

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Milka B. Grk

UTICAJ POLIMORFIZAMA GENA KOJI
KODIRAJU ADENOZINSKE RECEPTORE NA
EFIKASNOST I TOKSIČNOST MONOTERAPIJE
METOTREKSATOM KOD PACIJENATA SA
REUMATOIDNIM ARTRITISOM

doktorska disertacija

Beograd, 2021

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE

Milka B. Grk

ASSOCIATION OF POLYMORPHISMS IN
GENES CODING ADENOSINE RECEPTORS
WITH EFFICACY AND TOXICITY OF
METHOTREXATE MONOTHERAPY IN
PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021

MENTOR:

Prof. dr Biljana Jekić, vanredni profesor

Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

Prof. dr Suzana Cvjetičanin, redovni profesor

Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Doc. dr Predrag Ostojić, docent

Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Gordana Šupić, vanredni profesor

Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije

Datum odbrane

ZAHVALJUJEM:

Mojoj mentorki na nesebičnoj pomoći, savetima i strpljenju. Hvala Vam na podršci koju ste mi pružali na svakom koraku puta ka završetku disertacije.

Doc. dr Veri Milić, koja nije više sa nama, a koja je mi je pružala nesebičnu pomoć. Učiti reumatologiju od nje je bila privilegija.

Svim kolegama sa Instituta za humanu genetiku na stručnom usmeravanju u laboratorijskom radu.

Kolegama sa Instituta za reumatologiju koji su mi pokazali kako se bori protiv autoimunih bolesti.

Članovima komisije na stručnim sugestijama na kojima sam učila.

Posvećujem ovu tezu mojoj porodici. Mojim roditeljima koji su mi bili najveća podrška, a koji nisu dočekali da je vide gotovu.

Uticaj polimorfizama gena koji kodiraju adenzinske receptore na efikasnost i toksičnost monoterapije metotreksatom kod pacijenata sa reumatoidnim artritisom

SAŽETAK

Uvod: Reumatoidni artritis (RA) je hronično, autoimunska oboljenje sinovijalnih zglobova koje dovodi do invalidnosti i prerane smrti. Metotreksat (MTX) je zlatni standard u terapiji RA. Inhibicijom enzima adenzinskog ciklusa MTX povećava akumulaciju i izlučivanje adenzina, koji svoje antiinflamatorno dejstvo ostvaruje vezivanjem za adenzinske receptore (ADOR). Polimorfizmi u genima koji kodiraju enzime adenzinskog puta kao i ADOR mogli bi uticati na njihovu ekspresiju i funkciju, a posledično i na sam ishod terapije. Cilj ove doktorske disertacije bio je ispitivanje učestalost alala i genotipova polimorfizama *ADORA_{2A}* gena (rs2298383, rs2236624, rs5751876, rs17004921), *ADORA₃* gena (rs2298191, rs1544223, rs3393) i *ITPA* gena (rs1127354), kao i njihove povezanosti sa efikasnošću i toksičnošću monoterapije MTXom.

Metod: Naša studija je uključila 127 bolesnika sa RA koji su bili na monoterapiji MTXom. Efikasnost MTXa je procenjivana na osnovu EULAR kriteijuma koji se baziraju na promeni aktivnosti bolesti merene DAS28 indeksom nakon 6 meseci monoterapije. Oboleli sa dobrim i umerenim odgovorom su klasifikovani kao grupa bolesnika koja „pokazuje odgovor na terapiju”, dok su oboleli bez odgovora činili grupu koja „ne pokazuje odgovor na terapiju”. Neželjeni efekti (NE) su prikupljeni tokom šestomesečnog praćenja bolesnika. Radiografska progresija bolesti se bazirala na praćenju pojave erozija na standardnim radiografskim snimcima šaka i stopala. Genotipizacija je izvedena primenom KASP eseja.

Rezultati: Na terapiju je odgovor pokazalo 112 (88,2%) bolesnika. Erozije je razvilo 82 (64,6%) bolesnika. NE su bile prijavljene kod 31 (24,4%) bolesnika. Pojedinačni polimorfizmi nisu povezani sa efikasnošću i toksičnošću MTXa. *ADORA₃* TAA haplotip bio je češći kod obolelih sa erozijama kostiju (29% prema 15,6%, $p = 0,023$), kao i kod bolesnika sa hepatotoksičnošću (51,3% prema 21,6%, $p = 0,013$).

Zaključak: Rezultati naše studije ukazuju da bi haplotipovi, pre nego pojedinačni polimorfizmi, mogli predstavljati potencijalne prediktivne biomarkere za odgovor na monoterapiju MTXom kod bolesnika sa RA.

Ključne reči: reumatoidni artritis, metotreksat, polimorfizam, adenzinski receptori, haplotip

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Molekularna medicina

UDK broj:

Association of polymorphisms in genes coding adenosine receptors with efficacy and toxicity of methotrexate monotherapy in patients with rheumatoid arthritis

ABSTRACT

Introduction: Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic, autoimmune disease that primarily affects synovial joints, leading to disability and premature death. Methotrexate (MTX) is the anchor treatment in RA. Via adenosine cycle enzymes inhibition, MTX leads to increased production and excretion of adenosine. Adenosine mediates its antiinflammatory effects by binding to adenosine receptors (ADOR). Polymorphisms within genes coding for adenosine pathway enzymes and ADOR could affect their expression and function, and consequently the outcome of MTX therapy. The aim of this doctoral dissertation was to assess the frequency of alleles and genotypes within *ADORA_{2A}* (rs2298383, rs2236624, rs5751876, rs17004921), *ADORA₃* (rs2298191, rs1544223, rs3393) and *ITPA* (rs1127354) gene polymorphisms and their association with efficacy and toxicity of MTX monotherapy.

Method: Our study included 127 RA patients on MTX monotherapy. MTX efficacy estimation was based on the changes in Disease activity score (DAS28) after 6 months of therapy, according to EULAR response criteria. Patients with good and moderate response were classified as "responders", while the patients with poor response were classified as "nonresponders". Adverse effects (AE) were collected during the six months follow-up period. Radiographic progression was based on the appearance of erosions on standard radiographic images of the hands and feet. Genotyping was performed using the KASP assays.

Results: Among patients 112 (88.2%) were responders. We observed bone erosions in 82 (64.6%) of our patients. AE were reported in 31 patients (24.4%). We observed no association between analyzed individual polymorphisms and efficacy and toxicity of MTX. *ADORA₃* TAA haplotype was more frequent in patients with bone erosions (29% vs 15.6% $p = 0.023$), as well as in patients with hepatotoxicity (51.3% vs 21.6% $p = 0.013$).

Conclusion: The results of our study suggest that haplotypes, rather than individual polymorphisms, could represent potential predictive biomarkers for response to MTX monotherapy in RA patients.

Key words: rheumatoid arthritis, methotrexate, polymorphism, adenosine receptors, haplotype

Scientific field: Medicine

Scientific subfield: Molecular medicine

UDK No:

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Epidemiologija	1
1.2. Genetika reumatoidnog artritisa	1
1.3. Faktori spoljašnje sredine	2
1.4. Klinička slika reumatoidnog artritisa.....	3
1.5. Dijagnoza reumatoidnog artritisa	4
1.6. Procena aktivnosti bolesti i odgovora na terapiju.....	6
1.7. Patogeneza reumatoidnog artritisa	7
1.8. Adenozin u zapaljenju	10
1.9. Metotreksat	11
1.10. Adenozinski receptori	13
1.10.1. <i>ADORA_{2A}</i>	14
1.10.2. <i>ADORA₃</i>	14
1.11. <i>ITPA</i>	15
1.12. Polimorfizmi pojedinačnih nukleotida u <i>ADORA_{2A}</i> , <i>ADORA₃</i> i <i>ITPA</i> genu i njihov značaj	15
2. CILJEVI	17
3. MATERIJAL I METODE	18
3.1. Bolesnici	18
3.2. Izolacija DNK	19
3.3. KASP genotipizacija	19
3.4. Statistička obrada podataka	23
4. REZULTATI	24
4.1. Klinička i laboratorijska ispitivanja.....	24
4.2. Rezultati genetičkih ispitivanja	28
4.3. Neželjeni efekti	30
4.4. Kombinacije genotipova	31
4.5. Analiza haplotipova.....	32
4.5.1. <i>ADORA_{2A}</i>	33
4.5.2. <i>ADORA₃</i>	34
5. DISKUSIJA.....	36
6. ZAKLJUČCI	45
7. LITERATURA	47

1. UVOD

Reumatoidni artritis RA je hronično, autoimunsko, zapaljensko oboljenje koje se odlikuje progresivnim oštećenjem sinovijskih zglobova (1). Iako je artritis glavna karakteristika bolesti, brojne vanzglobne manifestacije koje se javljaju tokom bolesti svrstavaju ovo oboljenje u grupu sistemskih autoimunskih bolesti (2,3).

1.1. Epidemiologija

Prevalenca RA je relativno konstantna u Evropskim populacijama i kreće se između 0,33-0,8% (4–12). Visoka učestalost prisutna je kod pripadnika severnoameričkih starosedelaca. U plemenu Pima prevalenca iznosi 5,3%, dok kod Chippewa Indijanaca dostiže vrednosti 6.8–7.1% (13). Potpuno suprotne vrednosti pokazuju studije sprovedene u Nigeriji, koje ukazuju na odsustvo RA u ovoj populaciji (14). Oboljenje je 3-4 puta češće kod žena (0,48-0,86%) nego kod muškaraca (0,13-0,53%) (5,7,10,12,15,16). Incidenca oboljenja varira između 28,7-40,9/100000 (5,6,17). U poslednjih 60 godina prisutan je trend porasta broja obolelih od RA (5,17). U republici Srbiji, prema istraživanjima iz 2013. godine, prevalenca RA iznosi 0,34%, pri tome je oboljenje 3,18 puta češće kod žena (0,51%) nego kod muškaraca (0,16%) (15).

1.2. Genetika reumatoidnog artritisa

Reumatoidni artritis je multifaktorsko oboljenje u čijem nastanku sudeluju genetski činioci sa faktorima spoljašnje sredine (18). Uticaj nasleđa je prvobitno ispitivan studijama na jednojajčanim, dvojajčanim blizancima i u familijama obolelih osoba (19,20). Pokazalo se da je učestalosti ove bolesti nekoliko puta veća kod srodnika obolele osobe nego u opštoj populaciji. Ovakvi podaci upućivali su na prisustvo nasledne osnove u etiopatogenezi RA (18,21). GWA (genome-wide association) studije usmerile su pažnju na veliki broj gena koji povećavaju podložnost u razvoju bolesti (22–24). Sve ove genetske faktore možemo podeliti u dve grupe:

1- HLA (humani leukocitni antigen) lokus

Najveći genetski rizik za razvoj RA nosi prisustvo pojedinih alelnih oblika HLA-DRB1, koji kodira β -lanac MHC molekula druge klase (23,25,26). Pokazano je da HLA-DRB1 aleli koji su povezani sa razvojem RA kodiraju MHC molekule sa „zajedničkim epitopima” u predelu vezujućeg mesta. Treba istaći da je pri tome značajnije koje aminokiseline zauzimaju pozicije 11, 13, 71 i 74 u polipeptidnom lancu nego haplotip sam po sebi (26,27). Tako, na primer, prisustvo valina na poziciji 11 povećava rizik za razvoj bolesti 3,8 puta, dok prisustvo serina na istoj poziciji ima protektivni efekat (OR=0,38). Značaj ovih pozicija u peptidu objašnjava se njihovom lokacijom u MHC molekulu. Amino kiseline 11 i 13 deo su β naborane ploče na podu vezujućeg mesta, dok su 71. i 74. aminokiselina locirane u α heliksu koji ga ograničava (27). Kao nezavisni faktori rizika pokazali su se i fenilalanin na poziciji 9 β -lanca kodiranog HLA-DPB1 alelima, kao i asparaginska kiselina na 9. poziciji MHC molekula I klase kojeg kodiraju HLA-B aleli (27).

Osim uticaja na podložnost oboljevanju pojedini HLA aleli utiču i na ozbiljnost bolesti, mortalitet i odgovor na terapiju. Valin na poziciji 11 β -lanca MHC II molekula (HLA-DRB1) povećava rizik za razvoj erozivne bolesti, povećava mortalitet, ali istovremeno poboljšava odgovor na terapiju TNF-

inhibitorima. Serin na istoj poziciji smanjuje rizik za razvoj erozija (28). Zapaženo je i da se Feltijev sindrom češće javlja kod osoba sa kombinacijom valina na 11., lizina na 71. i alanina na 74. poziciji u MHC molekulu (HLA-DRB1*04:01) (29).

2- Polimorfizami izvan HLA lokusa

Iako su pojedini HLA-DRB1 aleli najznačajniji genski faktor rizika za RA, istraživanja su pokazala da postoje brojni genski polimorfizmi van ovog lokusa čiji se aleli i/ili genotipovi mogu dovesti u vezu sa povećanom predispozicijom za razvoj ove bolesti (25). Veliki broj ovih polimorfizama predstavlja univerzalni faktor rizika, iako postoje i oni koji su specifični za određene populacije (25,30). Jedan od najznačajnijih primera je *PTPN22* rs2476601 (R620W) polimorfizam koji pokazuje značajnu povezanost sa pojavom bolesti u evropskoj populaciji, dok je izuzetno redak u Aziji. Istovremeno *PADI4* rs2240340 je jedan od najznačajnijih faktora rizika u azijskoj populaciji (23–25,30). Više GWA studija i meta analiza su povezale rizik od razvoja RA i polimorfizme u genima za interleukine i njihove receptore (IL10, IL17, IL2, IL2RA, IL2RB) (23,24,31,32). U faktore rizika ubrajaju se i polimorfizmi u brojnim genima značajnim za signalizaciju i funkciju imunog sistema (STAT4, CTLA4, CD40, CD28, CD2, CCR6, IRF5, BAK1, MAPK13) (23–25,30). Rizik od oboljevanja od reumatoidnog artritisa imaju i nosioci pojedinih polimorfizama u genima za matriks metaloproteinaze (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9) (33,34). Najveći broj GWA studija rađen je na seropozitivnim bolesnicima. Iako postoje ovakve studije rađene na seronegativnim bolesnicima, one nisu ukazivale na nove i genetičke faktore specifične za ovu podgrupu obolelih. Pojedinačne studije istakle su postojanje suptilnih razlika u genetičkoj osnovi seronegativnog i seropozitivnog reumatoidnog artritisa i to bi moglo biti osnova razlika u patogenezi i ispoljavanju simptoma kod obolelih osoba (19,21,26,28).

1.3. Faktori spoljašnje sredine

Osim genetičke predispozicije u razvoju ove multifaktorske bolesti važnu ulogu igraju i faktori sredine kojima je osoba izložena (20,35). Pojedine studije pokazale su da rizik za oboljevanje može biti pod uticajem faktora iz ranog detinjstva. Pokazano je da predispoziciju za oboljevanje imaju osobe sa većom telesnom težinom na rođenju, kao i one čiji su roditelji fizički radnici. Istovremeno se pokazalo da dojenje u prvim danima života ima protektivan efekat (20,36). Međutim, najznačajniji faktor sredine je, ipak, pušenje. Studije na jednojajčanim blizancima su pokazale da blizanac koji puši ima 12 puta veću šansu da oboli od RA (37). Kasnija istraživanja su pokazala da pušenje značajno povećava rizik za razvoj seropozitivnog, ali ne i seronegativnog artritisa (38–40). Takođe se pokazalo da je rizik od oboljevanja značajno veći kod pušača koji su nosioci jednog (oko 6,5-7,5 puta) ili oba (oko 15-20 puta) „zajednička epitopa” na MHC II molekulima koje kodira HLA-DRB1 (39,40). Povećan rizik imaju kako homozigoti nosioci rizičnih HLA-DRB1 alela, tako i složeni heterozigoti (18). Pretpostavka je da i mikroorganizmi, kod osoba sa predispozicijom za RA, mogu započeti autoimunski proces (41,42). Virus koji se najčešće dovode u vezu sa RA su parvo B19, EBV, HCV (42,43). Nisko obrazovanje i fizički rad predstavlja još jedan od nezavisnih faktora rizika (44). Posebno se pokazao rizičan kontakt sa kvarcnim prahom. Muškarci koji su kao fizički radnici dolazili u kontakt sa ovim jedinjenjem češće oboljevaju od RA (45).

1.4. Klinička slika reumatoidnog artritisa

Iako je osnovna manifestacija RA simetrični poliartritis malih zglobova šaka i stopala, tokom razvoja ove sistemske bolesti mogu biti zahvaćeni i ostali organski sistemi te bolest može imati raznovrsnu kliničku sliku. Klasično se manifestacije bolesti dele na zglobne i vanzglobne (2).

Kod 55-65% obolelih bolest počinje postepeno tokom više nedelja ili meseci (46). U 15% slučajeva početak je subakutan, dok se akutan početak javlja kod 8-15% bolesnika (2,46). Ređe se može videti početak bolesti u vidu palindromnog reumatizma, monoartritisa, polimijalgije ili prisustva vanzglobne manifestacije bolesti (47).

Na samom početku bolesti mogu biti prisutni i nespecifični znaci bolesti u vidu umora, malaksalosti, groznice i gubitka telesne težine (47). Ovi simptomi češće prate akutan i subakutan početak bolesti (2). Rani RA se opisuje kao simetrični poliartritis koji zahvata male zglobove šaka i stopala (47). Početak bolesti karakteriše postepena pojava bolova i otoka zglobova šaka i stopala (2,46,47). Najčešće su zahvaćeni metakarpofalangealni (MCP), proksimalni interfalangealni zglobovi (PIP), zglobovi ručja, metatarzofalangealni (MTP) i PIP palca noge (46,47).

Kao posledica ekscesivne sinovijske eksudacije i neaktivnosti zgloba tokom noći, otok i bol su najizraženiji u jutarnjim časovima. Pritisak otečene sinovije šaka na okolne tetive dovodi do nastanka jutarnje ukočenosti (46). Kod bolesnika sa RA ova ukočenost traje više od sat vremena pre nego što se dostigne maksimalno poboljšanje pokretljivosti. Trajanje jutarnje ukočenosti, kao jedne od najznačajnijih ranih tegoba bolesti, srazmerno je njenoj aktivnosti (47).

Simptomi u velikim zglobovima obično nastaju naknadno, a među najčešće zahvaćenim su kolena (46). Često se, kao komplikacija, u kasnim fazama bolesti mogu videti fleksione kontrakture, valgus ili nešto ređe varus kolena (2). Iako tokom RA bilo koji sinovijski zglob može biti zahvaćen, distalni interfalangealni (DIP), sakroiliacični zglobovi i lumbalna kičma su obično pošteđeni (46,47). Laktovi su ređe zahvaćeni u ranim fazama bolesti, a jedan od prvih znakova je nepotpuna ekstenzija podlaktice. Kasnije tokom bolesti artritis zahvata i ramena. Tada se može javiti i pridružena ruptura mišića rotatorne manžetne. Kao posledica glenohumeralnog oštećenja može se razviti izraženo ograničenje pokreta koje se manifestuje kao sindrom smrznutog ramena (46,47). Kukovi su zahvaćeni kod 5-15% bolesnika. Kao posledica progresivnog oštećenja hrskavice u 20% slučajeva dolazi do protruzije acetabuluma (2).

Atlantoaksijalni zglob je relativno često zahvaćen tokom RA. Slabljenja transversalnog ligamenta koji učvršćuje zglobljavanje densa aksisa sa atlasom je česta komplikacija bolesti. Kao posledica javljaju se subluksacija i luksacija u ovom zglobo. Posledičan pritisak na kičmenu moždinu i spinalne nerve dovode do neuroloških ispada. Čak i najmanja trauma kod ovih bolesnika može dovesti do neuroloških komplikacija ili iznenadne smrti (2,46,47). Iako su sinovijski, temporomandibularni i krikoaritenoidni zglobovi su retko zahvaćeni, a ukoliko jesu, udruženi su sa bolom pri žvakanju, pričanju i gutanju (47).

Tenosinovitis je prisutan već u ranom stadijumu bolesti i najčešće se sporo razvija. Iako se najčešće razvija na tetivama fleksora i ekstenzora prstiju šaka može se uočiti i na drugim lokacijama. Razvoj je spor i progresivan. Otok se u početku bolesti manifestuje kao ograničenje pokreta prstiju i šake. Kako bolest dalje napreduje, ligamenti, tetive i kapsule zgloba slabe, što dovodi do ruptura. Postepeni razvoj nestabilnosti zglobova omogućava nastanak deformiteta (2,47). Prvi deformiteti koji se zapažaju kod obolelih su deformitet u obliku labudovog vrata (hiperekstenzija PIP uz istovremenu fleksiju DIP) i deformitet u obliku rupice za dugme (boutonnière, fleksija PIP uz istovremenu hipereksteziju DIP). Na palčevima šaka se razvija Z deformacije (hiperekstenzija PIP).

U kasnim fazama bolesti razvija se ulnarna devijacija na šakama i fibularna devijacija na stopalima (2). Kao posledica zadebljanja tetiva mogu se javiti kontrakture, karpalni i tarzalni sindrom (2,47).

Vanzglobne manifestacije

Reumatoidni artritis je sistemsko zapaljensko oboljenje koje osim zglobova može zahvatiti i tkiva i organe. Prisustvo ovakvih manifestacija je povezano sa težom kliničkom slikom i povećanim mortalitetom (2,48). Skoro polovina obolelih (46%) razvije bar jednu vanzglobnu manifestaciju tokom života. Najčešća se mogu zapaziti reumatoidni čvorići. Oni su patognomonični za RA i javljaju se kod 34% obolelih (48). Razvijaju se na ekstenzornim stranama ekstremiteta i mestima pritiska (47). Češće se razvijaju kod seropozitivnih bolesnika. Njihov klinički značaj zavisi od broja i lokalizacije (49). Osim na ovim predilekcionim mestima, mogu se razviti i laringsu, plućima, srcu, skleri i centralnom nervnom sistemu. Ponekad, terapija metotreksatom (MTX) dovodi do pojave novih ili povećanja postojećih reumatoidnih čvorića (46).

