seruma kontrolne i grupe bolesnika sa RA

Grupa	TNF- α (pg/ml)	IL-18 (pg/ml)	IL-15 (pg/ml)	IL-12 (pg/ml)
Bolesnici	5,6 $\pm$ 3,5	156,7 $\pm$ 90,4	1,8 $\pm$ 3,0	11,8 $\pm$ 8,9
Kontrolna	2,3 $\pm$ 0,8	89,7 $\pm$ 17,2	0,6 $\pm$ 0,2	4,9 $\pm$ 2,1
<i>p</i> *	0,00	0,00	0,00	0,00

$p^* < 0,01$

Tabela 3
Koncentracije citokina u uzorcima sinovijalne tečnosti kontrolne i grupe bolesnika sa RA

Grupa	TNF- α (pg/ml)	IL-18 (pg/ml)	IL-15 (pg/ml)	IL-12 (pg/ml)
Bolesnici	14,0 $\pm$ 19,4	281,1 $\pm$ 317,2	10,4 $\pm$ 9,8	10,5 $\pm$ 7,6
Kontrolna	3,5 $\pm$ 1,2	112,2 $\pm$ 84,8	3,3 $\pm$ 1,2	6,1 $\pm$ 2,1
<i>p</i> *	0,00	0,00	0,00	0,00

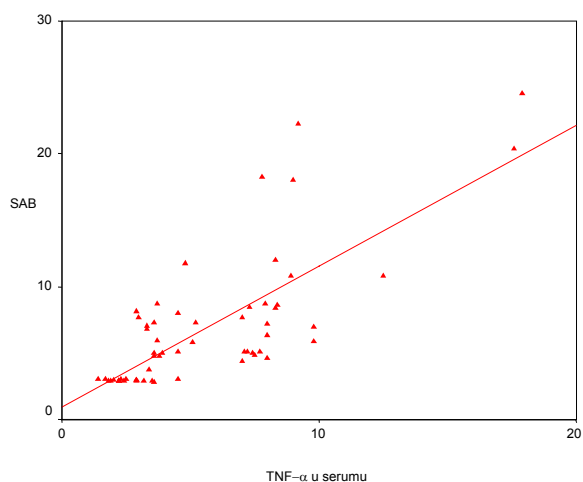
$p^* < 0,01$

Tabela 4
Poređenje srednjih vrednosti citokina u uzorcima seruma i sinovijalne tečnosti u grupama bolesnika sa različitim stepenom aktivnosti RA

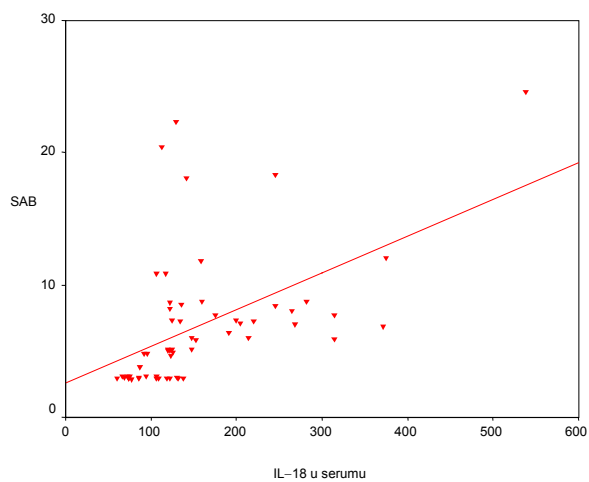
Grupa	Broj	TNF- α (pg/ml)		IL-18 (pg/ml)		IL-15 (pg/ml)		IL-12 (pg/ml)	
		Serum	Sinovijalna tečnost	Serum	Sinovijalna tečnost	Serum	Sinovijalna tečnost	Serum	Sinovijalna tečnost
VA	30	7,5 $\pm$ 3,9*	23,0 $\pm$ 24,8*	209,7 $\pm$ 99,2*	465,4 $\pm$ 376,1*	3,0 $\pm$ 4,1*	15,8 $\pm$ 11,5*	16,0 $\pm$ 9,6*	13,0 $\pm$ 9,6*
UA	14	5,8 $\pm$ 1,9*	7,7 $\pm$ 1,9*	115,7 $\pm$ 18,6*	146,2 $\pm$ 33,6*	0,8 $\pm$ 0,2*	7,1 $\pm$ 1,8*	8,8 $\pm$ 4,6	7,6 $\pm$ 3,7
BA	20	2,6 $\pm$ 0,8	3,7 $\pm$ 1,6	94,6 $\pm$ 24,8	82,5 $\pm$ 31,6	0,6 $\pm$ 0,1	3,8 $\pm$ 1,5	7,9 $\pm$ 3,9	8,7 $\pm$ 4,5

$p^* < 0,01$

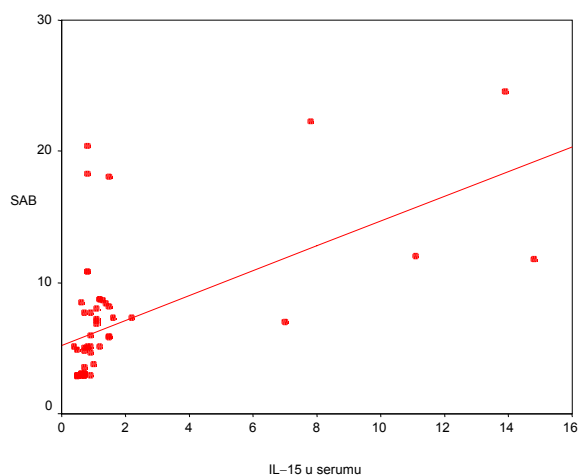
1–8). Vrednosti koeficijenta korelacije u ST za sve ispitivane citokine bile su veće nego u serumu, što ukazuje na jaču povezanost posmatranih parametara u ST.



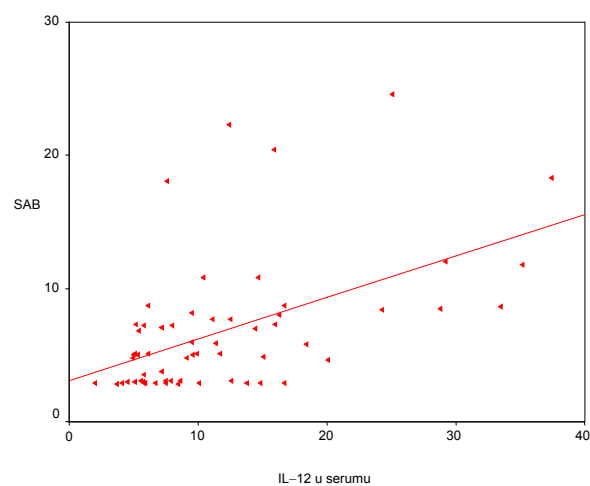
Sl. 1 – Odnos koncentracija TNF-alfa u serumu sa vrednostima SAB kod bolesnika sa RA



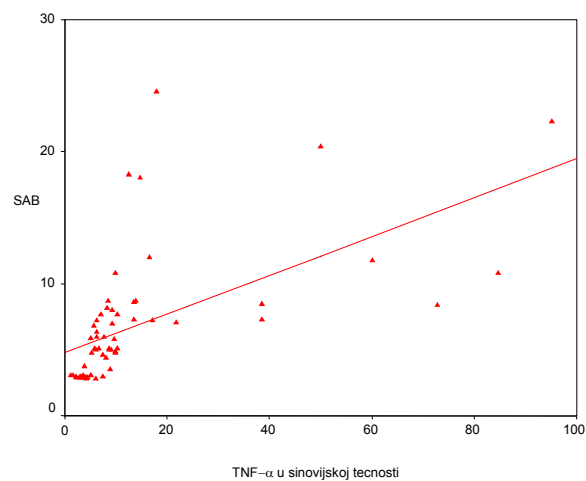
Sl. 2 – Odnos koncentracija IL-18 u serumu i vrednosti SAB kod bolesnika sa RA



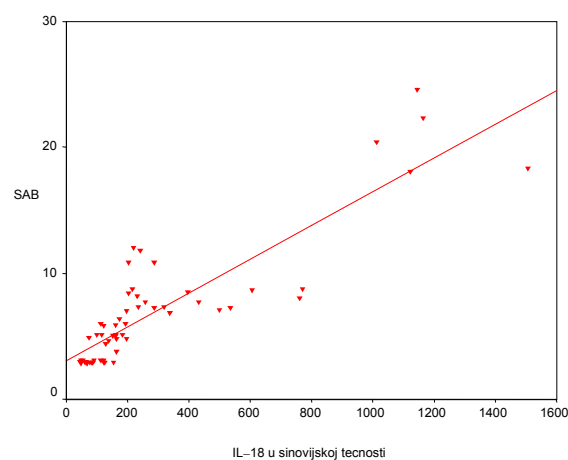
Sl. 3 – Odnos koncentracija IL-15 u serumu i vrednosti SAB kod bolesnika sa RA