Učestalost Sjogrenovog sindroma kreće se od 2,6 do 15% u različitim populacijama (2,48,50). Značajno češće se viđa kod osoba koje imaju pozitivna RF-IgM, ANA, anti-SSA i anti-SSB antitela (50). Iako se skleritis i episkleritis javljaju izuzetno retko (<1%) mogu imati ozbiljne komplikacije (Scleromalacia perforans) (46,48).

Preko 4% obolelih ima plućne manifestacije koje uključuju plućnu fibrozu i pleuritis. Mnogo ređe viđaju se arteritis sa plućnom hipertenzijom, difuzno alveolarno oštećenje, bronhiolitis, empijem, bronhopleuralne fistule, amiloidoza (2,48).

Jedna od najtežih kliničkih manifestacija je vaskulitis. Javlja se češće kod muškaraca i bolesnika sa erozivnom bolešću, visokim vrednostima RF antitela i već prisutnim vanzglobnim manifestacijama (46). Može se razviti kao distalni arteritis, dovesti do razvoja kožnih ulceracija, palpabilne purpore ili se može ispoljiti kao visceralni vaskulitis sa teškim oštećenjem unutrašnjih organa i nervnog sistema (2,46). Pojava vaskulitisa je povezana sa lošom prognozom bolesti (46).

Hematološki poremećaji kao što su normocitna hipohromna anemija i trombocitoza su često prisutne kao sekundarne manifestacije hronične zapaljenske bolesti (46). Feltijev sindrom se viđa kod manje od 1% obolelih od RA (48). Definiše se kao trijas znakova: RA, neutropenija, splenomegalija (47). Javlja se kod RF i ANA pozitivnih bolesnika sa reumatoidnim nodusima koji su i nosioci HLA-DRB1 alela koji kodiraju zajedničke epitope (valin 11, lizin 71, alanin 74) (29,46–48). Ovaj sindrom se dovodi u vezu sa povećanim rizikom od razvoja hematoloških maligniteta, najčešće Hočkinovog limfoma i ne hočkinovog B ćelijskog limfoma (46).

Gastrointestinalni trakt i urinarni trakt, prevashodno bubrezi su retko zahvaćeni u RA. Oštećenja koja nastaju u ovim organima mnogo češće su povezana sa toksičnim dejstvom primenjene terapije nego sa primarnim oboljenjem (46).

1.5. Dijagnoza reumatoidnog artritisa

Jedna od najvažnijih koraka u lečenju RA je postavljanje dijagnoze u ranoj fazi bolesti (1,51,52). Prvi kriterijumi korišćeni za dijagnozu reumatoidnog artritisa su definisani 1987. godine (Revidirani kriterijumi američkog reumatološkog društva (ARA)) (53). Radi se o klasifikacionim kriterijumima za potrebe kliničkih studija koji su razdvajali bolesnike sa RA od bolesnika sa drugim reumatskim bolestima (53,54). Kako bi se dijagnoza RA postavila na osnovu ARA revidiranih kriterijuma iz 1987. godine potrebno je prisustvo 4 od 7 kriterijuma u trajanju od najmanje 6 meseci (Tabela 1.) (53).

Tabela 1. Revidirani kriterijumi za klasifikaciju reumatoidnog artritisa američkog reumatološkog društva iz 1987. godine (53).

Kriterijumi		Definicija
1	Jutarnja ukočenost	Jutarnja ukočenost zglobova i/ili okolnog mekog tkiva u trajanju od najmanje sat vremena
2	Artritis najmanje 3 zgloba	Istovremeno prisustvo mekotkivnog otoka (ne koštane hipertrofije) koju je registovao lekar u najmanje tri zglobne regije od mogućih 14 (PIP, MCP, ručje, lakat, koleno, skočni i MTP zglobovi)
3	Artritis zglobova šaka	Prisustvo otoka bar jednog ručja, MCP ili PIP zgloba
4	Simetričan artritis	Istovremeno prisustvo artritisa istih regija na obe strane tela (bilateralno zahvatanje PIP, MCP i MTP zglobova je prihvatljivo i bez apsolutne simetrije)
5	Reumatoidni čvorići	Subkutani čvorići u predelima koštanih prominencija na ekstenzornim stranama ili u blizini zglobnih regija
6	Prisustvo reumatoidnog faktora	Pozitivan RF u serumu, određen bilo kojom metodom koja daje pozitivan rezultat kod manje od 5% zdrave populacije
7	Radiografske promene	Radiografske promene tipične za RA na zglobovima šaka i ručja (erozije i osteoporozna zglobnih okrajaka i regije u neposrednoj okolini)

Legenda: PIP, proksimalni interfalangealni zglob; MCP, metakarpofalangealni zglob; MTP, metatarzofalangealni zglob; RF, reumatoidni faktor.

Glavni nedostatak ovih kriterijuma je bila niska senzitivnost pri dijagnozi ranog artritisa (1,55). Zbog ove činjenice 2010. godine Američki koledž za reumatologiju (ACR) i Evropska liga za borbu protiv reumatizma (EULAR) su razvili nove klasifikacione kriterijume za RA (Tabela 2.) (1). Ovi kriterijumi su se pokazali senzitivnijim pri dijagnostikovanju reumatoidnog artritisa u ranim stadijumima. Glavni nedostatak ovih kriterijuma je problem pri prepoznavanju seronegativnog artritisa sa malim brojem zahvaćenih zglobova (1,55). Za dijagnozu RA prema klasifikacionim kriterijumima iz 2010. godine neophodno je prisustvo bar jednog otečenog zgloba (klinički potvrđen sinovitis) koji se ne može objasniti ni jednom drugom bolešću (1).

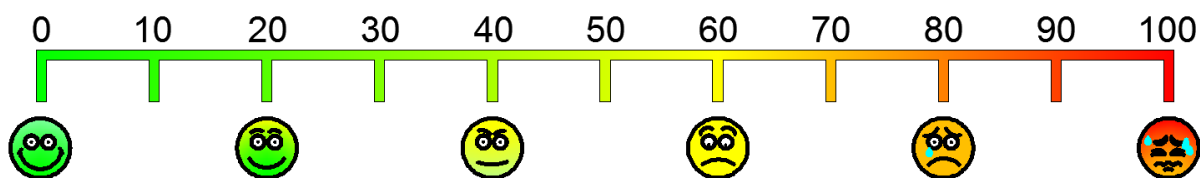
Tabela 2. ACR/EULAR kriterijumi za klasifikaciju reumatoidnog artritisa iz 2010. godine (1).

Kriterijumi		Skor
A	Zahvaćenost zglobova	
	1 veliki zglob	0
	2-10 velikih zglobova	1
	1-3 mala zglobova (sa ili bez zahvaćenih velikih zglobova)	2
	4-10 malih zglobova (sa ili bez zahvaćenih velikih zglobova)	3
	Više od 10 zglobova (od kojih je bar jedan mali)	5
B	Serologija	
	Negativan RF i negativna ACPA (manja vrednost od gornje referentne granice - GRG)	0
	Nisko pozitivni RF i/ili ACPA (vrednost između GRG i vrednosti 3 puta veće od GRG)	2
	Visoko pozitivni RF i/ili ACPA (vrednosti 3 puta više od GRG)	3
C	Reaktanti akutne faze	
	Normalne vrednosti SE i CRP	0
	Patološke vrednosti SE i CRP	1
D	Trajanje simptoma	
	< 6 nedelja	0
	≥ 6 nedelja	1

Legenda: ACR, američki koledž za reumatologiju; EULAR, evropska liga za borbu protiv reumatizma; RF, reumatoidni faktor; ACPA, antitela na citrulinisane peptide; SE, sedimentacija eritrocita; CRP, C-reaktivni protein.

1.6. Procena aktivnosti bolesti i odgovora na terapiju

U zapaljenskim bolestima teško je vršiti procenu aktivnosti bolesti na osnovu pojedinačnog parametra. Iz tog razloga razvijeno je nekoliko skorova koji objedinjuju više aspekata RA pri proceni stanja bolesnika. U savremenoj kliničkoj praksi se koriste Skor aktivnosti bolesti procenjen na 44 zglobova (Disease activity score – DAS), Skor aktivnosti bolesti procenjen na 28 zglobova (Disease activity score 28 - DAS28), Pojednostavljeni indeks aktivnosti bolesti (Simple Disease Activity Index – SDAI), Klinički indeks aktivnosti bolesti (Clinical Disease Activity Index - CDAI) (56,57). Skor aktivnosti bolesti procenjen na 28 zglobova (DAS28) je jednostavan i brz način da se proceni aktivnost reumatoidnog artritisa. On objedinjuje broj bolnih (BBZ) i otečenih zglobova (BOZ) sa SE i subjektivnom procenom opšteg zdravstvenog stanja svakog bolesnika. Otok i bol se beleže na 28 zglobova (proksimalni interfalangealni zglobovi šaka, metakarpofalangealni zglobovi, ručja, laktovi, ramena i kolena). Subjektivna procena opšteg zdravstvenog stanja se izražava ocenom od 0 (odsustvo tegoba) do 100 (potpuna onesposobljenost za svakodnevno funkcionisanje) na vizuelno-analognoj skali (VAS) (Slika 1.).



Slika 1. Vizuelno-analogni skala za subjektivnu procenu opsteg zdravstvenog stanja (modifikovano). Slika dostupna na <https://greatbrook.com/visual-analog-survey-scale/>.

Matematička formula koja se koristi za izračunavanje DAS28 skora glasi:

$$DAS28 = 0.56\sqrt{BBZ} + 0.28\sqrt{BOZ} + 0.70 \ln SE + 0.014\sqrt{VAS}$$

Evropska liga za borbu protiv reumatizma je 2005. godine objavio kriterijume za procenu odgovora na terapiju kod bolesnika obolelih od RA. Ovi kriterijumi su bazirani na promeni aktivnosti bolesti procenjene DAS28 skorom nakon 6 meseci od uvođenja terapije (Tabela 3.).

Tabela 3. EULAR kriterijumi za procenu odgovora na terapiju kod bolesnika sa reumatoidnim artritismom (56).

DAS28 skor pre početka terapije	Razlika između DAS28 skora pre početka terapije i nakon 6 meseci terapije		
	≤1,2	>0,6 i ≤1,2	≤0,6
≤3,2	Dobar odgovor		
>3,2 i ≤3,7		Umeren odgovor	Bez odgovora
>5,1			

Legenda: EULAR, Evropska liga za borbu protiv reumatizma; DAS28, skor aktivnosti bolesti procenjen na 28 zglobova

Prema ovim kriterijumima bolesnici se klasifikuju u grupe bolesnika sa dobrim odgovorom, umerenim odgovorom i bez odgovora na terapiju. Cilj ovakvog praćenja bolesnika je procena efikasnosti primenjene terapije i potrebe za njenim prilagođavanjem i/ili promenom (56).

1.7. Patogeneza reumatoidnog artritisa

Osnovna odlika reumatoidnog artritisa je hronična upala sinovije (58). Kod zdravih osoba sinovija se sastoji od sinoviocita koji izgrađuju intimu i subintimalnog vezivnog tkiva. Intima je sastavljena od 1-3 sloja sinoviocita, bez jasno definisane bazalne membrane (58,59). Sinoviociti mogu imati 2 fenotipa. Sinoviociti A tipa su poreklom od makrofaga, dok su sinoviociti B tipa tri puta češći i vode poreklo od fibroblasta (FSS - fibroblastima slični sinoviociti) (58,60). Subintimalno vezivno tkivo je sastavljeno od skromne vaskularne mreže i malog broja ćelija, prevashodno mastocita i mononukleara. Sinovijska intima okrenuta je ka sinovijskoj šupljini zgloba koju ograničava. Sinovijska tečnost ispunjava zglobnu šupljinu i predstavlja ultrafiltrat krvi koji sadrži malu količinu hijaluronske kiseline i lubricina koje proizvode FSS (58–60).

Već na samom početku bolesti dolazi do razvoja sinovitisa (59,61). Prve promene koje se mogu uočiti su hipertrofija intime sinovije i zapaljenski infiltrat. Zadebljanje intime nastaje na račun

povećanja broja mononuklearnih fagocita (58,62). U osnovi ove promene je gubitak kontaktne inhibicije sinoviocita (63).

Pored sinoviocita, T limfociti predstavljaju najbrojniju populaciju ćelija u sinoviji pacijenata sa RA (63). Kako bolest napreduje, u sinoviji se formiraju limfoidni čvorići (64). Sinovija se postepeno transformiše u invazivno tkivo koje se označava kao zreo panus (63,64). U fazi kada dolazi do razvoja panusa može se primetiti izražena neovaskularizacija u bazalnim delovima sinovije. Samo mesto kontakta panusa sa hrskavicom i koštanim strukturama sadrži relativno mali broj krvnih sudova. Ova pojava vodi u hipoksiju. Kao posledica nedostatka kiseonika dolazi do stvaranja velikih količina faktora angiogeneze od kojih posebno važnu ulogu igra endotelni vaskularni faktor rasta (EVGF) (60,64).

Potpuno razvijeni limfoidni čvorići sa germinativnim centrom mogu se naći kod oko 25% obolelih (64,65). Seropozitivni bolesnici pokazuju veću sklonost ka njihovom razvoju. O funkcionalnosti sinovijskih limfoidnih čvorića govori nekoliko studija na miševima koje su pokazale da ukoliko se transplantiraju, ovakvi čvorići, bez regrutacije novih imunih ćelija nastavljaju da podržavaju aktivnost B limfocita i ektopično stvaranje ACPA (64,66).

Sinovitis i invazivni panus vode ka progresivnom oštećenju zglobne hrskavice i kosti (58,67). Upravo se progresija i težina bolesti mogu procenjivati na osnovu prisustva i brzine razvoja erozija (67). Proces resorpcije kosti i razvoja erozija je veoma kompleksan. Delimično odgovornost snosi direktna invazija panusa i enzimska razgradnja matriksa hrskavice i kosti (58,67). FSS tokom zapaljenja stvaraju veliku količinu matriks metaloproteinaza (MMP). Tkivni inhibitor matriks metaloproteinaze (TIMP) koji je u relativnom nedostatku u sinovijskoj tečnosti nije u stanju da zaustavi ovu kaskadu (62,68,69). Povećana produkcija MMP je posledica stimulacije ovih ćelija prozapaljenjskim citokinima tokom zapaljenja (62,69). Sam panus je i izvor velike količine citokina, među kojima su i RANKL, IL-1, IL-17, TNF- α (62,67,70). Poseban značaj ima RANKL koji se vezuje za receptore na osteoklastima (RANK) i preko nuklearnog faktora kapa β (NF κ β) kaskade stimuliše njihovu diferencijaciju i aktivnost (71). Istovremeno peptidilargininska deiminaza (PADI) vrši citrulinizaciju vimentina u osteoklastima. Ovakve molekule prepoznaju ACPA koja dodatno aktiviraju osteoklaste (62,71). Aktivirani osteoklasti izazivaju strukturna oštećenja subhondralne kosti (68). Prve promene se razvijaju na mestu kontakta panusa i kosti, gde se radiografski primećuju i prve erozije (67). Osim erozija, u ranim fazama bolesti, na zglobnim okrajcima kosti može se registrovati edem koštane srži. Na području ovih promena, zbog gubitka koštanog tkiva, razvijaju se ciste koje se postepeno šire i postaju erozije (58).

Patogenetski mehanizmi koji pokreću hronični sinovitis su još uvek nedovoljno istraženi. U osnovi su genski polimorfizmi koji povećavaju podložnost oboljevanju od RA i dovode do gubitka tolerancije ka sopstvenim antigenima, dok su faktori spoljašnje sredine (pušenje, kvarcna prašina, virusi) u stanju da aktiviraju autoreaktivne limfocite (3,41,45,68).

Patogeneza bolesti najverovatnije počinje godinama pre ispoljavanja prvih kliničkih manifestacija. Tada dolazi do gubitka tolerancije na sopstvene antigene. Ova pretpostavka je potkrepljena činjenicom da se RF i anti-CCP antitela mogu naći u krvi obolelih godinama pre ispoljavanja bolesti (62,68). Anti-CCP antitela su heterogena grupa antitela usmerena prema citrulinisanim proteinima (fibrinogen, keratin, vimentin, kalretikulin, kolagen, fibronektin) (62,63,68). Iako citrulinizacija kao postranslaciona obrada proteina (prevođenje arginina u citrulin) nije sama po sebi patološka pojava niti je prisutna isključivo u reumatoidnom artritisu, primećeno da se češće pojavljuje kod ovih bolesnika (62,72). Kao posledica citrulinizacije može doći do izmene funkcije molekula. Druga mogućnost je da ovakva promena stvori novi epitop. Ovakav epitop, zatim, prepoznaje MHC molekul II klase koji je prisutan kod osoba sa genetičkom predispozicijom. Ovakav sled događaja primećen je nakon citrulinizacije kalretikulina (63). Neke studije pokazuju da

tokom vremena koncentracija ovih antitela raste i dostiže maksimum u vreme pojave prvih simptoma RA (62).

Precizan mehanizam kojim bi ova antitela mogla učestvovati u započinjanju bolesti nije sasvim jasan. Jedno od mogućih objašnjenja je stvaranje imunskih kompleksa. Specifičnost građe krvnih sudova sinovije je da imaju veliku propustljivost. Sinovijska membrana bez dobro organizovane bazalne membrane kao i bez okludentnih spojeva među sinovijskim ćelijama čini ovu barijeru veoma poroznom. Sve ovo na početku zapaljenja doprinosi povećanom taloženju prethodno stvorenih imunskih kompleksa u zglobovima distalnih delova ekstremiteta. Prisustvo ovakvih imunskih kompleksa je potvrđeno i u sinovijskoj tečnosti, kao i u panusu gde su lokalizovani zajedno sa komponentama komplementa. Oslobođeni hemotaksički molekuli privlače leukocite i doprinose stvaranju pozitivne povratne sprege. Dodatno, ACPA koja ulaze u zglobnu šupljinu su u stanju i da direktno aktiviraju makrofage i osteoklaste i time doprinesu razaranju koštanih struktura (62,64). Međutim, eksperimenti na životnjama su pokazali da sama antitela ne mogu započeti bolest kod zdrave jedinke, ali mogu pogoršati već prisutan artritis (62).

Ova antitela proizvode B limfociti koji se, kao i druge profesionalne antigen prezentujuće ćelije, mogu naći u sinoviji. Prisustvo i aktivnost T i B limfocita pokazuje značajno učešće stečene imunosti u etiopatogenezi oboljenja (63,68). RA se tradicionalno smatra bolešću posredovanom T limfocitima i četvrtim tipom preosetljivosti (73,74). Studije pokazuju da najznačajniju ulogu ima tip 1 T limfocita, iako se poslednjih godina sve više pažnje pridaje tipu 17 pomoćničkih T ćelija (68). B limfociti predstavljaju značajne antigen prezentujuće ćelije koje su u interakciji sa lokalnim T limfocitima. Mnoge od njih se transformišu u plazma ćelije i proizvode autoantitela posebno prema citrulisanim histonima H2A i H2B koji su relativno specifični za RA (62,64,68). Važno je naglasiti da je njihova uloga mnogo veća od same produkcije antitela i obuhvata produkciju prozapaljenskih citokina i prezentaciju antigena (68).

Infiltrat sinovije se sastoji i od velikog broja ćelija urođene imunosti. Centralnu ulogu u zapaljenju imaju makrofagi. Oni sekretuju prozapaljenske citokine TNF α , IL-1 β i IL-6 (60,62). Njihov značaj u razvoju oboljenja dokazuje, između ostalog, i efikasnost biološke terapije koja blokira ove citokine i njihove receptore (35,62,75). Navedena aktivnost makrofaga dovodi do stimulacije endotelnih ćelija što uz lučenje hemokina regrutuje još veći broj leukocita u zapaljensko žarište (35,62,64). Makrofagi, B-limfociti kao i dendritske ćelije pokazuju povećanu ekspresiju MHC molekula II klase kojim prezentuju antigene naivnim T limfocitima u žarištu zapaljenja (63,76,77). Antitela stvorena u sinoviji, kao i ona preuzeta iz cirkulacije mogu prepoznati citrulisane peptide sinovije i hrskavice i započeti aktivaciju komplementa. Raspadni produkti komplementa takođe privlače leukocite, koji nastavljaju sa lučenjem citokina i hemokina, što doprinosi razvoju ovog začaranog kruga (62).

Osim prozapaljenskih činilaca, važnu ulogu u razvoju zapaljenja imaju i antizapaljenski mehanizmi. Poznato je da M2 makrofagi i T regulatorne ćelije imaju ulogu u supresiji zapaljenskih procesa lučeći antizapaljenske citokine (IL-10, IL-4). Neke studije pokazuju da upravo kod osoba sa autoimunskim bolestima postoji poremećaj funkcije ovih leukocita (62,63).

Imunoregulatorne ćelije koriste i adenzinski sistem kao jedan od značajnih efektorskih mehanizama (78,79). Kod osoba sa RA kao akutni odgovor na hipoksiju i zapaljenje dolazi do povećanog stvaranja i lučenja adenzina. Kako bolest napreduje, a sa njom i hipoksija u zglobovima, dolazi do poremećaja funkcije mitohondrija i smanjene produkcije ATPa kao važnog prekursora u stvaranju adenzina. Kao odgovor na ovakvo stanje u zglobovima dolazi do povećanog ispoljavanja adenzinskih receptora na površini leukocita i sinoviocita (80–82). Kao stimulator ekspresije adenzinskih receptora u RA pokazala se i stimulacija TNF α i TLR receptora (83,84). Ovakva ćelijska aktivnost se zasniva na potrebi organizma da smanji zapaljenje ali je i

pokazano je da su stimulacija adenozinom i njegov neometan metabolizam potreban za preživljavanje sinoviocita (79,81,85).