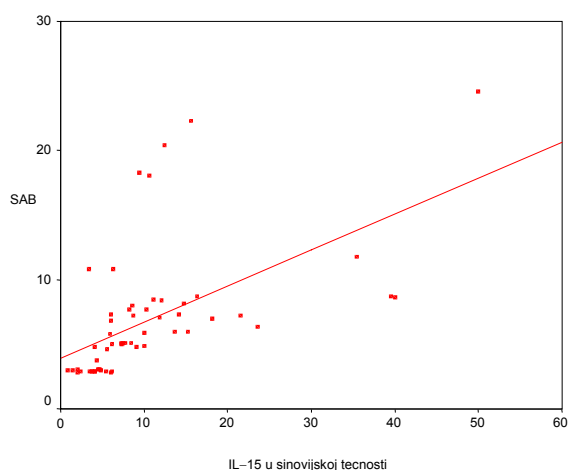
Sl. 4 – Odnos koncentracija IL-12 u serumu i vrednosti SAB kod bolesnika sa RA



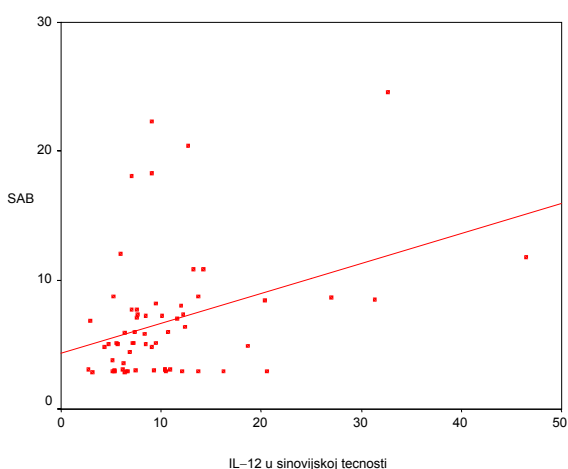
Sl. 5 – Odnos koncentracija TNF-alfa u sinovijskoj tečnosti i vrednosti SAB kod bolesnika sa RA



Sl. 6 – Odnos koncentracija IL-18 u sinovijskoj tečnosti i vrednosti SAB kod bolesnika sa RA



Sl. 7 – Odnos koncentracija IL-15 u sinovijalnoj tečnosti i vrednosti SAB kod bolesnika sa RA



Sl. 8 – Odnos koncentracija IL-12 u sinovijalnoj tečnosti i vrednosti SAB kod bolesnika sa RA

Diskusija

U našem ispitivanju upoređivane su prosečne koncentracije TNF-alfa, IL-18, IL-15 i IL-12 u uzorcima seruma i ST između bolesnika sa RA i OA kao kontrolnom grupom i između grupa bolesnika podeljenih prema stepenu aktivnosti bolesti unutar grupe bolesnika sa RA. Prosečne koncentracije TNF-alfa, IL-18, IL-15 i IL-12 su se visoko statistički značajno razlikovale između kontrolne i grupe bolesnika sa RA. Bolesnici sa erozivnim artritisom imali su veće prosečne vrednosti ispitivanih citokina i u krvi i u zglobojnoj tečnosti u odnosu na ispitanike sa OA. To pokazuje da su patofiziološki mehanizam i stepen inflamacijske reakcije različiti u RA i OA. Zaključeno je da TNF-alfa, IL-18, IL-15 i IL-12 imaju značajnu ulogu u patogenezi reumatoidnog sinovitisa, što je u skladu sa nalazima drugih autora^{11, 16, 19}.