1.8. Adenozin u zapaljenju

Purinski nukleozid, adenozin, se nakuplja u tkivima za vreme hipoksije i zapaljenja (81,85–87). Nastaje u ćeliji ali i van nje razgradnjom adenozin monofosfata (AMP). U citoplazmi adenozin nastaje od AMPa dejstvom 5' nukleotidaze. Njegova dalja sudbina može ići u pravcu daljeg metabolisanja u inozin dejstvom enzima adenozin deaminaze (ADA) ili može biti izlučen iz ćelije. Transport adenozina u vanćelijski prostor posredovan je proteinskim transporterima (ekvilibrijumski i koncentracijski nukleozid transporteri) (80,88). Deo adenozina se stvara i u vanćelijskom prostoru razgradnjom ATPa i ADPa sekretovanog iz ćelije (81,87). Transport ovih molekula iz ćelije se vrši putem koneksin i paneksin kanala (87). Na površini ćelije transportovani ATP/ADP se dejstvom CD39 (ektonukleozid trifosfat fosfohidrolaza) prvo prevode do AMPa, koji se zatim posredstvom CD73 (ekto 5' nukleotidaza) prevodi u adenozin (78,89). Deo adenozina nastaje na površini ćelijske membrane dejstvom CD38/CD203a, koji katališu metabolizam ADP-riboze nastale iz NAD⁺ (87). ADA, usidrena za spoljašnju stranu ćelijske membrane preko molekula CD26, dalje razlaže ekstracelularni adenozin do inozina (81,90). Deo adenozina može biti vraćen u ćeliju preko specifičnih nukleozidnih transportera (ENT1 i ENT2), a zatim korišćen za obnavljanje depoa ATPa (81).

Adenozin svoje dejstvo ostvaruje vezivanjem za adenozinske receptore (ADOR) (87,91). Do sada je opisano 4 tipa adenozinskih receptora, ADORA₁, ADORA_{2A}, ADORA_{2B}, ADORA₃. Svoje nazive su dobili, hronološki, prema vremenu otkrića (81,91). ADORA₁ i ADORA_{2A} reaguju na nanomolarne koncentracije adenozina, dok ADORA_{2B} i ADORA₃ pokazuju značajno niži afinitet prema ovom nukleozidu (81,92). Ovi ubikvitarni receptori prisutni su na leukocitima, antigen prezentujućim ćelijama (APC), endotelnim ćelijama, sinoviocitima i osteoklastima. Upravo preko njih adenozin reguliše zapaljenski odgovor (79,81,82,93).

Adenozinski receptori pripadaju klasi receptora vezanih za G-preoteine (87,91). ADORA_{2A} receptori aktiviraju G_{as} i G_{o1f} proteine, vodeći ka aktivaciji adenilat ciklaze i aktiviranju protein kinaze A. Sa druge strane ADORA₃ aktivira G_i i posledično smanjuje koncentraciju cAMPA u ćeliji (79,81).

Osobe obolele od RA već u ranoj fazi bolesti pokazuju povećanu ekspresiju ADORA_{2A} i ADORA₃ na leukocitima i sinoviocitima (82,84,94). Njihova aktivacija pokreće antizapaljenske mehanizme koji se ogledaju u promeni aktivnosti leukocita u prisustvu adenozina (79,81). Značajan deo antizapaljenskog dejstva adenozin ostvaruje smanjenjem hemotakse posredovane integrinima i selektinima. Aktivacija ADORA_{2A} dovodi do smanjene ekspresije adhezivnih molekula i na neutrofilima i na samim endotelnim ćelijama (79,95–97). Aktivacija ovih receptora vodi i smanjenju funkcije ovih leukocita, koja se između ostalog, ogleda u redukovanoj produkciji superoksida (81,95,98).

Makrofagi, ćelije koje imaju centralnu ulogu u funkciji urođene imunosti, takođe, menjaju svoje ponašanje u prisustvu adenozina. Pokazalo se da adenozin inhibira funkciju M1 makrofaga i dovodi do supresije produkcije citokina i oksida azota (79,81,99). Prisustvo adenozina indukuje promene fenotipa makrofaga iz prozapaljenskog M1 u M2 oblik, za koji se smatra da ima imunoregulatornu ulogu (79,81,100). Kao molekularna osnova ovakvog ponašanja makrofaga navodi se adenozin koji kao rani signal za oštećenje tkiva preko ADORA_{2A} smanjuje ekspresiju NFκβ. Na taj način se blokira TLR posredovano povećanje produkcije citokina, koje vodi upravo preko NFκβ transkripcionog faktora (83). Spajanjem makrofaga u koštanom tkivu formiraju se osteoklasti.

Njihovo povećano formiranje i aktivnost u RA preduslov su za nastajanje erozija na kostima. Pokazano je da je aktivacijom ADORA_{2A} i ADORA₃ moguće sprečiti stvaranje novih osteoklasta i smanjiti resorpciju kosti (101,102).

Tokom zapaljenskog odgovora dolazi do značajne aktivacije T limfocita. Kao rezultat dolazi do produkcije velikih količina citokina i stvaranja pozitivne povratne sprege sa ostalim komponentama stečenog i urođenog imuniteta. Ovakva aktivnost vodi ka značajnom oštećenju tkiva tokom autoimunskih bolesti. Aktivacija TCR CD4+ limfocita indukuje ekspresiju ADORA_{2A} i stvara povratnu spregu čiji je cilj da ograniči oštećenje tkiva (103). Njihova uključenost u TCR posredovane aktivnosti utiče na smanjenu produkciju IL-2 što za posledicu ima usporavanje proliferacije aktiviranih T limfocita. Podjednako su pogođeni i naivni i aktivirani T limfociti, kao i aktivacija i Th1 i Th2 odgovor, što podrazumeva smanjenu sekreciju IFN- γ i IL-4 pod uticajem adenzina. Kako se u prisustvu adenzina smanjuje mononuklearna produkcija IL-12, veza između urođenog i stečenog imuniteta je kompromitovana, što doprinosi supresiji aktivacije T limfocita i zapaljenja (99).

Pokazano je da su i citotoksični T limfociti (CTL) osetljivi na prisustvo adenzina. Njihov odgovor na ovaj nukleozid obuhvata smanjenje citotoksičnosti. Tada CTL smanjeno proizvode citokine i efektorske molekule (granzim, perforin, fas ligand) (104).

Kada se govori o imunoregulaciji ne smemo zaboraviti ulogu regulatornih T limfocita. Ova podgrupa CD4+CD25+ limfocita koristi nekoliko puteva za ostvarivanje imunosupresivnog dejstva. Jedan od njih vodi preko produkcije adenzina na samoj površini njihove ćelijske membrane, gde su eksprimirani CD39 i CD73 (78,105).

1.9. Metotreksat

Korišćenje antimetabolita u terapiji RA prvi put je zabeleženo početkom pedesetih godina dvadesetog veka. Tada su Gubner i saradnici prvi put primenili aminopterin u terapiji ovih bolesnika (106). Iako su rezultati ocenjeni kao povoljni, zbog toksičnih efekata i teškoća pri proizvodnji leka istraživanja su usmerena na razvoj drugog antifolatnog leka za tretman artritisa (106–108). Black i saradnici su po prvi put prijavili uspeh metotreksata u terapiji psorijaznog artritisa 1964. godine (108). Sredinom osamdesetih godina prošlog veka sprovedene su prve dvostruko-slepe studije sa randomizacijom i poređenjem sa placeboom koje su pokazale efikasnost MTX kod bolesnika sa RA (109–112). Američka administracija za hranu i lekove (FDA) odobrila je korišćenje metotreksata u terapiji reumatoidnog artritisa 1988 godine (107). I danas, nakon 30 godina, MTX je ostao zlatni standard u terapiji RA. Prema poslednjim preporukama EULAR/ACR iz 2016. godine ovaj lek se preporučuje kao prva terapijska linija pri započinjanju tretmana RA (52,75).

Terapija RA se značajno menjala u poslednjih 30 godina. Danas se u terapiji koriste sintetski bolest modifikujući lekovi (Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs – DMARD; MTX, antimalarici, sulfasalazin, leflunomid), glikokortikoidi, nesteroidni antiinflamatorni lekovi (NSAIL), biološki bolest modifikujući lekovi, biosimilari i inhibitori janus kinaze (JAK-inhibitori). Preporuka je da se bolest modifikujući lekovi uvedu u terapiju RA što je pre moguće, idealno u prva tri meseca od početka prvih simptoma (52,75). Cilj terapije je postizanje remisije ili niske aktivnosti bolesti u prvih 6 meseci od početka lečenja. Prema preporukama EULARa iz 2016. godine MTX predstavlja lek izbora za započinjanje terapije RA. Ova preporuka je bazirana na dobroj efikasnosti, niskoj ceni, kao i mogućnosti da se doza i put primene prilagode svakom bolesniku (75). Tako se MTX može primenjivati u monoterapiji, kombinovanoj i „step-up” terapiji (75,113).

Iako je dizajniran kao antifolatni lek sa ciljem da blokira dihidrofolat reduktazu (DHFR), ovo izgleda nije osnovni mehanizam njegovog imunomodulatornog dejstva u terapiji RA (114). Kako je MTX antifolat, radi prevencije neželjenih efekata leka u kliničkoj praksi se primenjuje i suplementacija folne kiseline (75). Kliničke studije su pokazale da primena folata smanjuje učestalost gastrointestinalnih neželjenih efekata, ali pri tome ne smanjuje efikasnost leka kod obolelih od RA (115,116). Samim tim, postavljalo se pitanje da li postoji drugi mehanizam kojim MTX ostvaruje svoje antizapaljensko dejstvo (89,114,117).

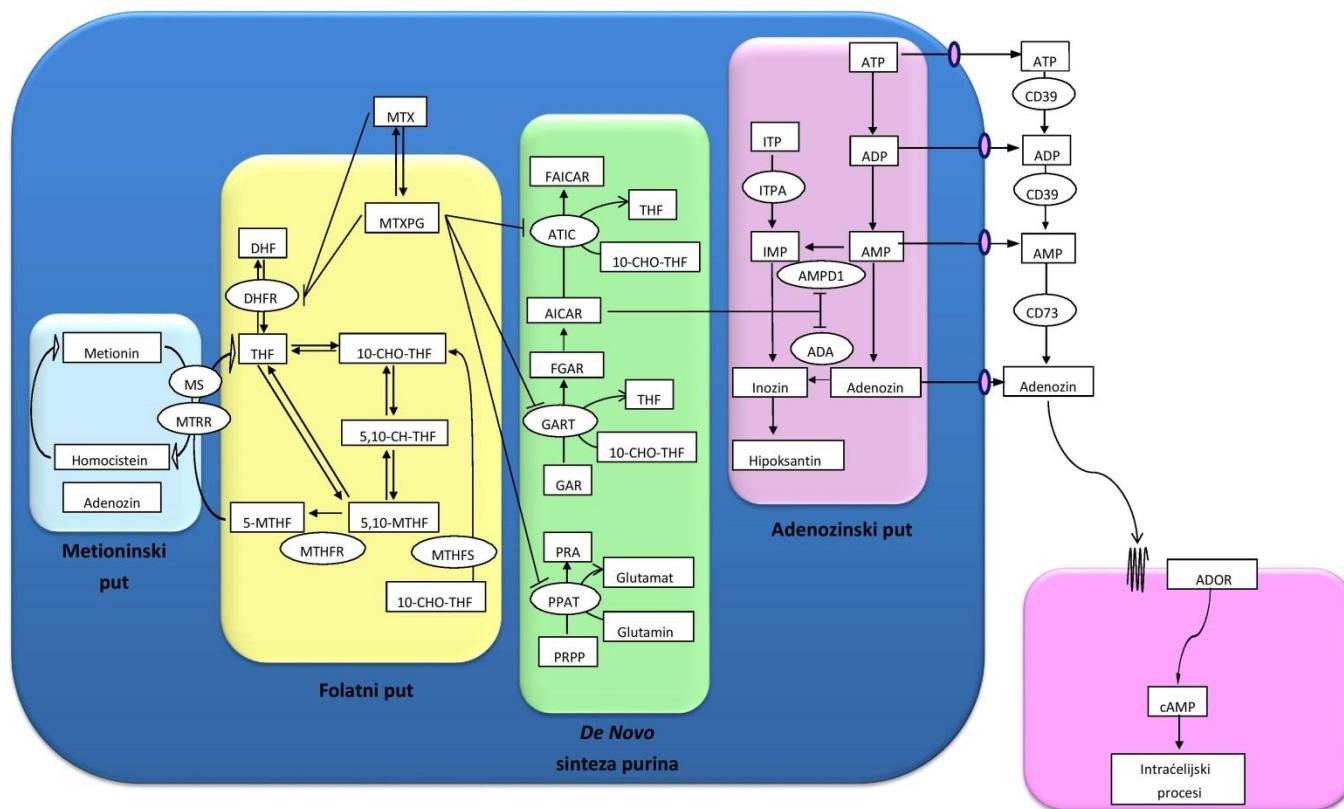
Istraživanja su pokazala da osim inhibicije enzima folatnog puta, MTX utiče na metioninski i adenzinski put kao i na *de novo* sintezu purina (Slika 2.) (117).

Nakon oralne primene, metotreksat se apsorbuje u tankom crevu. Ovaj proces obavlja se preko PCFT transportera (Proton coupled folate transporter) (114,118). U krvi je oko 50% MTX slobodno rastvoreno u plazmi, dok je ostatak vezan za proteine plazme (89,119). Najviše koncentracije u krvi se postižu 1-2h nakon unošenja leka *per os* (114,120). MTX se najvećim delom izlučuje preko bubrega, dok oko 10% (8,7-26%) podleže metabolizmu u jetri (89,114,121). Nakon približno 24h MTX se potpuno odstranjuje iz krvi (114,120).

Ćelije preuzimaju MTX iz krvi najvećim delom preko RFC1 (reduced folate carrier 1), ali u ovom procesu učestvuju i folatni receptori α , β i γ (89). U ćelijama metotreksat podleže poliglutamaciji koju vrši enzim folipoliglutamat sintetaza (FPGS). U poliglumatnom obliku MTX ne može napustiti ćeliju (89,122). Zahvaljujući ovom procesu održava se konstantna koncentracija MTX u ćelijama (114,123). Njegovu deglutamaciju vrši γ -glutamil hidrolaza (GGH), a transportu iz ćelija posreduju ATP-vezujuća kasetna subfamilija (ABCC1-ABCC5 i ABCG1) (89,114,122).

Metotreksat poliglumat (MTXPG), kao folatni analog, indukuje promene u folatnom ciklusu. Vezivanjem za enzim dihidrofolat reduktazu (DHFR) suprimira produkciju tetrahidrofolata (THF) (122). Iako sam MTX ne utiče na funkciju metilen tetrahidrofolat reduktaze (MTHFR), njegova smanjena funkcija za posledicu ima usporenu konverziju 5,10-metilen THF u 5-metil THF. Smanjene rezerve 5-metil THF vode ka usporavanju metioninskog ciklusa, što za posledicu ima nakupljanje homocisteina u ćelijama. Sam 5-metil THF se, upravo, kroz metioninski ciklus konvertuje u THF (124). THF je neophodan za sintezu DNK kao i za neometan metabolizam amino kiseline. MTXPG direktnom inhibicijom timidilat sintaze (TYMS) usporava prevođenje deoksiuridilata u deoksitimidilat. Smanjena aktivnost TYMS uz indukovani nedostatak THF je put kojim MTX ispoljava svoje dejstvo na sintezu pirimidina (122).

U ćelijama se MTX-poliglumat visokim afinitetom vezuje za enzim 5-aminoimidazol 4-karboksamid ribonukleotid (AICAR) formiltransferazu (89,114,125). Kao posledica dolazi do nagomilavanja AICARa u ćelijama. Ovaj molekul se ponaša kao kompetitivni inhibitor enzima adenzin deaminaze (ADA) i adenzin monofosfat deaminaze 1 (AMPD1). Posledično ADA smanjuje metabolizam adenzina u inozin, dok AMPD1 vrši usporenu konverziju adenzin monofosfata (AMP) u inozin monofosfat (IMP) (92,125). U ovakvim uslovima u intracelularnom prostoru dolazi do nakupljanja adenzina u višku i njegovog povećanog izlučivanja iz ćelije. Ovaj adenzin je tada slobodan da se veže za svoje receptore (89,114,126).



Slika 2. Sematski prikaz metaboličkih puteva na koje utiče metotreksat. Legenda: 10-CHO-THF, 10-formiltetrahidrofolat; 5,10-CH-THF, 5,10-meteniltetrahidrofolat; 5,10-MTHF, 5,10-metilentetrahidrofolat; 5-MTHF, 5 metiltetrahidrofolat; ADA, adenzin deaminaza; ADOR, adenzinski receptori; ADP, adenzin difosfat; AICAR, 5-aminoimidazol-4-karboksiamid ribonukleotid; AMP, adenzin monofosfat; AMPD1, adenzin monofosfat deaminaza 1; ATIC, 5-aminoimidazol-4-karboksiamid ribonukleotid formiltransferaza; ATP, adenzin trifosfat; cAMP, ciklični adenzin monofosfat; CD39, ektonukleozid trifosfat fosfohidrolaza; CD73, ekto 5' nukleotidaza; DHF, dihidrofolat; DHFR, dihidrofolat reduktaza; FAICAR, 5-formamidoimidazol-4-karboksamid ribotid; FGAR, fosforibozil-N-formilglocinamid; GAR, glicinamid ribonukleotid; GART, fosforibozilglicinamid formiltransferaza; IMP, inozinmonofosfat; ITP, inozintrifosfat; ITPA, inozin trifosfat pirofosfataza; MS, metionin sintetaza; MTHFR, metilentetrahidrofolat reduktaza; MTHFS, meteniltetrahidrofolat sintetaza; MTRR, 5-metiltetrahidrofolat-homocistein metiltransferaze reduktaza; MTXPG, metotreksat poliglutamat; PPAT, amidofosforiboziltransferaza; PRA, 5-fosforibozil-1-amin; PRPP, Fosforibozil pirofosfat; THF, tetrahidrofolat (117).

1.10. Adenzinski receptori

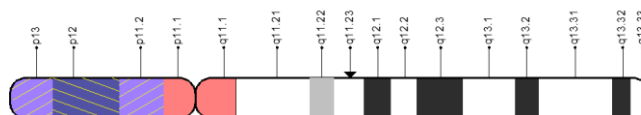
Istraživanja na *knock-out* miševima su pokazala da su adenzinski receptori ADORA_{2A} i ADORA₃ neophodni za dejstvo metotreksata. Jedinke koje ne ekspimiraju ove receptore nisu imale odgovor na MTX i njegove analoge (127). Pokazano je da već u u ranim fazama bolesti (tegohe koje traju manje od 6 meseci) dolazi do povećane ekspresije ADORA_{2A} i ADORA₃ na leukocitima (84,94). Značaj ADOR pokazuje i podatak da je ekspresija ovih receptora na leukocitima obolelih osoba obrnuto srazmerna aktivnosti bolesti, bilo da se ona meri DAS ili DAS28 indeksom (94). Ovi receptori su prisutni na ćelijama sinovije. Kod RA bolesnika dominantno su prisutni ADORA₃, čija je ekspresija značajno povećana u poređenju sa zdravim kontrolama. Iako se ekspresija ADORA_{2A}

na sinoviocitima ne razlikuje između zdravih i osoba obolelih od RA pokazano je da su značajno više eksprimirani kod obolelih osoba koje primaju MTX, nego kod obolelih koji nisu primali ovaj lek (82).

1.10.1. *ADORA_{2A}*

ADORA_{2A} je kodiran genom (*ADORA_{2A}*) na hromozomu 22 (22q11.2) (Slika 3.) (128). Gen je veličine 9-10kb. Sastoji se od od 2 egzona koji su rastavljena jednim intronom. Intron ima dužinu 6,4kb i lociran je između regiona koji kodiraju treći i četvrti transmembranski domen (u regionu koji kodira drugu intracelularnu petlju), između koda za arginin (Arg-111) i tirozin (Tyr-112) (128,129). Gen sadrži jedan mikrosatelitni domen sastavljen od 7 motiva, (GGAC)₄TGAC(GGAC)₂ (128). Dužina iRNK od približno 2,6kb odgovara veličini kodirajućeg regiona ovog gena (129). Proteinski produkt se sastoji od 412 amino kiselina (128).

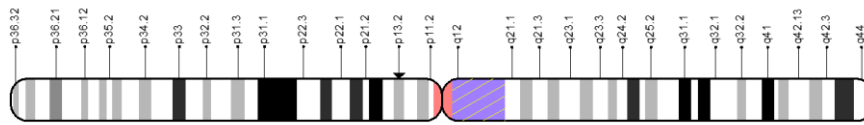
Novija istraživanja navode da postoji mogućnost postojanja nekodirajućeg egzona i šest potencijalnih promotora *ADORA_{2A}* gena. Ovo bi omogućilo nastanak više različitih, najverovatnije, tkivno specifičnih transkripata i formiranja alternativnih izoformi receptora (130).



Slika 3. Šematski prikaz 22. hromozoma sa lokacijom *ADORA_{2A}* gena (modifikovano). Slika dostupna na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/tools/gdp/>.

1.10.2. *ADORA₃*

Gen za *ADORA₃* je lokalizovan na hromozomu 1 (1p13) (Slika 4.) (131). Gen se sastoji od dva egzona razdvojena intronom od oko 2,2kb (132). Intron se nalazi u predelu druge intracelularne petlje neposredno posle sekvence gena koji kodira treći transmembranski domen (131,132). Transkripcija iRNK počinje 325bp ushodno od startnog kodona (132). U 5'UTR regionu locirani su promotor koji ne sadrži TATA-box i klasičan CAAT-box, ali su prisutna dva CAAT-boxu slična regiona. Prisustvo dve Sp-1, TCF-2- α , E2aECB vezujuće sekvence kao i mesto vezivanja NF-IL6 i CRE faktora može objasniti ulogu ovoga gena u imunom odgovoru (131,132). Murrison i saradnici su prijavili da se proteinski produkt ovog gena sastoji od 319 aminokiselina, dok su Salvatore i saradnici prijavili 318 aminokiselina (132,133).



Slika 4. Šematski prikaz 1. hromozoma sa lokacijom *ADORA3* gena (modifikovano). Slika dostupna na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/tools/gdp/>.

1.11. *ITPA*

Inozin trifosfataza (*ITPA*) ili inozin trifosfat pirofosfohidrolaza je enzim kodiran genom koji je lociran na kratkom kraku hromozoma 20 (20p13) (134,135). Sastoji se od 8 egzona koji kodiraju proteinski produkt koji se sastoji od 194 aminokiseline i čija molekularna masa iznosi 21501Da (136,137).

1.12. Polimorfizmi pojedinačnih nukleotida u *ADORA2A*, *ADORA3* i *ITPA* genu i njihov značaj

Varijacije u humanom genomu mogu imati različite forme. Najčešće su prisutne tačkaste promene u vidu supstitucija jednog baznog para ili promene u vidu delecija i insercija samo jednog baznog para. Promene mogu zahvatati i značajno veći deo genoma kada govorimo o inverzijama, translokacijama, delecijama i duplikacijama. Poseban oblik mutacija predstavljaju varijacije u broju ponovaka jedne sekvence, kada se menja broj kopija gena u ćeliji (138,139).

Retke promene u genomu kod kojih je učestalost retkog alela (Minor Allele Frequency - MAF) manja od 1% označavaju se kao mutacije. Obično se, ali ne uvek, povezuju sa nastankom bolesti. Sa druge strane polimorfizmi su varijacije u genomu kod kojih je $MAF > 1\%$. Njihova visoka učestalost u populaciji sugerše da se one prirodno dešavaju u populaciji i da potencijalno imaju pozitivan evolutivni efekat. Polimorfizmi pojedinačnih nukleotida (Single Nucleotide Polymorphism - SNP) predstavljaju najčešći oblik polimorfizma. Dešavaju se na svakih 300-1000 baznih parova. Mogu se nalaziti u nekodirajućim regionima koji imaju regulatornu ulogu, ali su prisutni i u kodirajućim regionima, intronima i u nekodirajućim sekvencama između gena (138,140).

Farmakogenetika je nauka koja se bavi identifikacijom onih genskih varijanti koje mogu uticati na ishod medikamentozne terapije. Od svojih začetaka 1959. godine farmakogenetika je prešla dug put ka primeni u kliničkoj praksi. Značajan doprinos u razvoju farmakogenetike imali su Projekat humanog genoma i studije asocijacije (genome-wide association study – GWA studije). Geni kandidati koji nameću svoj značaj kroz ove studije pre rutinske primene u praksi moraju biti podvrgnuti pojedinačnoj validaciji. Genske varijante značajne za farmakogenetiku su upravo one koje mogu uticati na farmakokinetiku i farmakodinamiku primenjenog leka kod nosioca. Primenjivost farmakogenetičkih studija se meri mogućnošću da se primeni efikasna zamena kod osoba koje imaju genotipski veliki rizik od neuspeha tretmana ili neželjenih efekata (141).

Značaj polimorfizma *ADORA2A* gena bili su češće predmet istraživanja nego što je to slučaj sa varijacijama u *ADORA3* genu. Polimorfizam rs2298383 *ADORA2A* gena se nalazi ushodno

pozicioniran u predelu promotora gena. U evropskoj populaciji C alel je ređi sa učestalošću od 41,4%. Osobe sa CC genotipom imaju veću ekspresiju ovoga gena nego nosioci T alela, što pokazuje značaj ovog polimorfizma (142). Intronski polimorfizam rs2236624 je značajno ređe ispitivan. Minorni T alel na ovoj poziciji se kod Evropljana može naći kod 26,9% populacije. Iako egzonski polimorfizam rs5751876 C>T ne dovodi do izmene tirozina na 361 poziciji, njegov uticaj na funkciju *ADORA2A* gena može se objasniti uticajem na samu brzinu prepisivanja iRNK (143–145). Polimorfizam rs17004921 čiji MAF (T) u evropskoj populaciji iznosi 8,3% se nalazi u blizini 3' kraja *ADORA2A* gena (145). Do sada je retko ispitivan u studijama, te je njegov uticaj na ekspresiju gena još uvek nepoznat.

Izbrani polimorfizmi u *ADORA3* genu su rs2298191, rs1544223, rs3393 i pozicionirani su u potencijalno regulatornim regionima ovoga gena (145).

Polimorfizam rs2298191 lociran je u promotoru, ushodno od gena na poziciji -2288 (146). Prema studiji 1000 genoma u Evropi učestalost minornog, C alela na ovoj poziciji iznosi 30,5% (145). Do sada je ispitivan njegov uticaj na klinička ispoljavanja astme, gde nije pokazao značajan efekat i pored svoje pozicije u promotoru (146). Pozicija polimorfizma rs1544223 je 581 bazni par ushodno od prvog egzona. Kod 76,1% ljudi prisutan je T alel, dok minorni C alel ima učestalost od 23,9% (145). Studije su pokazale da je ovaj polimorfizam u kompletnom disekvilibrijumu sa polimorfizmom rs1544224, za koga je pokazano da utiče na frekvenciju pojavljivanja neželjenih efekata terapije kod obolelih od RA (82). Polimorfizam rs3393 je lociran u 3'UTR regionu. Na globalnom nivou na ovoj poziciji češće je prisutan guanin, dok je u evropskoj populaciji njegoa učestalost 44,2% (145).

Polimorfizam rs1127354 je lociran u drugom egzonu *ITPA* gena (135). Transverzija 94C>A dovodi do zamena prolina treoninom u proteinskom produktu (135,147). Kao posledica dolazi do smanjenja enzimske aktivnosti ITPA, pri čemu heterozigoti zadržavaju svega 25% normalne aktivnosti enzima, dok je kod osoba koje su mutirani homozigoti enzimska aktivnost svedena na 1% aktivnosti koja se viđa kod normalnih homozigota (147).

2. CILJEVI

CILJEVI ISTRAŽIVANJA:

U istraživanje će biti uključeni bolesnici sa reumatoidnim artritismom lečeni monoterapijom metotreksatom u trajanju od najmanje šest meseci na Institutu za reumatologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu. Ciljevi istraživanja su da se:

1. Utvrdi učestalost genotipova i alela polimorfizama gena za adenzinske receptore i enzime adenzinskog puta (4 polimorfizma u genu za ADORA2A, 3 polimorfizama u genu za ADORA3 i jedan polimorfizam u genu za ITPA).
2. Ispita povezanost odabranih polimorfničkih genskih varijanti sa efikasnošću metotreksata, koja će se procenjivati prema EULAR-ovim (European League Against Rheumatism) kriterijumima.
3. Analizira povezanost odabranih polimorfničkih genskih varijanti sa neželjenim dejstvima metotreksata.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Bolesnici

U studiju je uključeno 127 bolesnika kojima je dijagnoza postavljena na Institutu za reumatologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu. U postavljanju dijagnoze bolesti korišćeni su ACR klasifikacioni kriterijumi iz 1987. godine (53). Učesnici studije lečeni su MTXom u monoterapiji od strane istog lekara, najkraće 6 meseci. Bolesnici su uz terapiju metotreksatom primali po potrebi NSAIL i kortikosteroidnu per/os terapiju. Nakon 24h od primene MTXa bolesnici su dobijali suplementacionu terapiju folnom kiselinom (Folan 5mg). Iz studije su isključeni svi bolesnici koji su primali intraartikularne kortikosteroide. Svi bolesnici su bili stariji od 18 god. Istraživanja su sprovedena u skladu sa Helisiškom deklaracijom i odobreno je od strane Etičkog odbora Instituta za reumatologiju i Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Na početku terapije svim bolesnicima je određena aktivnost bolesti primenom DAS28 indeksa. Merenje je ponovljeno nakon 6 meseci. Efikasnost terapije je utvrđena na osnovu EULAR kriterijuma za procenu odgovora na terapiju (56). Na osnovu primenjenih EULAR kriterijuma bolesnici su klasifikovani u tri grupe, bolesnici koji su imali dobar odgovor, bolesnici koji su imali umeren odgovor i bolesnici koji su bili bez odgovora na terapiju (Tabela 3.).

Dodatno su bolesnici sa dobrim i umerenim odgovorom grupisani kao bolesnici koji „pokazuju odgovor na terapiju“, dok su oboleli koji su bili bez odgovora činili grupu bolesnika koja „ne pokazuje odgovor na terapiju“.

Kao značajan pokazatelj aktivnosti bolesti, dužina trajanja jutarnje ukočenosti praćena je pre započinjanja terapije i ponovo nakon 6 meseci.

Za svakog bolesnika pre započinjanja terapije određen je status seropozitivnosti na osnovu prisustva RF antitela ili anti-CCP antitela. Prikupljeni su podaci o prisustvu i titru antinuklearnih antitela (ANA). Titar iznad 1/80 smatran je pozitivnim.

Tokom 6 meseci praćenja bolesnika, prikupljeni su podaci o pojavi neželjenih efekata. Pojavu neželjenih efekata prijavljivali su bolesnici prilikom uzimanja anamnestičkih podataka i dodatno je evidentiran od strane lekara na osnovu kliničkog pregleda i laboratorijskih analiza. Neželjeni efekti su podeljeni na osnovu sistema organa u kojima se ispoljavaju. Gastrointestinalna toksičnost se ispoljava u vidu anoreksije, mučnine i povraćanja. Hepatotoksičnost je dijagnostikovana na osnovu skoka aspartat (AST) i alanin aminotransferaza (ALT). Dispnea, kašalj i pneumonitis su registrovani kao pulmonalni neželjeni efekti. Dermatološki neželjeni efekti podrazumevali su promene na koži u vidu opadanje kose, osipa i vaskulitisa. Trombocitopenija, leukocitopenija i pancitopenija predstavljali su neželjene efekte u koštanoj srži. Neželjeni efekti su klasifikovani na blage, umerene i teške. U blage neželjene efekte svrstani su mučnina, porast transaminaza do tri puta u odnosu na gornju referentnu vrednost, kašalj, alopecija, trombocitopenija ($100-150 \times 10^9/l$) i leukocitopeniju ($3-4 \times 10^9/l$). Umereni neželjeni efekti podrazumevali su anoreksiju, mučninu praćenu povraćanjem, porast transaminaza više od tri puta u odnosu na gornju referentnu vrednost, dispneu, difuzni gubitak kose, mukozitis, trombocitopeniju ($70-100 \times 10^9/l$) i leukocitopeniju ($2-3 \times 10^9/l$). Neželjeni efekti koji su zahtevali hospitalizaciju svrstani su u teške neželjene efekte: pneumonitis, trombocitopenija ($70 \times 10^9/l$) i leukocitopenija ($2 \times 10^9/l$).

Kod bolesnika uključenih u studiju praćena je i radiografska progresija bolesti. Nakon 6 meseci terapije na standardnim radiografskim snimcima šaka i stopala beležena je pojava erozija.

3.2. Izolacija DNK

Izolacija DNK vršena je modifikovanom metodom isoljavanja po Mileru iz limfocita periferne krvi (148). Limfociti periferne krvi su najpristupačniji za izolaciju genomske DNK. Od svakog bolesnika je uzimano po 5ml venske krvi sa antikoagulansom (Na-citrat). U krv je dodavan isti volumen pufera za lizu (0,32M saharoza, 10mM Tris, 1% Triton100, 5mM MgCl₂) nakon čega je sledila inkubacija 10-15 minuta.

Smeša je centrifugirana na 2800rpm u trajanju od 10 minuta, supernatant se odlivao, a pelat se resuspendovao u 5-10ml fizio pufera (0,075M NaCl, 0,025M EDTA pH 8). Postupak je ponavljan 1-2 puta, dok pelat ne bi dobio beličastu boju. Posle svakog ispiranja vršeno je centrifugiranje 10 minuta na 2800rpm. Višestrukim ispiranjem postizalo se odstranjivanje membrana liziranih ćelija.

Nakon poslednjeg ispiranja i odlivanja supernatanta, talogu se dodavalo 3ml pufera A (10mM TrisHcl, 400mM NaCl, 2mM EDTA pH 8), 200μl 10% SDS i 50μl rastvora proteinaze K (10mg/ml). Uzorak bi se dobro resuspendovao i ostavi preko noći u termostatu na temperaturi od 37°C.

Sledećeg dana uzorku je dodavan 1ml NaCl (6M/ml), koji povećava rastvorljivost DNK. Nakon snažnog mućkanja dobijeni rastvor beličaste boje se centrifugirao 10 minuta na 2800rpm, kako bi se proteini istaložili, a supernatant se prenosio u čistu staklenu epruvetu od 10ml. Opisani process precipitacije proteina se ponovljao još dva puta.

Posle poslednjeg centrifugiranja supernatant se odvajao u čistu graduisanu epruvetu. Nakon utvrđivanja dobijenog volumena supernatanta, dodavao se isti volumen izopropanola. Pažljivim mućkanjem DNK se precipitirala u vidu beličastog končića. Dobijeni DNK uzorak se namotavao na zakrivljenu Pasterovu pipetu i potapao 30 sekundi u 70% hladan etanol. DNK se sušila na vazduhu tridesetak mintu i postupak se ponavljao još jednom. DNK se zatim rastvarala u 300μl H₂O.

Koncentracija DNK u rastvoru se određivala merenjem apsorbancije na $\lambda=260\text{nm}$ za DNK i $\lambda=280\text{nm}$ za rezidualne protein. Absorbanciju od 1OD daje 50μg/ml dvolančane DNK. Formula za dobijanje koncentracijeDNK je:

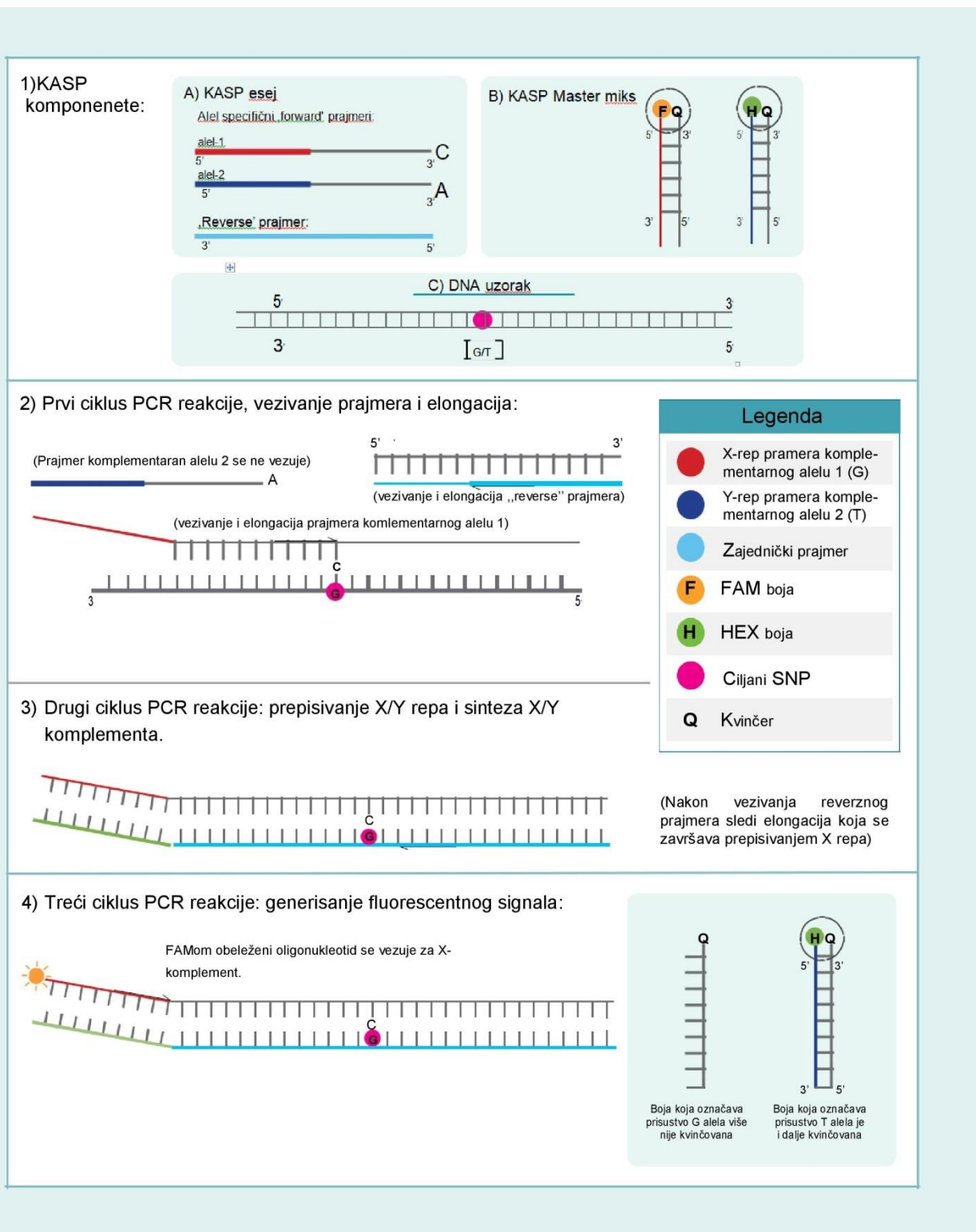
$$[\text{DNK}] = A_{260\text{nm}} \times 50\mu\text{g/ml} \times \text{razblaženje}$$

Odnos absorbancija na $\lambda=260\text{nm}$ i $\lambda=280\text{nm}$ ($A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$) daje informaciju o čistoći dobijenog uzorka. Ukoliko je odnos absorbancija 1,8-2,0 smatralo se da uzorak ima visoku čistoću, dok odnos manji od 1,8 ukazuje na prisustvo rezidualnih proteina.

3.3. KASP genotipizacija

Genotipizacija je izvršena primenom KASP (**K**ompetitive **A**llele **S**pecific **P**CR) metode (Slika 5.). Reakcija se vršila u optičkim pločama sa 96 bunarića (MicroAmp, Optical 96-weel reaction plate, Applied Biosystems) u Real-Time PCR aparatu (7500 Real-Time PCR System, Applied Biosystems). Metoda KASP predstavlja kompetitivni alel specifični PCR koji omogućava visoku preciznost genotipizacije kod dvoalelnih polimorfizama, insercija i delecija. Kitovi KASP za genotipizaciju sastoje se od KASP eseja i KASP master mix-a. U sastavu KASP eseja nalaze se dva tipa alel specifičnih „forward” prajmera i zajednički „reverse” prajmer. Svaki alel specifični prajmer na 5' kraju sadrži sekvencu koja odgovara jednoj od dve FRET (fluorescence resonant energy transfer) kasete. Jedna FRET kasete je obeležena bojom FAMTM, dok je za drugu vezana

boja HEX™. Kasete FRET zajedno sa Taq-polimerazom, ROX™ pasivnom referentnom bojom, slobodnim nukleotidima i optimizovanim puferom čine master miks.



Slika 5. Genotipizacija pomoću KASP metode (modifikovano). Slika dostupna na <https://biosearch-cdn.azureedge.net/assetsv6/kasp-explanation-fact-sheet.pdf>.

U prvom koraku temperatura od 94°C omogućava aktivaciju specijalno izmenjene KASP Taq-polimeraze. Nakon denaturacije DNK na istoj temperaturi sledi faza vezivanja prajmera (hibridizacija) i ekstenzije koje se odvijaju na istoj temperaturi.

Alel specifični prajmeri imaju identičan središnji deo oligonukleotidne sekvence i razlikuju se po svom 3' i 5' kraju. Prva razlika podrazumeva da se na 3' kraju nalazi jedan od dva moguća nukleotida koji su komplementarni SNP targetu. U kompeticiji za vezujuće mesto pobiće prajmer koji je 100% komplementaran prisutnom alelu. Ukoliko se greškom veže pogrešan prajmer specifično modifikovana KASP Taq-polimeraza neće započeti ekstenziju. Reverzni, nespecifični prajmer se veže za naspramni lanac ispitivane DNK, nezavisno od toga koji je alel prisutan.

Nakon hibridizacije prajmera, nastavlja se proces ekstenzije. Sekvenca na 5' kraju prajmera nije komplementarna ispitivanoj DNK i naziva se X-rep ili Y-rep. Tokom ekstenzije u 1. ciklusu PCR reakcije će biti inkorporirana u PCR produkt. Prilikom narednog ciklusa prepisuje se DNK produkt sastavljen od lanca ispitivane DNK i novonastalog lanca koji sadrži prajmer sa X/Y-repom. U ovom koraku tokom anilinga X/Y-rep se prepisuju i nastaje njemu komplementaran segment pod nazivom X/Y-komplement. Postojanje ovakve sekvence omogućava da se tokom narednog ciklusa za njega vežu FAM ili HEX obeleženi oligonukleotidi. Oni se pre vezivanja nalaze u sastavu FRAT kasete. Prilikom svog vezivanja za X/Y-komplement oni služe kao prajmeri za novi DNK lanac i postaju deo PCR produkta.

Kada se FAM ili HEX obeleženi oligonukleotidi nalaze „kvinčovane” u obliku FRAT kasete one ne emituju fluorescencu. Kada se jedan od obeleženih oligonukleotida veže za ispitivanu DNK i postaje deo produkta on počinje da emituje fluorescencu, dok se koncentracija njegove kvinčovane forme u obliku FRAT kasete smanjuje.

Ovo je „End-point” reakcija što podrazumeva da se fluorescenca meri na kraju PCR procesa. Rezultati izmerene fluorescence predstavljaju se u koordinatnom sistemu. Alel označen FAM bojom se predstavlja na X-osi, dok se alel označen HEX bojom predstavlja na Y-osi.

Prema uputstvu proizvođača korišćena su 3 različita temperaturna protokola. Temperaturni protokol KASPAR-63°C korišćen je za polimorfizme rs2298383 i rs5751876 ADORA_{2A} gena. Za polimorfizme rs2236624, rs17004921 ADORA_{2A} gena i rs2298191 ADORA₃ gena preporučen je protokol 65-57°C TD (touchdown). Za polimorfizme ADORA₃ gena rs1544223 i rs3393 i ITPA gena rs1127354 korišćen je 61-55°C TD protokol (Tabela 4.).

U slučaju nedovoljne replikacije na kraju PCR reakcije ponuđen je protokol za recikliranje. Prema ovom protokolu koji je dozvoljeno ponoviti do dva puta, uvode se još tri ciklusa nakon kojih se ponavlja čitanje rezultata.