Upoređujući rezultate bolesnika sa različitim stepenom aktivnosti RA dobijena je značajna razlika. Prosečne koncentracije TNF-alfa, IL-18, IL-15 i IL-12 u serumu i u ST su se visoko i statistički značajno razlikovale između grupa bolesnika sa visoko, umereno i blago aktivnim RA. Bolesnici sa

visoko aktivnim RA imali su veće prosečne koncentracije svih ispitivanih citokina u serumu i ST u odnosu na bolesnike sa umereno i blago aktivnim RA. Kada su u pitanju poređenja između grupa između grupa bolesnika UA i BA, utvrđene su značajne razlike u koncentracijama citokina, osim za prosečne vrednosti IL-12 u serumu ($p = 0,62$) i ST ($p = 0,43$). Koncentracije TNF-alfa u serumu bolesnika VA i UA takođe su bile približno jednake ($p = 0,11$). Upoređujući srednje vrednosti koncentracija citokina između grupa VA i BA dobijene su visoko i statistički značajne razlike. Veće koncentracije citokina u težim oblicima bolesti i njihove niže vrednosti u bolesti manjeg stepena aktivnosti pokazuju da nivoi TNF-alfa, IL-18, IL-15 i IL-12 u serumu i ST utiču na kliničke manifestacije i mogu biti dobri pokazatelji opšte aktivnosti reumatoidnog artritisa.

Ispitivanje povezanosti koncentracija citokina u serumu i sinovijalnoj tečnosti sa stepenom aktivnosti RA pokazalo je da postoji povezanost težine bolesti merene SAB indeksom i koncentracija citokina u krvi i u zglobojnoj tečnosti²¹. Koeficijenti linearne korelacije veći su bili za vrednosti u ST u odnosu na serum, osim za IL-12 čije su serumske koncentracije više povezane sa vrednostima SAB od koncentracija u ST. To znači da se kod porasta koncentracija citokina, odnosno nalaza njihovih visokih vrednosti u sinovijalnoj tečnosti ili serumu bolesnika sa RA, može očekivati porast ili visoka vrednost SAB i veći stepen aktivnosti bolesti i obrnuto. Kod bolesnika sa aktivnim RA možemo očekivati visoke vrednosti citokina u serumu i ST. Korelacionim ispitivanjem, na drugi način smo potvrdili da su koncentracije citokina u krvi i zglobojnoj tečnosti koristan pokazatelj opšte aktivnosti bolesti i da mogu veoma pouzdano ukazati na veću aktivnost RA. Koncentracije citokina TNF-alfa, IL-18 i IL-15 u sinovijalnoj tečnosti bolje odražavaju stepen opšte aktivnosti bolesti u poređenju sa koncentracijama u serumu, a koncentracije IL-12 u krvi bolji su pokazatelj aktivnosti RA od njegovih koncentracija u ST. U daljem toku istraživanja želeli smo da utvrdimo koji je od ispitivanih citokina najbolji pokazatelj aktivnosti reumatoidnog artritisa. Dokazali smo da je povezanost koncentracija TNF-alfa i u serumu i u ST sa vrednostima SAB veća nego veza ostalih citokina, osim IL-18. Jedino koncentracije IL-18 u ST mogu bolje od TNF-alfa predvideti visokoaktivni oblik bolesti. Najbolji pokazatelji opšte aktivnosti RA su TNF-alfa i IL-18.

Zaključak

Naš rad ukazao je na značaj određivanja koncentracija pojedinih citokina u krvi i ST kod bolesnika sa aktivnim RA i može pružiti doprinos razjašnjenju nedovoljno poznatih stavova o patogenetskoj ulozi i značaju ispitivanih citokina u aktivnoj bolesti. Ovim istraživanjem je potvrđeno da ispitivani citokini, TNF-alfa, IL-12, IL-15 i posebno IL-18, mogu biti pokazatelji stepena aktivnosti RA veće vrednosti i specifičnosti u odnosu na do sada korišćene standardne biohemijske parametre. Koncentracije citokina mogu biti korisne za ranu procenu aktivnosti bolesti. Istraživanje može poslužiti kao osnova za dalje studije i procenu efekta primenjene terapije.