Tabela 4. Tabelarni prikaz temperaturnih protokola korišćenih za genotipizaciju KASP metodom

KASPAR-TD61-55			
Etapa protokola	T [°C]	t [s]	ciklusi
„Hot start” aktivacija Taq- polimeraze	94	15 min	1x
„Touchdown” etapa	94	20	10x *
	61	60	
Etapa amplifikacije	94	10	28x
	55	60	
Etapa čitanja rezultata	30	1 min	1x

* smanjivanje temperature elongacije za po 0,6°C svakog ciklusa dok se ne dostigne temperatura hibridizacije / elongacije (55°C)

KASPAR-TD65-57			
Etapa protokola	T [°C]	t [s]	ciklusi
„Hot start” aktivacija Taq- polimeraze	94	15 min	1x
„Touchdown” etapa	94	20	10x **
	65	60	
Etapa amplifikacije	94	20	28x
	57	60	
Etapa čitanja rezultata	30	1 min	1x

** smanjivanje temperature elongacije za po 0,8°C svakog ciklusa dok se ne dostigne temperatura hibridizacije/elongacije (57°C)

KASPAR-63			
Etapa protokola	T [°C]	t [s]	ciklusi
„Hot start” aktivacija Taq- polimeraze	94	15 min	1x
Etapa amplifikacije	94	10	34x
	63	60	
Etapa čitanja rezultata	30	1 min	1x

Protokol za recikliranje			
Etapa protokola	T [°C]	t [s]	ciklusi
Etapa amplifikacije	94	10	3x
	57	60	
Etapa čitanja rezultata	30	1 min	1x

3.4. Statistička obrada podataka

Statistička obrada rezultata je izvršena pomoću SPSS 16 programskog paketa i Haploview 4.2 softvera. Nakon genotipizacije utvrđene su apsolutne učestalosti alela i genotipova. Za opisivanje dobijenih podataka korišćene su metode deskriptivne statistike (mere centralne tendencije i mere varijabiliteta), tabeliranje i grafičko prikazivanje. U statističkoj analizi korišćene su parametarske i neparametarske statističke analitičke metode. Za poređenje učestalosti korišćeni su χ^2 i Fišerov test. Za poređenje kontinualnih varijabli korišćeni su studentov t-test, analiza varijanse (ANOVA), split-plot ANOVA ili odgovarajuće neparametarske zamene. Povezanost varijabli je ispitivana testovima korelacije (Spirman i Pirson) i regresije (multipla i logistička). Analiza haplotipova i izvršena je korišćenjem Haploview softvera (verzija 4.2). Haplotipski blokovi su procenjivani „Confidence intervals LD (linkage disequilibrium)“ metodom.

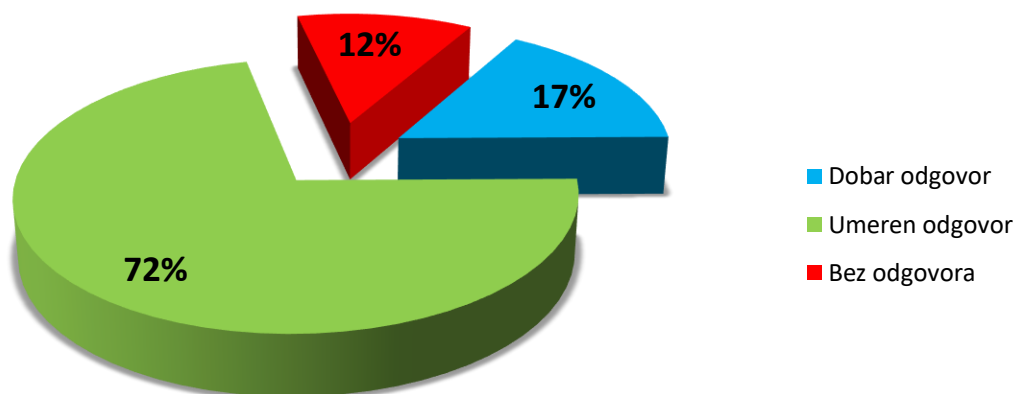
4. REZULTATI

4.1. Klinička i laboratorijska ispitivanja

Ispitivanje je obuhvatilo 127 bolesnika sa RA lečenih monoterapijom metotreksatom na Institutu za reumatologiju u Beogradu. Među bolesnicima je bilo 94 (74%) žene i 33 (26%) muškarca. Prosečna starost bolesnika je bila $56,7 \pm 10,8$ godina.

Prosečna doza metotreksata koju su bolesnici primali iznosila je $12,1 \pm 3,2$ mg. Suplementacija folne kiseline primenjena je kod 90 (70,9%) bolesnika. Suportivnu glikokortikoidnu terapiju primalo je 66 (52%) bolesnika. Demografski i klinički podaci prikazani su u Tabeli 5.

Prema EULAR kriterijumima, odgovor na terapiju imalo je 112 (88,2%) bolesnika. Dobar odgovor na terapiju evidentiran je kod 21 (18,8%) bolesnika, dok je 91 (81,2%) bolesnik imao umeren odgovor. Odgovor na terapiju nije imalo 15 (11,8%) obolelih (Grafikon 1).



Grafikon 1. Učestalost bolesnika sa dobrim i umerenim odgovorom i bolesnika bez odgovora na terapiju prema EULAR kriterijumima.

Pre započinjanja terapije metotreksatom bolesnicima je, pomoću DAS28 indeksa procenjena aktivnost bolesti. Prosečna vrednost DAS28 određena pre početka terapije iznosila je $7,4 \pm 0,9$, a nakon 6 meseci terapije primećeno je njeno značajno sniženje ($4,5 \pm 1,5$, $p < 0,001$).

Upotreba kortikosteroida nije uticala na sniženje DAS28 skora tokom 6 meseci terapije ($F(1,125) = 0.861$, $p = 0.355$, partial eta squared = 0.007).

Tabela 5. Demografske i kliničke karakteristike obolelih od reumatoidnog artritisa

Varijable	Svi bolesnici, n=127	Bolesnici sa odgovorom, n=112	Bolesnici bez odgovora, n=15	p-vrednosti
Ženski pol	94 (74%)	84 (75%)	10 (66,7%)	0,535
Starost (godine)	56,7 ± 10,8	56,8 ± 10,6	55,9 ± 12,5	0,745
Seropozitivnost	103 (84,43%)	92 (85,2%)	11 (78,6%)	0,456
Antinuklearna antitela	10 (8,1%)	9 (8,3%)	1 (6,7%)	1,000
Trajanje bolesti (meseći)	22,9±19,2	22,5±19,2	25,4±19,6	0,770
Trajanje terapije metotreksatom (meseći)	13,31±14,3	12,96±15,1	15,87±14,2	0,167
DAS28 pre terapije	7,4±0,9	7,4±0,9	7,6±1,1	0,465
DAS28 nakon 6 meseći terapije	4,5±1,5	4,2±1,3	6,7±1,3	<0,001
VAS – bol pre terapije	78,9±12,3	78,86±12	78,87±15,1	0,852
VAS – bol nakon 6 meseći terapije	36,3±21,6	32,1±18,8	67,7±14,6	<0,001
VAS pre terapije	64,5±17,7	64,13±17,8	67,33±17,1	0,662
VAS nakon 6 meseći terapije	26,1±20	22,33±17	54,67±18,1	<0,001
Folan	90 (70,9%)	81 (72,3%)	9 (60%)	0,368
SE pre terapije	67,5±25,2	67,2±25	69,9±27,4	0,791
SE nakon 6 meseći terapije	30,0±17,8	26,4±12,4	57,2±27,5	<0,001
Upotreba kortikosteroida	66 (52%)	55 (49,1%)	11 (73,3%)	0,078
Doza kortikosteroida (mg)	9,5 ± 1,4	9,5 ± 1,4	9,5 ± 1,5	1,000
Erozije	82 (64,6%)	72 (64,3%)	10 (66,7%)	0,856
MTX doza (mg)	12,1±3,2	12,2±3,2	11,5±3,2	0,452
BBZ pre terapije	19,6±6,5	19,4±6,2	21,5±8,3	0,128
BBZ nakon 6 meseći terapije	7,2±6,4	6,0±5,2	16,3±7,4	<0,001
BOZ pre terapije	12,7±5,7	12,3±5,2	15,1±8,7	0,346
BOZ nakon 6 meseći terapije	3,6±4,5	2,7±3,1	10,6±6,9	<0,001
Trajanje jutarnje ukočenosti pre terapije (min)	127,2±56,2	126,3±55	134±66	0,932
Trajanje jutarnje ukočenosti nakon 6 meseći terapije (min)	34,8±30,9	30,0±24,7	71±46,2	<0,001

Legenda: DAS28, skor aktivnosti bolesti procenjen na 28 zglobova; VAS, vizuelno-analoga skala; SE, sedimentacija eritrocita; MTX, metotreksat; BBZ, broj bolnih zglobova; BOZ, broj otečenih zglobova.

Erozije su evidentirane kod 82 (64,6%) bolesnika, podjednako često i kod obolelih sa odgovorom na MTX i kod obolelih koji nisu imali odgovor na terapiju. Primena kortikosteroida i folana nije uticala na pojavu erozija kod bolesnika sa RA. Bolesnici sa erozijama su imali duže aktivnu bolest u odnosu na bolesnicke bez erozija ($10,4 \pm 3,8$ mesecu naspram $29,7 \pm 20,8$ meseci, $p < 0,001$).

Seropozitivnost je utvrđivana na osnovu prisustva RF i/ili anti-CCP antitela. Ukupno 103 (84,4%) bolesnika su bila seropozitivna. Prisustvo RF antitela bilo je potvrđeno kod 97 (76,4%), dok je prisustvo anti-CCP antitela potvrđeno kod 47 (37%) testiranih bolesnika. ANA su bila prisutna kod 10 (7,9%) testiranih ispitanika. Seropozitivnost nije imala efekat na ishod terapije, pojavu neželjenih efekata i erozija.

Žene su na početku bolesti imale statistički značajno veći broj otečenih zglobova ($13,35 \pm 5,75$) nego muškarci ($10,73 \pm 5,25$, $p = 0,019$). Muškarci i žene se nisu značajno razlikovali prema ostalim vrednostima ispitivanih demografskih, kliničkih, laboratorijskih parametara, učestalosti neželjenih efekata (NE) terapije i erozija (Tabela 6.).

Tabela 6. Demografske i kliničke karakteristike obolelih od reumatoidnog artritisa prikazanih u odnosu na pol

Varijable	Žene	Muškarci	p-vrednosti
Starost (godine)	56,2±11,1	58,2±10	0,564
Seropozitivnost	79 (85,9%)	24 (80%)	0,562
ANA	8 (8,8%)	2 (6,1%)	1,000
Neželjene reakcije	24 (25,5%)	7 (21,2%)	0,619
Kortikosteroidi	48 (51,1%)	18 (54,5%)	0,731
Folan	67 (71,3%)	23 (69,7%)	1,000
DAS28 pre terapije	7,5±0,9	7,2±0,8	0,079
DAS28 nakon 6 meseci terapije	4,6±1,5	4,2±1,5	0,249
VAS – bol pre terapije	79,1±12,6	78,2±11,6	0,716
VAS – bol nakon 6 meseci terapije	36,2±21,3	36,8±22,9	0,886
VAS pre terapije	63,5±17,5	67,3±18,3	0,373
VAS nakon 6 meseci terapije	25,9±19,8	26,8±20,9	0,871
SE pre terapije	69,2±26,1	62,8±22,2	0,212
SE nakon 6 meseci terapije	30,1±18	29,8±17,6	0,867
Erozije	62 (66%)	20 (60,6%)	0,580
MTX doza (mg)	12,1±3,3	12,1±3,1	0,961
BBZ pre terapije	20,0±6,6	18,4±5,9	0,186
BBZ nakon 6 meseci terapije	7,5±6,7	6,2±5,4	0,354
BOZ pre terapije	13,3±5,7	10,73±5,2	0,019
BOZ nakon 6 meseci terapije	3,8±4,9	3,1±3,1	0,856
Trajanje jutarnje ukočenosti pre terapije (min)	128,5±60,9	123,6±40,2	0,927
Trajanje jutarnje ukočenosti nakon 6 meseci terapije (min)	34±32,7	37,1±25,2	0,186

Legenda: DAS28, skor aktivnosti bolesti procenjen na 28 zglobova; VAS, vizuelno-analogni skala; SE, sedimentacija eritrocita; MTX, metotreksat; BBZ, broj bolnih zglobova; BOZ, broj otečenih zglobova.

4.2. Rezultati genetičkih ispitivanja

Genotipizacija je sprovedena kod 127 bolesnika sa RA lečenih monoterapijom metotreksatom. Učestalosti alela i genotipova kao i rezultati analize povezanosti pojedinačnih polimorfizama sa odgovorom na terapiju su prikazani u Tabeli 7. za polimorfizme *ADORA_{2A}*, u Tabeli 8. za polimorfizme *ADORA₃* gena i u Tabeli 9. za *ITPA* rs1127354 polimorfizam.

Tabela 7. Distribucija genotipova i alela analiziranih polimorfizama *ADORA_{2A}* gena u odnosu na efikasnost metotreksata definisanu EULAR kriterijumima

Polimorfizmi	Svi bolesnici, n (%)	Bolesnici sa odgovorom, n (%)	Bolesnici bez odgovora, n (%)	p-vrednosti
<i>ADORA_{2A}</i> rs2298383				
TT	53 (42,1)	48 (43,2)	5 (33,3)	0,249
CT	52 (41,3)	43 (38,7)	9 (60)	
CC	21 (16,7)	20 (18)	1 (6,7)	
T	158 (62,7)	139 (62,6)	19 (63,3)	1,000
C	94 (37,3)	83 (37,4)	11 (36,7)	
<i>ADORA_{2A}</i> rs2236624				
CC	78 (63,4)	70 (64,2)	8 (57,1)	0,871
CT	38 (30,9)	33 (30,3)	5 (35,7)	
TT	7 (5,7)	6 (5,5)	1 (7,1)	
C	194 (78,9)	173 (79,4)	21 (75)	0,624
T	52 (21,1)	45 (20,6)	7 (25)	
<i>ADORA_{2A}</i> rs5751876				
CC	45 (38,1)	42 (40,4)	3 (21,4)	0,139
CT	55 (46,6)	45 (43,3)	10 (71,4)	
TT	18 (15,3)	17 (16,3)	1 (7,1)	
C	145 (61,4)	129 (62)	16 (57,1)	0,681
T	91 (38,6)	79 (38)	12 (42,9)	
<i>ADORA_{2A}</i> rs17004921				
CC	97 (78,9)	85 (77,3)	12 (92,3)	0,428
CT	20 (16,3)	19 (17,3)	1 (7,7)	
TT	6 (4,9)	6 (5,5)	0 (0)	
C	214 (87)	189 (85,9)	25 (96,2)	0,217
T	32 (13)	31 (14,1)	1 (3,8)	

Tabela 8. Distribucija genotipova i alela analiziranih polimorfizama *ADORA₃* gena u odnosu na efikasnost metotreksata definisanu EULAR kriterijumima

Polimorfizmi	Svi bolesnici, n (%)	Bolesnici sa odgovorom, n (%)	Bolesnici bez odgovora, n (%)	p-vrednosti
<i>ADORA₃</i> rs2298191				
TT	68 (54)	61 (55)	7 (46,7)	0,831
CT	43 (34,1)	37 (33,3)	6 (40)	
CC	15 (11,9)	13 (11,7)	2 (13,3)	
T	179 (71)	159 (71,6)	20 (66,7)	0,668
C	73 (29)	63 (28,4)	10 (33,3)	
<i>ADORA₃</i> rs1544223				
AA	61 (50)	52 (48,6)	9 (60)	0,442
AG	52 (42,6)	46 (43)	6 (40)	
GG	9 (7,4)	9 (8,4)	0 (0)	
A	174 (71,3)	150 (70,1)	24 (80)	0,291
G	70 (28,7)	64 (29,9)	6 (20)	
<i>ADORA₃</i> rs3393				
AA	38 (31,4)	33 (30,8)	5 (35,7)	0,871
AG	51 (42,1)	46 (43)	5 (35,7)	
GG	32 (26,4)	28 (26,2)	4 (28,6)	
A	127 (52,5)	114 (52,3)	15 (53,6)	1,000
G	115 (47,5)	104 (47,7)	13 (46,4)	

Tabela 9. Distribucija genotipova i alela rs1127354 polimorfizma *ITPA* gena u odnosu na efikasnost metotreksata definisanu EULAR kriterijumima

Polimorfizmi	Svi bolesnici, n (%)	Bolesnici sa odgovorom, n (%)	Bolesnici bez odgovora, n (%)	p-vrednosti
<i>ITPA</i> rs1127354				
CC	110 (90,9)	96 (89,7)	14 (100)	0,453
CA	10 (8,3)	10 (9,3)	0 (0)	
AA	1 (0,8)	1 (0,9)	0 (0)	
C	230 (95)	202 (94,4)	28 (100)	0,370
A	12 (5)	12 (5,6)	0 (0)	

Bolesnici nosioci minornog C alela (CC+CT) za ADORA₂A rs2298383 imali su značajno veći broj osetljivih zglobova (20,8±6,1) pre početka terapije nego bolesnici sa TT genotipom (18±6,6, p=0,017). Na početku bolesti prisutan je i značajan uticaj ADORA₂A rs5751876 polimorfizma na DAS28, broj osetljivih i otečenih zglobova (p=0,027, p=0,007, p=0,023, redom).

Pre započinjanja terapije bolesnici nosioci minornog T alela za ADORA₂A rs17004921 (n=26) imali su manje vrednosti DAS28 od bolesnika sa CC genotipom (7,2±0,79 naspram 7,5±0,9, p=0,047). Isti bolesnici su na pregledu pre započinjanja terapije imali manji broj bolnih zglobova (17,3±6 naspram 20,4±6,3, p=0,03). Dodatno smo ispitali uticaj ovoga genotipa na sniženje DAS28 tokom 6 meseci terapije. Nosioci bar jednog ADORA₂A rs17004921 T alela su imali značajno veće smanjenje vrednosti DAS28 nakon 6 meseci terapije nego bolesnici sa CC genotipom (F(1.121)=6.333, p=0.013, partial eta squared=0.05).

Nakon 6 meseci terapije nosioci minornog C alela (CC+TC) za ADORA₃ rs2298191 su imali značajno dužu jutarnju ukočenost (39,6±29,3 minuta) i više vrednosti sedimentacije (34,8±18,7) nego bolesnici sa TT genotipom kod kojih je prosečno jutarnja ukočenost trajala 31±32 minuta (p=0,043), dok su vrednosti SE prosečno iznosile 26,2±16,2 (p=0,001). ADORA₃ rs2298191 polimorfizam imao je značajan uticaj na sniženje SE kod obolelih na terapiji MTXom (F(1.124)=7.200, p=0.008, partial eta squared=0.05) i na sniženje DAS28 vrednosti kod žena (F(1.91)=7.121, p=0.009 partial eta squared=0.07) tokom 6 meseci terapije. Bolesnici koji su imali ADORA₃ rs1544223 GG genotip (n=9) su oštećenje svog funkcionalnog stanja na VAS skali pre uključivanja MTX ocenili sa 81,3±18,1, što je značajno viša ocena od one kojom su svoje stanje procenili bolesnici nosioci A alela (63,4±17,1, p=0,011).

Nakon 6 meseci terapije bolesnici nosioci A alela za ADORA₃ rs3393 imali su više vrednosti DAS28 (4,6±1,5) nego oni sa GG genotipom (4,1±1,6, p=0,03). Kod istih bolesnika je primećeno i duže trajanje jutarnje ukočenosti (36,1±26,6 naspram 27,2±31,9, p=0,021), kao i veće vrednosti sedimentacije (31,5±17,1 naspram 25,7±20,4, p=0,011). Nosioci G alela za isti polimorfizam pokazali su značajno niži osećaj bola na VAS skali (33,1±21,6 naspram 42,5±20,6, p=0,03), kao i kraću jutarnju ukočenost (29,6±25,9 naspram 42,8±31,3 minuta, p=0,028) nego bolesnici sa AA genotipom.

ITPA rs1127354 polimorfizam nije uticao na ishod terapije, pojavu NE i erozija na kostima kod obolelih od RA. Nosioci alela A imali su više vrednosti SE pre početka terapije nego bolesnici sa CC genotipom (83,4±31,5 prema 65,34±24,5, p=0,034).

4.3. Neželjeni efekti

Neželjene efekte (NE) terapije ispoljio je 31 (24,4%) bolesnik. Najčešći neželjeni efekti zabeleženi kod naših bolesnika su bili hepatotoksičnost i mučnina (Tabela 10.). Muškarci i žene su podjednako često imali pojavu NE (21,2% prema 25,5%, redom, p=0,619).

Tabela 10. Neželjeni efekti i broj bolesnika koji su ispoljili neželjene efekte nakon 6 meseci terapije metotreksatom

Neželjeni efekti	Broj bolesnika, n (%)
Hepatotoksičnost	14 (11)
Mučnina	9 (7,1)
Opadanje kose	3 (2,4)
Hematološki neželjeni efekti	2 (1,6)
Stomatitis	2 (1,6)
Kašalj	1 (0,8)
Pneumonija	1 (0,8)
Ukupni neželjeni efekti	31 (24,4)

Iako se bolesnici sa odgovorom na terapiju i bolesnici bez odgovora na terapiju ne razlikuju značajno prema učestalosti neželjenih efekata ($p=0,196$), bolesnici koji su ispoljili hepatotoksičnost i ukupne neželjene efekte imali su više DAS28 vrednosti nakon 6 meseci terapije nego bolesnici koji nisu ispoljili ove NE ($5,5\pm 1,4$ vs $4,4\pm 1,5$, $p=0,007$; $5,2\pm 1,5$ vs $4,3\pm 1,4$, $p=0,002$, redom). Pojava neželjenih efekata tokom lečenja je imala slab uticaj na promenu vrednosti DAS28 skora ($F(1,125) = 5.682$, $p = 0.019$, partial eta squared = 0.043), tako da su osobe sa NE imale nešto lošiji odgovor na terapiju.

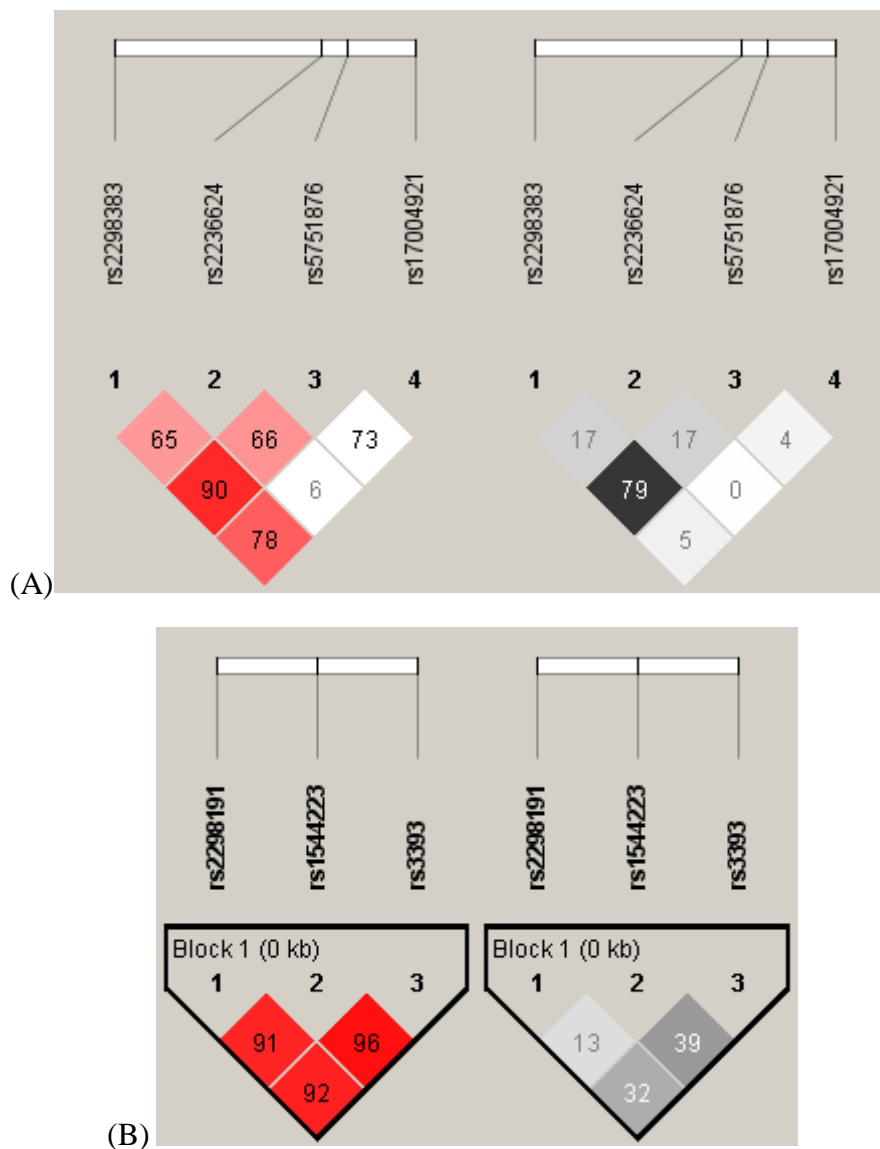
Bolesnici sa *ADORA*₃ rs2298191 CC genotipom nisu ispoljili nijedan neželjeni efekat terapije ($n=15$, $p=0,021$). Ova opservacija nije ostala značajna nakon obavljene multiple logističke regresije koja je uključila dozu MTX i suplementaciju folne kiseline.

4.4. Kombinacije genotipova

Dodatno smo izvršili analizu povezanosti odgovora na terapiju i udruženih genotipova koje smo grupisali po dominantnom ili recesivnom modelu. Svi bolesnici sa *ADORA*_{2A} rs5751876 TT genotipom koji su istovremeno nosioci *ADORA*₃ rs1544223 G alela (GA + GG) su razvili koštane erozije ($n=9$, 7,7%), što je statistički značajno češće kada se uporedi sa bolesnicima koji nisu nosioci ove genske kombinacije ($p = 0,026$, RR: 0.61, 95% CI 0.52-0.71). Nakon izvršene multiple logističke regresione analize sa dužinom trajanja bolesti kao kofaktorom ova povezanost nije potvrđena.

4.5. Analiza haplotipova

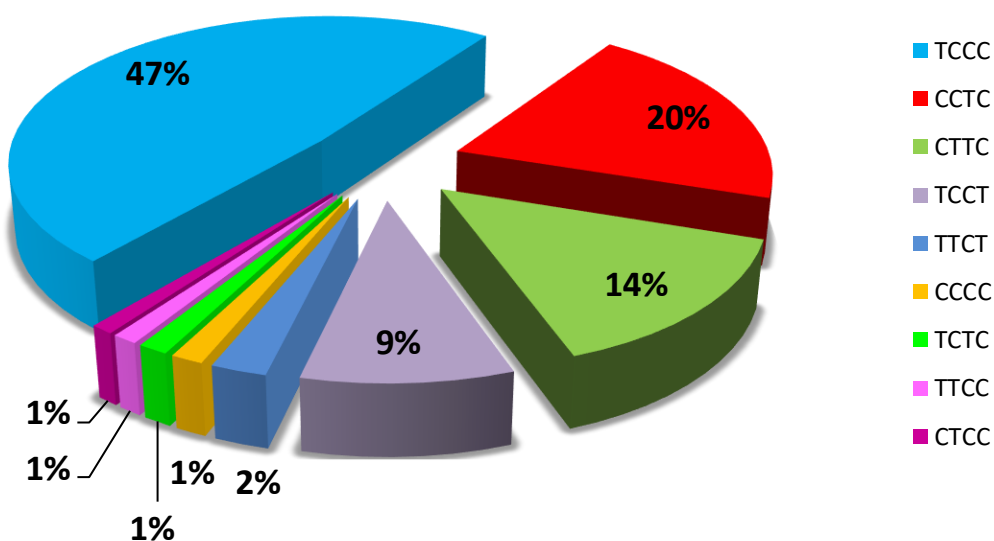
Dodatno smo uradili analizu *ADORA_{2A}* i *ADORA₃* haplotipova. D' (normalizovani LD koeficijent) i r^2 (koeficijent korelacije) vrednosti su predstavljene na Grafikonu 2.



Grafikon 2. Šematski prikaz LD sa predstavljenim D' i r^2 vrednostima (u procentima, redom) među analiziranim polimorfizmima gena za adenozijske receptore kod bolesnika sa RA. A - D' i r^2 vrednosti u genu za *ADORA_{2A}*. B - D' i r^2 vrednosti u genu za *ADORA₃*. Legenda: Boje na grafikonu koje prikazuju D' vrednosti: Intenzivno crvena boja prikazuje polja čije su vrednosti $D'=100\%$ pri vrednostima $LOD>2$, smanjivanje intenziteta boje je u skladu sa smanjivanjima vrednosti D' . Boje na grafikonu koje prikazuju r^2 vrednosti: Crna boja prikazuje polja čije su vrednosti $r^2=100\%$, smanjivanje intenziteta boje je u skladu sa smanjivanjima vrednosti r^2 .

4.5.1. *ADORA*_{2A}

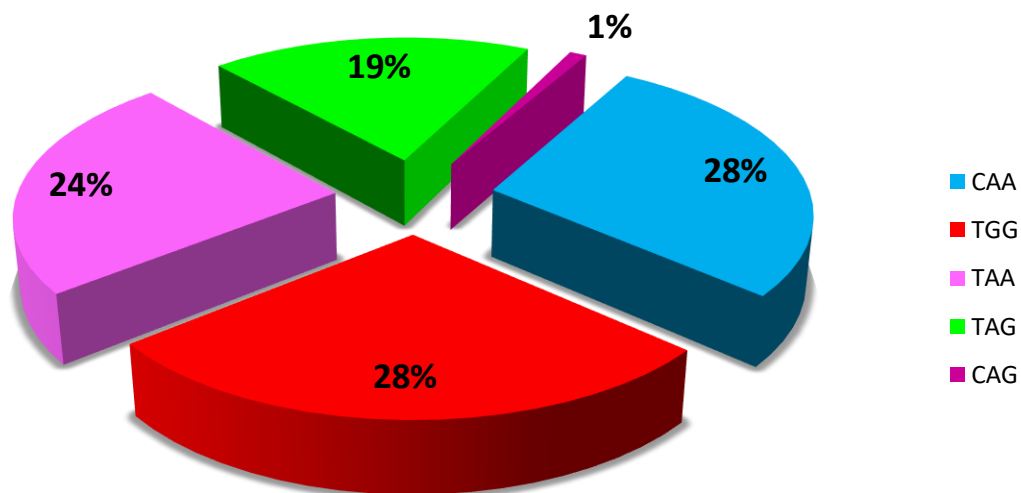
Učestalosti haplotipova *ADORA*_{2A} gena (rs2298383, rs2236624, rs5751876, rs17004921) kod obolelih od RA prikazane su na Grafikonu 3. Najjači LD bio je prisutan između rs2298383 i rs5751876 polimorfizama *ADORA*_{2A} gena ($D'=0,9$, $r^2=0,79$). Haplotip CC (rs5751876/rs17004921) je bio češći kod bolesnika sa neželjenim efektima leka nego kod obolelih bez ovih manifestacija (62,3% vs 46,3%, $p=0,037$). Bolesnici kod kojih je bila prisutna hepatotoksičnost kao posledica primene MTX značajno su češće imali CCC haplotip (rs2298383/rs5751876/rs17004921) nego bolesnici koji nisu ispoljavali ovaj neželjeni efekat (11,4% vs 1,4%, $p=0,0027$)



Grafikon 3. Učestalosti haplotipova *ADORA*_{2A} gena (rs2298383, rs2236624, rs5751876, rs17004921) kod obolelih od reumatoidnog artritisa lečenih metotreksatom.

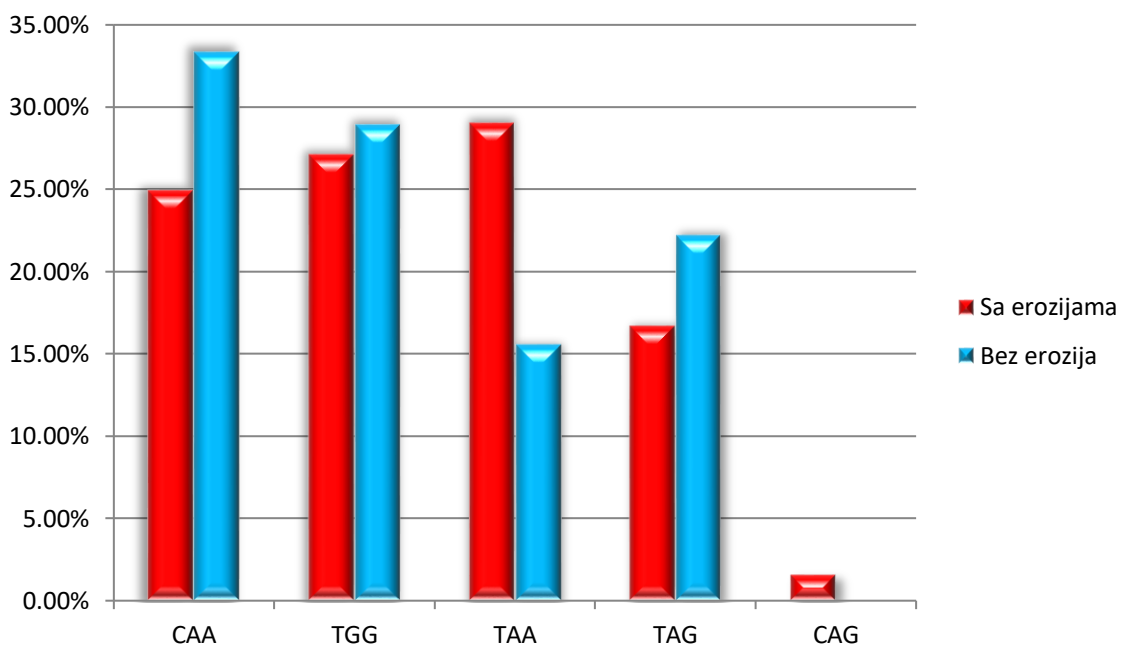
4.5.2. *ADORA*₃

Učestalosti haplotipova *ADORA*₃ gena (rs2298191, rs1544223, rs3393) kod obolelih od RA prikazane su na Grafikonu 4. Utvrdili smo postojanje haplotipskog bloka među ispitivanim polimorfizmima *ADORA*₃ gena korišćenjem „Confidence intervals LD” metode.

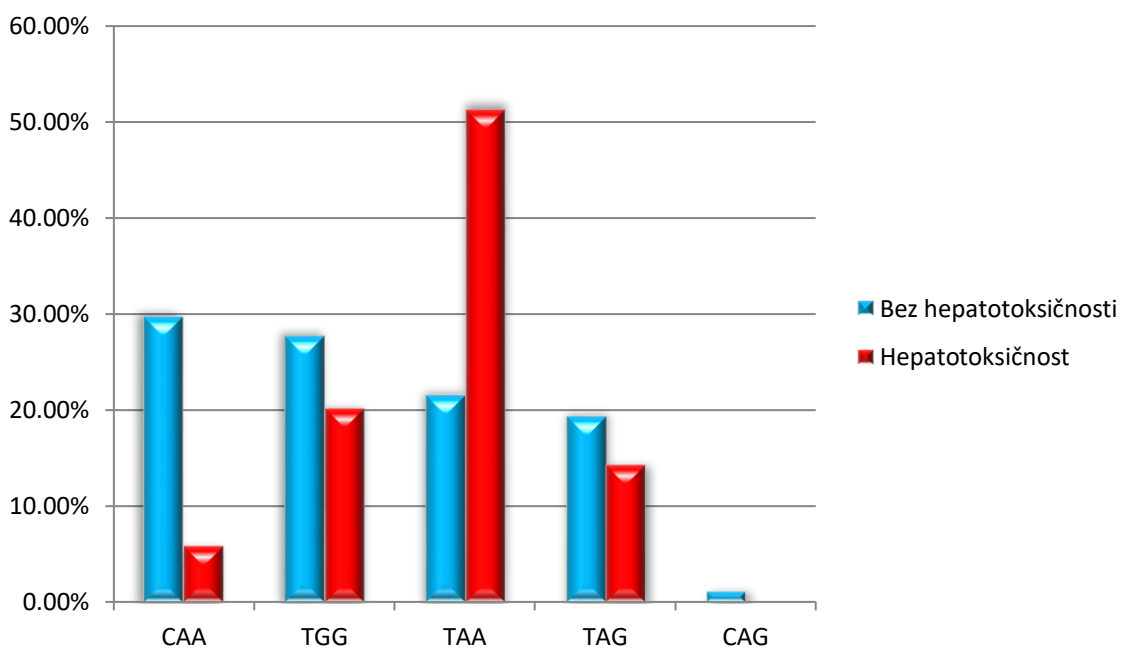


Grafikon 4. Učestalosti haplotipova *ADORA*₃ gena (rs2298191, rs1544223, rs3393) kod obolelih od reumatoidnog artritisa lečenih metotreksatom.

TAA haplotip bio je češći kod bolesnika sa erozijama kostiju (29% prema 15,6% $p = 0,023$), kao i kod obolelih sa hepatotoksičnošću (51,3% prema 21,6% $p = 0,013$) nego kod osoba bez ovih manifestacija (Grafikon 5. i Grafikon 6.). Oba naša bolesnika kod kojih je MTX ispoljio toksično dejstvo na koštanu srž imala su haplotip CGG (CGG, $p=0,02$).



Grafikon 5. Učestalosti haplotipova *ADORA₃* gena kod obolelih od reumatoidnog artritisa u zavisnosti od prisustva koštanih erozija.



Grafikon 6. Učestalosti haplotipova *ADORA₃* gena kod obolelih od reumatoidnog artritisa sa i bez ispoljene hepatotoksičnosti.

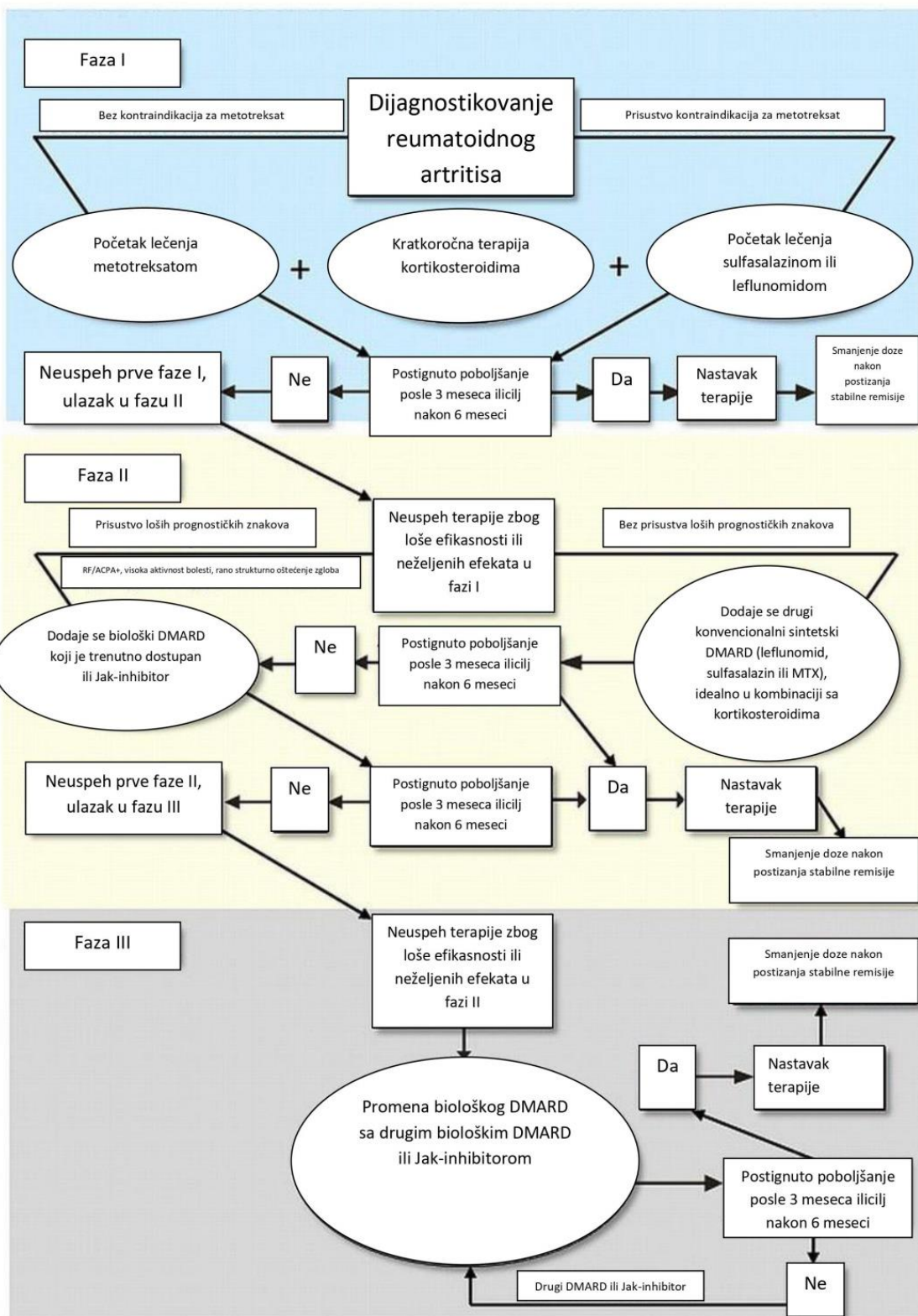
5. DISKUSIJA

Bez pravovremene i adekvatne terapije, progresivno oštećenje sinovijskih zglobova kod bolesnika sa reumatoidnim artritismom vodi ka invalidnosti i preranoj smrti (1,149). Jedan od prvih zadataka u lečenju RA je rana kontrola bolesti, zbog čega je razvijena strategija treat-to-target (ciljano lečenje, T2T) (75). T2T preporuke kao cilj predlažu postizanje remisije ili niske aktivnosti bolesti u prvih šest meseci terapije, ali predviđaju i vršenje neophodnih izmena terapije ako se ovaj cilj ne postigne (75,149).

Dugoročne studije koje su pratile progresiju bolesti kod bolesnika sa RA dovele su do zaključka da pravovremena terapija ima veći uticaj na prognozu bolesti od samog izbora terapije (150). Ovaj terapijski prozor otvoren je relativno kratko i traje šest meseci od pojave prvih simptoma (150,151). Ukoliko se adekvatna terapija započne u ovom periodu bolest će biti sporije progresivna i funkcionalna sposobnost će biti očuvana i nakon 10 godina trajanja bolesti. Bolesnici kod kojih se u periodu terapijskog prozora ne započne sa primenom adekvatne terapije imaju veću verovatnoću za lošiju dugoročnu kontrolu bolesti. Isti problem je primećen i ukoliko je lek prvog izbora neefikasan ili bolesnici razviju neželjene efekte na terapiju prvog izbora (150).

U EULAR preporukama iz 2016. godine navodi se da se metotreksat treba primenjivati kao lek prvog izbora za lečenje RA i ranih artritisa. Iako nam je danas dostupan veliki broj sintetskih i bioloških bolest modifikujućih lekova, MTX je i dalje zlatni standard u terapiji RA (52,75). Ovaj lek je prvi izbor u terapiji zbog dobrog bezbednosnog profila, mogućnosti prilagođavanja doze, ali i niske cene (75). Ovakva preporuka dodatno se temelji na mnogobrojnim studijama koje su pokazale da monoterapija MTXom nije inferiorna u odnosu na monoterapiju biološkim DMARD u ranom tretmanu artritisa (152–154).