L I T E R A T U R A

1. *van Riel P, Wijnands M, van de Putte L.* Rheumatoid arthritis. Evaluation and management of active inflammatory disease. In: *Kippel HJ, Dieppe AP*, editors. *Rheumatology*. 2nd ed. London: Mosby; 1998. p. 14.1–12.
2. *Firestein SG.* Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis. In: *Kelley WN, Ruddy S, Harris ED, Sledge CB*, editors. *Textbook of Rheumatology*. Philadelphia: W.B. Saunders Co; 2001. p. 921–66.
3. *Budd CR, Fortner AK.* T lymphocytes. In: *Kelley WN, Ruddy S, Harris ED, Sledge CB*, editors. *Textbook of Rheumatology*. Philadelphia: W.B. Saunders Co; 2001. p. 113–29.
4. *Gaston HJ.* Cellular immunity in RA. In: *Klippel HJ, Dieppe AP*, editors. *Rheumatology*. 2nd ed. London: Mosby; 1998. p. 10.1–6.
5. *Szekanecz Z, Koch AE.* Cytokines. In: *Kelley WN, Ruddy S, Harris ED, Sledge CB*, editors. *Textbook of Rheumatology*. Philadelphia: W.B. Saunders Co; 2001. p. 275–90.
6. *Dinarello AC, Moldaver LL.* Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. In: *Dinarello AC, Moldaver LL*, editors. *A Primer for Clinicians*. Florida: College of Medicine; 1999. p. 1–88.
7. *Seidel MF, Junier MP, Vetter H.* Molecular cloning and sequence analysis of variant TNF-alpha transcripts do not indicate a significant role of gene polymorphism in collagen-induced arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2003; 21(3): 414–5.
8. *Kim JM, Ho SH, Hahn W, Jeong JG, Park EJ, Lee HJ*, et al. Electro-gene therapy of collagen-induced arthritis by using an expression plasmid for the soluble p75 tumor necrosis factor receptor-Fc fusion protein. *Gene Ther* 2003; 10(15): 1216–24.
9. *Cordero OJ, Salgado FJ, Mera-Varela A, Nogueira M.* Serum interleukin-12, interleukin-15, soluble CD26, and adenosine deaminase in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2001; 21(2): 69–74.
10. *Plater-Zyberk C, Joosten LA, Helsen MM, Sattouet-Roche P, Siegfried C, Alouani S*, et al. Therapeutic effect of neutralizing endogenous IL-18 activity in the collagen-induced model of arthritis. *J Clin Invest* 2001; 108(12): 1825–32.
11. *de Jager W, te Velthuis H, Prakken BJ, Kuis W, Rijkers GT.* Simultaneous detection of 15 human cytokines in a single sample of stimulated peripheral blood mononuclear cells. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003; 10(1): 133–9.
12. *Joosten LA, Helsen MM, van Den Berg WB.* Blockade of endogenous interleukin 12 results in suppression of murine streptococcal cell wall arthritis by enhancement of interleukin 10 and interleukin 1Ra. *Ann Rheum Dis* 2000; 59(3): 196–205.
13. *Wang CR, Liu MF.* Regulation of CCR5 expression and MIP-1alpha production in CD4+ T cells from patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 2003; 132(2): 371–8.
14. *Ortiz AM, Laffon A, Gonzalez-Ahvaro I.* CD69 expression on lymphocytes and interleukin-15 levels in synovial fluids from different inflammatory arthropathies. *Rheumatol Int* 2002; 21(5): 182–8.
15. *Zheng XX, Maslinski W, Ferrari-Lacraz S, Strom TB.* Cytokines in the treatment and prevention of autoimmune responses—a role of IL-15. *Adv Exp Med Biol* 2003; 520: 87–95.
16. *Canetti CA, Leung BP, Culshaw S, McInnes IB, Cunha FQ, Liew FY.* IL-18 enhances collagen-induced arthritis by recruiting neutrophils via TNF-alpha and leukotriene B4. *J Immunol* 2003; 171(2): 1009–15.
17. *Wei XQ, Leung BP, Arthur HM, McInnes IB, Liew FY.* Reduced incidence and severity of collagen-induced arthritis in mice lacking IL-18. *J Immunol* 2001; 166(1): 517–21.
18. *Leung BP, McInnes IB, Esfandiari E, Wei XQ, Liew FY.* Combined effects of IL-12 and IL-18 on the induction of collagen-induced arthritis. *J Immunol* 2000; 164(12): 6495–502.
19. *Liew FY, McInnes IB.* Role of interleukin 15 and interleukin 18 in inflammatory response. *Ann Rheum Dis* 2002; 61 Suppl 2: ii100–2.
20. *Liew FY.* The role of innate cytokines in inflammatory response. *Immunol Lett* 2003; 85(2): 131–4.
21. *Prevoo ML, van 't Hof MA, Kuiper 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(1): 44–8.

Rad je primljen 24. II 2004.