Iako se MTX koristi u terapiji RA preko 30 godina, još uvek ne možemo predvideti efikasnost terapije ovim lekom. Trenutno lečenje se sprovodi po principu pokušaja i greške, što vodi ka tome da se kod bolesnika koji ne odgovore na terapiju primeni nekoliko različitih bolest modifikujućih lekova dok se ne postigne zadovoljavajući odgovor na terapiju (Slika 6.). Kao posledica ovakvog pristupa kod ovih bolesnika se propušta period terapijskog prozora, a oni se izlažu većem riziku od neželjenih efekata, bržoj progresiji bolesti, duže trpe bolove i imaju lošiji kvalitet života (155). Čak do 30% bolesnika nema zadovoljavajući odgovor na monoterapiju metotreksatom. Kod oko 20% obolelih terapija se prekida upravo zbog pojave neželjenih efekata (156).



Slika 6. Šematski prikaz terapijskog protokola za lečenje RA predloženog od strane EULAR-a 2016. godine (75). Legenda: RF, reumatoidni faktor; ACPA, antitela na citrulisane peptide; DMARD, bolest modifikujući lekovi (Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs); MTX, metotreksat; Jak, janus kinaza.

Predviđanje odgovora na terapiju bi značajno unapredilo lečenje i omogućilo dugoročno očuvanje kvaliteta života obolelih od RA (75,157). Jedna od osnovnih prepreka za primenu individualnog lečenja svakog bolesnika ponaosob zasnovanog na ovakvom predviđanju odgovora na terapiju, takozvane personalizovane medicine, u terapiji RA je nedostatak pouzdanih biomarkera (156,158).

Mnogobrojne farmakogenetičke studije navode da polimorfizmi u genima koji kodiraju nosače, enzime i receptore u folatnom i adenozijskom putu kao i u *de novo* sintezi purina mogu uticati na ishod terapije (117,151,159,160). Genske varijante bi bile izuzetno korisni biomarkeri. Stabilne su i nepromenljive, prisutne kod svakog bolesnika i pre započinjanja terapije. Dodatno, testiranja je moguće sprovesti brzo i jeftino (151,155). Pri tome, korišćenje genskih biomarkera nije neobično u savremenoj kliničkoj praksi i već se primenjuje, na primer, za otkrivanje rizičnih varijanti u TPMT genu pre započinjanja terapije autoimunskih inflamatornih bolesti azatioprinom ili citohroma P-450 pre započinjanja antiagregacione terapije klopido-grelom (141,151,156).

Međutim, ovakva testiranja se za sada ne primenjuju za prognozu ishoda terapije MTXom. Jedan od razloga su oprečni rezultati dosadašnjih istraživanja. Čak i kad pojedini polimorfizmi pokažu značajan potencijal potrebna je potvrda rezultata u velikim, slojevitim studijama (141,156,158).

Ne smemo zanemariti ni istraživanja koja pokazuju da je odgovor na terapiju kod bolesnika sa RA, takođe, povezan i sa negenetičkim faktorima kao što su pušenje, ćelijski, serološki i klinički parametri. Za sada se ni jedna od navedenih varijabli nije pokazala u praksi kao validan biomarker (151,155).

Bez obzira, razvijeni su brojni prediktivni modeli sa ciljem da se predvidi odgovor na terapiju MTXom sa različitim pristupima. Neki modeli su uključivali samo kliničke i demografske podatke, dok su se drugi bazirali na dosadašnjim farmakogenetičkim saznanjima. Problem sa najvećim brojem ovih modela je bila činjenica da su se koncentrisali na samo jednu grupu potencijalnih biomarkera. Iako MTX utiče na funkcionisanje nekoliko različitih metaboličkih puteva, predikcioni modeli koji su u obzir uzimali isključivo genske varijante, obuhvatali su najčešće polimorfizme u genima koji kodiraju enzime samo jednog metaboličkog puta. Istraživači su najviše pažnje posvećivali folatnom putu (157,161–164). Retko su uzimane u obzir kombinacije velikog broja polimorfizama iz više različitih puteva (157,158). Bilo je pokušaja stvaranja modela koji obuhvataju i kliničke i genske biomarkere, ali su najčešće bili primenjivi samo na populaciji iz koje potiču oboleli, dok su doživljavali neuspeh u drugim populacijama (161–164).

Postoji veliki broj mogućih razloga za dosadašnji neuspeh. Prvenstveno, sama bolest pokazuje veliku patogenetsku i kliničku heterogenost (1,26,60). Uticaj pola ne bi trebalo zanemariti, iako ispitivanja efekta pola na aktivnost bolesti i uspeh terapije i dalje daje kontradiktorne podatke (16,165). Komplikacija obolelih bi morala biti uračunata kao i primena suportivne terapije i suplementacije folnom kiselinom (115,116,150). Takođe, na ekspresiju samih gena ne utiču samo genetički nego i epigenetički faktori, kao metilacija i mikro RNK (157). Trajanje samih studija je veoma različito i mnoge studije su trajale kraće od 6 meseci (158). Bolesnici analizirani u studijama su često veoma heterogeni. Trajanje bolesti, etnička pripadnost, istovremena ili predhodna terapija drugim DMARD, pušački staž, se često ne uzimaju u obzir (157,158). Međutim jedan od ključnih problema je mali broj studija koji se bavi ovim problemom kao i mali broj uključenih ispitanika (124,157).

Naša pažnja je bila usmerena na vezu između polimorfizama u genima koji kodiraju proteine adenozijskog puta, mehanizma kojim MTX ostvaruje jedan deo svog dejstva kod obolelih od RA i odgovora na terapiju ovim lekom (166,167). Adenozin ima značajnu ulogu u kontroli zapaljenja kao deo antizapaljenskog sistema. Dosadašnja istraživanja pokazuju da MTX svoje antizapaljensko dejstvo bar delimično ostvaruje stimulacijom sinteze adenozina u ćelijama (89,92). Studije na „knock-out” životinjama pružile su dokaze o značaju adenozijskih receptora za delovanje metotreksata. Kod životinja koje ne ekspimiraju ADORA_{2A} i ADORA₃ receptore, MTX ne

ispoljava svoje antizapaljensko dejstvo kao kod „wild-type” jedinki (127). ADORA_{2A} i ADORA₃ su prisutni na leukocitima, ali i na sinoviocitima. Već u ranim fazama bolesti povećava se ekspresija oba tipa receptora na limfocitima obolelih, dok je na sinoviocitima dominantna povećana ekspresija jedino ADORA₃ (82,94). Prema istraživanju koje su sproveli Varani i saradnici, ekspresija ADORA_{2A} i ADORA₃ je obrnuto srazmerna aktivnosti bolesti, bilo da je merena DAS ili DAS28 indeksom. Njihova aktivacija dovodi do smanjene produkcije citokina, ali i do smanjenja produkcije MMP1 i MMP3, koje imaju značajnu ulogu u oštećenju zglobne hrskavice kod bolesnika sa RA (69,94).

Kako dosadašnja istraživanja pokazuju da adenzinski put igra važnu ulogu u kontroli zapaljenja, dok je istovremeno za dejstvo metotreksata neophodno prisustvo adenzinskih receptora, nekoliko farmakogenetičkih studija je ispitivalo uticaj polimorfizama gena za adenzinske receptore na ishod terapije kod osoba obolelih od RA (127,166,167). Polimorfizmi u genima koji kodiraju enzime adenzinskog puta ili su uključeni u *de novo* sintezu purina mogu uticati na sintezu adenzina i samim tim uticati na ishod terapije MTXom kod obolelih od RA (117,159,168). Neke od ovih varijanti uključene su u modele za predikciju ishoda terapije. Iako ovi modeli još uvek nemaju adekvatnu potvrdu, a samim tim ni primenu u svakodnevnoj kliničkoj praksi, oni predstavljaju značajan pomak u razvoju personalizovane medicine (161,163,164,169).

Do sada je najviše ispitivan uticaj ADORA_{2A} rs2298383 polimorfizma na efikasnost terapije metotrexatom kod obolelih od RA. Ovo je funkcionalni polimorfizam, lociran u promotorskom regionu ushodno od gena. Sekvenca u kojoj je lociran ovaj polimorfizam je bogat purinima, što je često slučaj sa humanim promotorima. Analize sprovedene *In silico* pokazuju da je rs2298383 smešten unutar tripleks formirajuće oligonukleotidne (TFO) target sekvence (170). Ovakve sekvence su koncentrisane u regulatornim regionima humanog genoma, posebno u oblastima promotora (171). Predpostavlja se da je moguće da je TFO sekvenca (CCCCGGGG) narušena kod nosilaca T alela (CCCTGGGG). Ovakav izmena u promotorskoj sekvenci potencijalno bi, prema kompjuterskim simulacijama, mogla da objasni uticaj polimorfizma na transkripciju samoga gena (170).

Potrebno je naglasiti mogućnost različitog uticaja ovog polimorfizma na funkciju receptora u različitim tkivima. Naime, na osnovu najnovijih istraživanja moguće je da postoji više izoformi ovog receptora, kao i veći broj promotora i startnih mesta transkripcije. Samim tim značaj polimorfizama mogao bi varirati u različitim tkivima koji eksprimiraju drugačije, tkivno specifične, izoforme receptora (130).

Funkcionalnu prirodu rs2298383 potvrđuje i činjenica da je ekspresija ovog receptora smanjena kod osoba koje su nosioci TT genotipa (172,173). Cannata i saradnici navode da oboleli od višestruke hemijske senzitivnosti koji nose rs2298383 TT genotip pokazuju smanjenu ekspresiju ADORA_{2A} i povećanu ekspresiju IFN γ . Kako ovaj citokin ima ključnu ulogu u aktivaciji makrofaga, može se zaključiti da ADORA_{2A} i njegovi polimorfizmi igraju važnu ulogu u regulaciji ekspresije citokina i samim tim regulaciji imunskog odgovora (172).

Iako su Berlacher i saradnici u farmakogenetičkoj studiji, na 357 ispitanika koji su bili podvrgnuti testu opterećenja pokazali da rs2298383 ne utiče na ishod primene regadenosona, agonistom adenzinskih receptora, istovremeno su primetili da su nosioci C alela (CC+CT) značajno češći u grupi ispitanika sa kongestivnom srčanom insuficijencijom (174). Uticaj polimorfizama u adenzinskim receptorima značajno je češće ispitivan u neurogenetici (143,144,175,176). Tako su Childs i saradnici pokazali da među 102 zdrava ispitanika nosioci rs2298383 CC genotipa češće ispoljavaju anksioznost nakon unošenja kafe (144). Oliveira i saradnici su zaključili na uzorku od 1253 slučajna ispitanika da TT genotip smanjuje rizik od nastanka depresije (177). Studija koju su kod 127 osoba obolelih od šizofrenije sproveli Turčin i saradnici pokazuje da rs2298383 polimorfizam utiče na psihopatologiju bolesti (178).

Povezanost $ADORA_2A$ rs2298383 polimorfizma i neželjenih efekta MTXa ispitivali su i Tsujimoto i saradnici u studiji koja je uključila 56 dece sa akutnom limfoblastnom leukemijom. Oni su primetili da deca lečena MTXom imaju značajno veći rizik od razvoja leukoencefalopatije kao neželjenog efekta terapije ukoliko su nosioci rs2298383 CC genotipa. Kako su doze MTXa koje se koriste u terapiji RA značajno niže, a pojava leukoencefalopatije zavisna od visoke kumulativne doze, ove rezultate je potrebno oprezno tumačiti u poređenju sa terapijom RA (173).

Hider i saradnici su u svojoj studiji, sprovedenoj na 309 bolesnika sa RA lečenih MTXom, uočili da je T alel povezan sa neželjenim reakcijama na lek. Ova razlika je registrovana između grupe bolesnika koji su ispoljili neželjene efekte i grupe bolesnika sa dobrim odgovorom na terapiju. U ovoj studiji odgovor na terapiju MTXom procenjivan je promenom vrednosti SE, pri čemu nije uočen uticaj rs2298383 polimorfizma na efikasnost terapije merene na ovaj način (167). U studiji koju su sprovedeli Soukup i saradnici na 185 bolesnika sa RA lečenih MTXom uočena je češća pojava reumatoidnih nodula kod nosioca C alela rs2298383 polimorfizma. Treba naglasiti da je pojava reumatoidnih nodula češće kod bolesnika sa izrazito ozbiljnom formom bolesti što može uticati na interpretaciju rezultata (49).

Lima i saradnici nisu uočili povezanost ovog polimorfizma sa efikasnošću terapije MTXom i neželjenim efektima leka u svojoj studiji koja je uključila 233 bolesnika sa RA. Istovremeno se u ovoj studiji navodi da postoji povezanost haplotipa TC (rs2267076/rs2298383) sa neželjenim efektima MTX (117). U ovom haplotipu C alel je sastavni deo haplotipa koji se češće pojavljuje kod osoba koje su ispoljile neželjene efekte terapije. Ovo može govoriti u prilog suptilnog uticaja ovog polimorfizma na ekspresiju gena, koji se individualno i na malom broju ispitanika ne može uočiti.

Kobold i saradnici su povezali prisustvo C alela ovog polimorfizma sa nižim rizikom za pojavu NE terapije kod 212 ispitanika obolelih od RA. U ovoj studiji više od polovine bolesnika je koristilo bar još jedan DMARD, što treba uzeti u obzir kada se razmatra uzrok pojave NE. U ovoj studiji rs2298383 nije bio povezan sa efikasnošću terapije (179).

U našoj studiji, sam polimorfizam nije uticao na ishod terapije meren prema EULAR-ovim kriterijumima, kao ni na smanjenje DAS28 skora nakon 6 meseci lečenja, iako su naši bolesnici nosioci C alela (CC+CT) za $ADORA_2A$ rs2298383 imali značajno veći broj osetljivih zglobova na početku bolesti nego oboleli sa TT genotipom. Nedostak udruženosti ovog polimorfizma i efikasnosti terapije MTXom je u skladu sa do sada sprovedenim studijama kod obolelih od RA lečenih MTXom (117,167,179). U našem istraživanju ovaj polimorfizam nije doveden u vezu sa pojavom NE, što je u skladu sa rezultatima istraživanja koje su sprovedeli Lima i saradnici, ali se razlikuje od rezultata Hider i saradnika, kao i Kobold i saradnika koji su povezali ovaj polimorfizam sa pojavom NE kod svojih bolesnika (117,167,179).

Polimorfizam rs2236624 je lociranu u intronu $ADORA_2A$ gena i potencijalno je funkcionalna varijanta (144,180). Njegov značaj je ispitivan u nekoliko studija koje su rađene radi istraživanja pojave anksioznosti kod zdravih, ali i kod osoba sa autizmom (144,181). Rezultati govore da je CC genotip $ADORA_2A$ rs2236624 polimorfizma faktor rizika za nastanak autizma. Sa druge strane, ovaj polimorfizam ne utiče na klinička ispoljavanja ove bolesti (181). Childs i saradnici ispitivali su uticaj rs2236624 polimorfizma na razvoj anksioznost koju uzrokuje kafa kod 102 zdrava ispitanika, ali su zaključili da anksioznost nije bila pod uticajem ovog polimorfizma (144).

U pojedinim delovima mozga je primećena bliska interakcija između $ADORA_2A$ i $ADORA_1$ receptora, čak i stvaranje heterodimera. Na osnovu dostupnih podataka rs2236624 $ADORA_2A$ polimorfizam bi mogao uticati na afinitet i povezivanje $ADORA_1$ i $ADORA_2A$ receptora. Ovakav rezultat govori sa jedne strane u prilog funkcionalnosti ovog polimorfizma a sa druge o bliskoj saradnji dva tipa adenzinskih receptora u mozgu (182).

Kod osoba sa dijabetesom tip 1, rs2236624 TT genotip je imao protektivno dejstvo na razvoj retinopatije, moguće zbog uloge adenoza u regulaciji funkcije krvnih sudova u fiziološkim uslovima, ali i u ishemiji (102,180). Tokom ispitivanja uloga rs2236624 u kardiovaskularnom sistemu, nije pronađena povezanost ovoga polimorfizma sa razvojem srčane isuficijencije (183).

Varijanta rs2236624 *ADORA_{2A}* gena i njen uticaj na ishod terapije reumatoidnog artritisa metotreksatom je ispitivana u nekoliko studija. Hider i saradnici su u istraživanju koje je uključilo 309 bolesnika sa RA na MTX terapiji uočili značajno češće prisustvo CC genotipa kod obolelih koji imaju odgovor na terapiju nego kod osoba sa neželjenim efektima terapije (167). Sa druge strane Soukup i saradnici nisu primetili značajnu razliku u učestalosti pojave reumatoidnih nodula kod nosilaca različitih alela/genotipova ovoga polimorfizma tokom terapije metotreksatom u studiji koja je uključila 185 obolelih (49). U našoj studiji rs2236624 nije imao uticaj na ishod terapije, pojavu neželjenih efekata ili erozija. Takođe ovaj polimorfizam nije bio uključen ni u jedan haplotip ili kombinaciju genotipova koja je pokazala značajan efekat na ispitivane parametre.

Poznato je da intronski polimorfizmi kao što je *ADORA_{2A}* rs2236624 mogu imati uticaj na ekspresiju gena ili na splajsing. Iako alternativni splajsing može dovesti do stvaranja izmenjenog proteinskog produkta, naše istraživanje nije ukazalo na uticaj rs2236624 polimorfizma na ishod MTX terapije. Dosadašnja istraživanja su pokazala marginalni uticaj ovoga polimorfizma na funkciju samoga receptora. Međutim, moguće je da ovaj polimorfizam, u kombinaciji sa nekom drugom varijantom, sa kojom, na primer, može biti i u značajnom LD-u, dostiže funkcionalni efekat. U blizini rs2236624 polimorfizma je prisutno bar 15 drugih polimorfizama. Od toga 5 su egzonski, 4 polimorfizma su tiha dok je jedan nesinoniman, 5 su intronski, 6 se nalazi u 3'UTR regionu i prisutan je jedan polimorfizam koji dovodi do pomeranja okvira čitanja (183).

Polimorfizam rs5751876 je lociran u drugom egzonu *ADORA_{2A}* gena (146). Zamena C1976T se dešava u kodu za amino kiselinu tirozin i ostaje tiha (144,146). Iako ne dovodi do strukturne promene proteinskog produkta gena, moguće je da ima uticaj na nivo translacije iRNK. Ovaj polimorfizam bi mogao da ima značajan uticaj u neurogenetičkim poremećajima (144,170,176). Do sada je najveći uticaj ovog polimorfizma uočen na ispoljavanje anksioznosti. Childs i saradnici su, na primer, pokazali da nosioci *ADORA_{2A}* rs5751876 TT genotipa ispoljavaju veću anksioznost nakon konzumacije kafe (144). Ovu povezanost su potvrdili Rogers i saradnici dve godine kasnije na većem uzorku od 416 zdravih osoba (176). Genotip TT se pokazao i kao faktor rizika za nastanak paničnog poremećaja i agorafobije (170). Polimorfizmi ovoga gena privukli su pažnju i istraživača u oblasti autizma zbog lokacije samog gena. Naime, Freitag i saradnici su ispitivali uticaj *ADORA_{2A}* polimorfizama na simptome autizma kod 98 obolelih jer je *ADORA_{2A}* gen smešten na poziciji 22q11.23, na granici delecije koja se viđa kod oko 1% osoba sa autizmom (22q11.2). Pokazali su da oboleli nosioci rs5751876 T alela pokazuju značajno veću anksioznost od bolesnika sa CC genotipom (181).

Sa druge strane, Kobold i saradnici nisu uočili povezanost *ADORA_{2A}* rs5751876 sa odgovorom na terapiju MTXom kod 212 obolelih od RA, ali su uočili da nosioci CC genotipa češće razvijaju neželjene efekte. Potrebno je napomenuti da je u ovoj studiji pojava neželjenih efekata detektovana značajno češće (69,8%) nego u drugim studijama. Moguće je da je ovako visoka učestalost pojave neželjenih efekata terapije posledica činjenice da je manje od polovine bolesnika lečeno MTXom u monoterapiji, dok su ostali bili na kombinovanoj terapiji (179).

U našoj studiji bolesnici sa odgovorom na terapiju i bolesnici bez odgovora na terapiju se nisu značajno razlikovali u učestalostima *ADORA_{2A}* rs5751876 genotipova i alela. Međutim, svi naši ispitanici sa TT genotipom za *ADORA_{2A}* rs5751876 polimorfizam koji su istovremeno nosioci G alela za *ADORA₃* 1544223 su razvili koštane erozije, što predstavlja nepovoljan ishod terapije. Sharma i saradnici su u svom istraživanju pokazali da je *ADORA_{2A}* rs5751876 T alel vezan za lošiji ishod terapije MTX kod bolesnika sa RA, što je u skladu sa našim rezultatima. Međutim, u ovoj

studiji je C alel se ređe pojavljivao i imao je učestalost 34,24% u populaciji obolelih osoba (166). U našoj studiji je MAF(T)=38,56%. Razlika u učestalosti alela u srpskoj i indijskoj populaciji obolelih od RA je statistički značajna ($p < 0,001$). Prema NCBI bazi genskih varijacija, populacija srpskih bolesnika se prema učestalosti alela ne razlikuje od evropske (0,936), dok učestalosti alela kod indijskih bolesnika odgovaraju onima zabeleženim u populaciji Južne Azije (0,757) (145,166). Ovakva diskrepanca može da se objasni različitim genetičkim poreklom ove dve populacije. Što zbog velike razlike u učestalosti alela u dve populacije, što zbog razlike u terapijskim protokolima, veoma je teško izvući konačan zaključak o uticju *ADORA_{2A}* rs5751876 genotipova i alela, ali postoje indicije da bi ovaj polimorfizam mogao uticati na ishod terapije MTXom kod bolesnika sa reumatoidnim artritisom.

Od svih polimorfizama adenozienskog *A_{2A}* receptora analiziranih u našoj studiji, rs17004921 je najređe ispitivan (163,178). Turčin i saradnici (2016. godina) su ispitivali uticaj ovog polimorfizma na manifestacije šizofrenije kod 127 obolelih. Prema njihovom istraživanju rs17004921 nije značajno uticao na klinička ispoljavanja kod obolelih osoba, kao ni na pojavu neželjenih efekata neuroleptičke terapije (178). Iste godine Jenko i saradnici su uključili polimorfizme gena koji kodiraju enzime i receptore u adenozienskom putu u razvoj prediktivnog modela sa ciljem da omogućе predviđanje prekida terapije usled pojave neželjenih efekata metotreksata kod osoba obolelih od RA. Za rs17004921 polimorfizam nije uočen značajan uticaj na odgovor na terapiju i pojavu NE i krajnji model nije uključio ovaj polimorfizam (163). Kod 212 obolelih od RA u studiji koju su sprovedi Kobold i saradnici rs17004921 nije uticao na ishod terapije meren prema EULAR kriterijumima, kao ni na pojavu NE (179).

Ono što je poznato, prema NCBI bazi podataka i projektu 1000 genoma, *ADORA_{2A}* rs17004921 se opisuje kao intronska varijanta čiji MAF(T) na globalnom nivou iznosi 11,82%, dok u evropskoj populaciji ta učestalost iznosi 8,35%. Smešten je na 3' strani drugog kodirajućeg egzona ovog gena (chr22:24444708) (145). Iako na osnovu rezultata naše studije sam polimorfizam nije značajno uticao na ishod terapije meren prema EULAR kriterijumima, kao ni na pojavu NE, nosioci T alela za *ADORA_{2A}* rs17004921 su imali značajno veće smanjenje aktivnosti bolesti merene DAS28 skorom nego oboleli sa CC genotipom. Ovakav rezultat može govoriti o suptilnom uticaju ovoga polimorfizma na ishod terapije, što bi dalje trebalo ispitati u studijama koje bi analizirale već broj bolesnika i kombinacije genotipova većeg broja genetičkih varijanti uključenih u regulaciju dejstva MTXa.

Polimorfizam rs2298191 *ADORA₃* gena lociran je sa 5' strane prvog kodirajućeg egzona gena. Nalazi se u promotorskom regionu i potencijalno može uticati na ekspresiju receptora. Kim i saradnici su pokazali da ovaj polimorfizam ne utiče na pojavu astme u studiji kojoj je učestvovalo 317 obolelih i 183 zdrave kontrole (146). Pokazalo se da ista varijanta ne utiče značajno ni na klinička ispoljavanja šizofrenije kod slovenačkih bolesnika (178). Jenko i saradnici su prilikom kreiranja prediktivnog modela za prekidanje terapije MTXom kod bolesnika sa RA uočili povezanost *ADORA₃* rs2298191 sa vremenom prekida terapije zbog neželjenih efekata (163). U našoj studiji osobe sa rs2298191 CC genotipom nisu imale ni jedan neželjeni efekat. U svojoj studiji Kobold i saradnici nisu uočili povezanost između *ADORA₃* rs2298191 polimorfizma i neželjenih efekata MTXa kod 212 osoba obolelih od RA (179). U našoj studiji rs2298191 nije imao uticaj na ishod terapije merene prema EULAR kriterijumima što je u skladu sa predhodno navedenim studijama koje su sprovedi Jenko i saradnici i Kobold i saradnici (163,179). S obzirom na mali broj studija koje su rađene i mali broj uključenih bolesnika, još uvek nije moguće doneti zaključke o uticaju ovog polimorfizma na funkciju gena.

Polimorfizam *ADORA₃* rs1544223 je retko analiziran u dosadašnjim studijama, a lociran je na 5' strani prvog kodirajućeg egzona (145,146,184). U studiji koju su na kineskoj populaciji sprovedi He i saradnici nosioci alela A *ADORA₃* rs1544223 polimorfizma imali su veći rizik za razvoj hronične srčane isuficijencije. Dodatno su pokazali da nosioci GG genotipa imaju značajno veću ekspresiju

iRNK nego nosioci AA i AG genotipa. Oni su funkcionalnost ovog polimorfizma objasnili pozicijom u 5'UTR regionu čija promena može uticati na stabilnost iRNK a samim tim i na ekspresiju ovoga gena (184). Kobold i saradnici nisu pronašli povezanost između *ADORA₃* rs1544223 i efikasnosti i toksičnosti terapije MTX kod obolelih od reumatoidnog artritisa, što je u skladu sa našim rezultatima (179).

Stamp i saradnici, u svojoj studiji koja je obuhvatila 225 osoba obolelih od RA, navode da je *ADORA₃* rs1544223 polimorfizam skoro u kompletnom LD sa rs1544224. Upravo je *ADORA₃* rs1544224 polimorfizam analiziran u nekoliko studija (82,146,185). Polimorfizam rs1544224 je lociran u promotoru *ADORA₃* gena. Kim i saradnici su, u studiji koja je uključila 385 osoba sa urtikarijom izazvanom aspirinom i 213 zdravih osoba, pokazali da haplotip koji uključuje i ovaj polimorfizam ima uticaja na ekspresiju gena, verovatno tako što menja mesto vezivanja transkripcionog faktora NFkappa β (185). U studiji koju su sprovedli Kim i saradnici kod 317 bolesnika sa astmom i 183 zdrave osobe u kontrolnoj grupi, rs1544224 polimorfizam nije pokazao povezanost sa nastankom bolesti ili fenotipom obolelih (146). U studiji u koju su Stamp i saradnici uključili 225 osoba obolelih od RA *ADORA₃* rs1544224 polimorfizam nije uticao na aktivnost RA, ali je pokazao slabu povezanost sa gubitkom kose i zaboravnošću (82).

Kako se kofein vezuje za adenozične receptore, moguće je da polimorfizmi u *ADOR* mogu uticati na dejstvo kafe (176,186). Prema istraživanju koje su izvršili Han i saradnici, muškarci nosioci A alela za *ADORA₃* rs3393 koji konzumiraju manje od jedne kafe dnevno imaju manji rizik za razvoj dislipidemije (186). Ovaj polimorfizam, sa druge strane, nije uticao na klinička ispoljavanja šizofrenije kod 127 bolesnika u studiji koju su sprovedli Turčin i saradnici (178). He i saradnici nisu pronašli povezanost između rs3393 i hronične srčane isuficijencije (184). Kobold i saradnici nisu povezali ovaj polimorfizam sa neželjenim efektima ili efikasnošću terapije MTXom kod obolelih od RA u studiji koja je uključila 212 bolesnika (179). Ni u našoj studiji *ADORA₃* rs3393 nije pokazao uticaj na efikasnost terapije merene prema EULAR kriterijumima, kao ni na nastanak neželjenih efekata leka, iako su nakon 6 meseci terapije nosioci GG genotipa imali značajno nižu aktivnost bolesti prema DAS28 indeksu. Prema NCBI bazi podataka i projektu 1000 genoma MAF(C) u evropskoj populaciji populaciji iznosi 44,23%, što se podudara sa učestalostima alela u našoj studiji. Smešten je u 3' UTR region na poziciji chr1:111499527 (145). Dodatna ispitivanja na većem broju obolelih od RA su neophodna kako bi se doneli zaključci o značaju ovog polimorfizma u terapiji MTXom.

Enzim ITPA učestvuje u kontroli adenozičnog ciklusa. Polimorfizam rs1127354 dovodi do mutacije promene smisla u egzonu dva što rezultira zamenom prolina treoninom na poziciji 32 u receptoru. Ovo za posledicu ima promenu konformacije enzima i njegove smanjene aktivnosti. Na osnovu rezultata dosadašnjih studija, aktivnost enzima je kod heterozigota značajno redukovana i svedena na svega 25% normalne aktivnosti (187). Uticaj ovog polimorfizma na ishod terapije MTXom kod obolelih od RA ispitivan je u nekoliko studija, ali su rezultati i dalje nejasni. Neki od autora su pronašli povezanost mutiranog A alela i lošeg odgovora na terapiju MTXom (88,188). Istovremeno Lee i saradnici nisu pronašli ovakvu vezu kod 120 bolesnika na monoterapiji MTXom (189). Dervieux i saradnici prijavili su postojanje povezanosti *ITPA* rs1127354 polimorfizma sa pojavom gastrointestinalnih neželjenih efekata kod 255 bolesnika sa RA lečenih MTXom, koju mi u svojoj studijom nismo potvrdili (188). S obzirom da je *ITPA* rs1127354 polimorfizam sa jedne strane funkcionalan i korišćen u modelima za predikciju odgovora na MTX, a sa druge strane postoje oprečni nalazi o njegovom značju u terapiji RA, neophodne su dodatne studije kako bi se došlo do konačnog zaključka (161).

Haplotipovi, predstavljaju specifičan tip kombinacija pojedinačnih polimorfizama, koji su locirani na istom hromozomu i koji se vezano nasleđuju, u blokovima. Kao vid genetičkog biomarkera, specifičan haplotip može biti koristan u predviđanju odgovora na terapiju (190). U našoj studiji *ADORA₃* TAA haplotip je bio češće prisutan kod osoba koje su ispoljile hepatotoksičnost i kod

obolelih koji su razvili koštane erozije u poređenju sa obolelima koji nisu imali ove manifestacije. Treba naglasiti da pojedinačni polimorfizmi od kojih se ovaj haplotip sastoji nisu pokazali ovakvu povezanost ni sa hepatotoksičnošću kao neželjenom reakcijom, ni sa pojavom erozija kod obolelih od RA. Objašnjenje moguće leži u suptilnom uticaju samih polimorfizama koje nije lako zapaziti na malom uzorku bolesnika. Međutim, oboleli kod kojih je prisutan veći broj varijanti koje deluju suptilno u istom smeru mogu biti, na primer, podložni češćoj pojavi neželjenih efekta ili neuspehu terapije, što se može utvrditi samo analizom haplotipova ili kombinovanjem genotipova. Turčin i saradnici su ispitivali povezanost *ADORA*₃ polimorfizama i haplotipova sa kliničkim manifestacijama šizofrenije kod 127 obolelih. Iako pojedinačni polimorfizmi nisu bili povezani sa simptomima bolesti *ADORA*₃ CACTAC haplotip (rs3394, rs3393, rs2229155, rs35511654, rs1544223, rs2298191) je bio povezan sa ataksijom, dok je CACTAT bio povezan i sa ataksijom i sa pojavom tardivne diskinezije (178). Kobold i saradnici su povezali *ADORA*₃ TATCAC i TGTCGC haplotipove (rs2298191, rs1544223, rs35511654, rs2229155, rs3393, rs3394) sa odsustvom efikasnosti terapije kod 212 osoba obolelih od RA, ali ne i sa NE i erozijama (179). Značaj haplotipova sastavljenih od pojedinačnih polimorfizama koji nisu pokazivali povezanost sa ispitivanom varijablom, ali i kombinacije genotipova, mogao bi se objasniti zbirnim dejstvom suptilnih uticaja. Sa druge strane treba biti oprezan pri tumačenju značaja haplotipova ukoliko je jedan od polimorfizama i kao pojedinačan imao uticaj na ispitivanu varijablu zbog mogućnosti da sam doprinosi uticaju celog haplotipa.

Rezultati dobijeni u ovom farmakogenetičkom istraživanju predstavljaju vredan dodatak do sadašnjim naporima da se objasni odgovor i pojava toksičnosti metotreksata kod osoba obolelih od reumatoidnog artritisa. Dodatne studije na većem uzorku bolesnika koje bi bile fokusirane na ispitivanje polimorfizama/haplotipova u adenozijskom putu i receptorima mogle bi nas dovesti bliže konačnom zaključku o njihovom značaju za terapiju metotreksatom kod obolelih od reumatoidnog artritisa. Na osnovu naše studije, haplotipovi, pre nego pojedinačni polimorfizmi, mogli bi predstavljati potencijalne prediktivne biomarkere za odgovor na terapiju metotreksatom kod bolesnika sa reumatoidnim artritisom.

6. ZAKLJUČCI

U sprovedenoj studiji na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti:

1- Ispitivanje rs2298383 polimorfizma *ADORA_{2A}* gena pokazalo je:

- da je učestalost TT genotipa 42,1%, heterozigota CT 41,3% i CC genotipa 16,7%. Učestalost T alela je 62,7% a C alela 37,3%.

- da nema povezanost između rs2298383 polimorfizama *ADORA_{2A}* gena i efikasnosti procenjivane na osnovu EULAR-ovih kriterijuma i toksičnosti terapije metotreksatom kod obolelih od reumatoidnog artritisa.

2- Ispitivanje rs2236624 polimorfizma *ADORA_{2A}* gena pokazalo je:

- da je učestalost CC genotipa 63,4%, heterozigota CT 30,9% i TT genotipa 5,7%. Učestalost C alela je 78,86% a T alela 21,14%.

- da nema povezanost između rs2236624 polimorfizama *ADORA_{2A}* gena i efikasnosti procenjivane na osnovu EULAR-ovih kriterijuma i toksičnosti terapije metotreksatom kod obolelih od reumatoidnog artritisa.

3- Ispitivanje rs5751876 polimorfizma *ADORA_{2A}* gena pokazalo je:

- da je učestalost CC genotipa 38,1%, heterozigota CT 46,6% i TT genotipa 15,3%. Učestalost C alela je 61,44% a T alela 38,56%.

- da nema povezanost između rs5751876 polimorfizama *ADORA_{2A}* gena i efikasnosti procenjivane na osnovu EULAR-ovih kriterijuma i toksičnosti terapije metotreksatom kod obolelih od reumatoidnog artritisa.

4- Ispitivanje rs17004921 polimorfizma *ADORA_{2A}* gena pokazalo je:

- da je učestalost CC genotipa 78,9%, heterozigota CT 16,3% i TT genotipa 4,9%. Učestalost C alela je 86,99% a T alela 13,01%.

- da nema povezanost između rs17004921 polimorfizama *ADORA_{2A}* gena i efikasnosti procenjivane na osnovu EULAR-ovih kriterijuma i toksičnosti terapije metotreksatom kod obolelih od reumatoidnog artritisa.

5- Ispitivanje rs2298191 polimorfizma *ADORA₃* gena pokazalo je:

- da je učestalost TT genotipa 54%, heterozigota CT 34,1% i TT genotipa 11,9%. Učestalost T alela je 71,03% a C alela 28,97%.

- da nema povezanost između rs2298191 polimorfizama *ADORA₃* gena i efikasnosti procenjivane na osnovu EULAR-ovih kriterijuma i toksičnosti terapije metotreksatom kod obolelih od reumatoidnog artritisa.

6- Ispitivanje rs1544223 polimorfizma *ADORA₃* gena pokazalo je:

- da je učestalost AA genotipa 50%, heterozigota AG 42,6% i GG genotipa 7,4%. Učestalost A alela je 71,31% a G alela 28,69%.

- da nema povezanost između rs1544223 polimorfizama *ADORA₃* gena i efikasnosti procenjivane na osnovu EULAR-ovih kriterijuma i toksičnosti terapije metotreksatom kod obolelih od reumatoidnog artritisa.

7- Ispitivanje rs3393 polimorfizma *ADORA₃* gena pokazalo je:

- da je učestalost AA genotipa 31,4%, heterozigota AG 42,1% i GG genotipa 26,4%. Učestalost A alela je 52,48% a G alela 47,52%.

- da nema povezanost između rs1544223 polimorfizama *ADORA₃* gena i efikasnosti procenjivane na osnovu EULAR-ovih kriterijuma i toksičnosti terapije metotreksatom kod obolelih od reumatoidnog artritisa.

8- haplotip TAA *ADORA₃* gena je bio značajno više zastupljen kod bolesnika koji su razvili erozije u odnosu na bolesnike koji nisu ispoljili ovu manifestaciju ($p=0,023$).

9- haplotip TAA *ADORA₃* gena je bio značajno više zastupljen kod bolesnika koji su razvili hepatotoksičnost u odnosu na bolesnike koji nisu ispoljili ovu manifestaciju ($p=0,013$).

10- Ispitivanje rs1127354 polimorfizama *ITPA* gena pokazalo je:

- da je učestalost CC genotipa 90,9%, heterozigota CA 8,3% i AA genotipa 0,8%. Učestalost C alela je 95,04% a A alela 4,96%.

- da nema povezanost između rs1127354 polimorfizama *ITPA* gena i efikasnosti procenjivane na osnovu EULAR-ovih kriterijuma i toksičnosti terapije metotreksatom kod obolelih od reumatoidnog artritisa.

7. LITERATURA

1. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, et al. Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 2010;62(9):2569–81.
2. Anaya JM, Shoenfeld Y, Rojas-Villarraga A, Levy RA, Cervera R, urednici. *Autoimmunity: From Bench to Bedside*. 1. izdanje. El Rosario University Press. 2013.
3. Gibofsky A. Overview of epidemiology, pathophysiology, and diagnosis of rheumatoid arthritis. *Am J Manag Care.* 2012;18(13 Suppl):S295.
4. 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.* 2002;41(1):88-95.
5. Riise TOVE, Jacobsen BK, Gran JT. Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis in the county of Troms, northern Norway. *J Rheumatol.* 2000;27(6):1386
6. Aho K, Kaipiainen-Seppanen O, Heliovaara M, Klaukka T. Epidemiology of rheumatoid arthritis in Finland. *Semin Arthritis Rheum.* 1998;27(5):325-34
7. Cimmino MA, Parisi M, Moggiana G, Mela GS, Accardo S. Prevalence of rheumatoid arthritis in Italy: The Chiavari study. *Ann Rheum Dis.* 1998;57(5):315-8
8. Kvien TK, Glennås A, Knudsrød OG, Smedstad LM, Mowinckel P, Førre Ø. The prevalence and severity of rheumatoid arthritis in Oslo: Results from a county register and a population survey. *Scand J Rheumatol.* 1997;26(6),412-418.
9. Power D, Codd M, Ivers L, Sant S, Barry M. Prevalence of rheumatoid arthritis in Dublin, Ireland: A population based survey. *Ir J Med Sci.* 1999;168(3):197-200.
10. Saraux A, Guedes C, Allain J, Devauchelle V, Valls I, Lamour A, et al. Prevalence of rheumatoid arthritis and spondyloarthritis in Brittany, France. *J Rheumatol.* 1999;26(12),2622.
11. Simonsson M, Bergman S, Jacobsson LTH, Petersson IF, Svensson B. The prevalence of rheumatoid arthritis in Sweden. *Scand J Rheumatol.* 1999;28(6):340-3.
12. Kiss CG, Lövei C, Sütö G, Varjú C, Nagy Z, Füzesi Z, et al. Prevalence of rheumatoid arthritis in the South-Transdanubian region of Hungary based on a representative survey of 10,000 inhabitants. *J Rheumatol.* 2005;32(9):1688-90.
13. Ferucci ED, Templin DW, Lanier AP. Rheumatoid arthritis in American Indians and Alaska natives: A review of the literature. *Semin Arthritis Rheum.* 2005;34(4):662-7.
14. Silman AJ, Ollier W, Holligan S, Birrell F, Adebajo A, Asuzu MC, et al. Absence of rheumatoid arthritis in a rural Nigerian population. *J Rheumatol.* 1993;20(4):618-22
15. Zlatković-Švenda MI, Stojanović RM, Šipetić-Grujičić SB, Guillemin F. Prevalence of rheumatoid arthritis in Serbia. *Rheumatol Int.* 2014;34(5):649–58.
16. Kvien TK, Uhlig T, Ødegård S, Heiberg MS. Epidemiological aspects of rheumatoid arthritis: the sex ratio. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1069(1):212-22.
17. Myasoedova E, Crowson CS, Kremers HM, Therneau TM, Gabriel SE. Is the incidence of

- rheumatoid arthritis rising? Results from Olmsted County, Minnesota, 1955-2007. *Arthritis Rheum.* 2010;62(6):1576-82.
18. Silman AJ. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *J Korean Med Assoc.* 2010;53(10):843–52.
 19. Frisell T, Holmqvist M, Källberg H, Klareskog L, Alfredsson L, Askling J. Familial risks and heritability of rheumatoid arthritis: Role of rheumatoid factor/anti-citrullinated protein antibody status, number and type of affected relatives, sex, and age. *Arthritis Rheum.* 2013;65(11):2773–82.
 20. Svendsen AJ, Kyvik KO, Houen G, Junker P, Christensen K, Christiansen L, et al. On the Origin of Rheumatoid Arthritis: The Impact of Environment and Genes-A Population Based Twin Study. *PLoS One.* 2013;8(2):e57304.
 21. Viatte S, Barton A. Genetics of rheumatoid arthritis susceptibility, severity, and treatment response. *Semin Immunopathol.* 2017;39(4):395–408.
 22. Bossini-Castillo L, De Kovel C, Kallberg H, Van't Slot R, Italiaander A, Coenen M, et al. A genome-wide association study of rheumatoid arthritis without antibodies against citrullinated peptides. *Ann Rheum Dis.* 2015;74(3):e15.
 23. Jiang Y, Zhang R, Zheng J, Liu P, Tang G, Lv H, et al. Meta-Analysis of 125 Rheumatoid Arthritis-Related Single Nucleotide Polymorphisms Studied in the Past Two Decades. *PLoS One.* 2012;7(12):1–8.
 24. Stahl EA, Raychaudhuri S, Remmers EF, Xie G, Eyre S, Thomson BP, et al. Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. *Nat Genet.* 2010;42(6):508–14.
 25. Zhu H, Xia W, Mo XB, Lin X, Qiu YH, Yi NJ, et al. Gene-based genome-wide association analysis in European and Asian populations identified novel genes for rheumatoid arthritis. *PLoS One.* 2016;11(11):1–13.
 26. Han B, Diogo D, Eyre S, Kallberg H, Zhernakova A, Bowes J, et al. Fine mapping seronegative and seropositive rheumatoid arthritis to shared and distinct HLA alleles by adjusting for the effects of heterogeneity. *Am J Hum Genet.* 2014;94(4):522–32.
 27. 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(3):291–6.
 28. 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(16):1645–56.
 29. Coakley G, Brooks D, Iqbal M, Kondeatis E, Vaughan R, Loughran Jr TP, et al. Major histocompatibility complex haplotypic associations in Felty's syndrome and large granular lymphocyte syndrome are secondary to allelic association with HLA-DRB1 *0401. *Rheumatology.* 2000;39(4):393-8.
 30. Okada Y, Eyre S, Suzuki A, Kochi Y, Yamamoto K. Genetics of rheumatoid arthritis: 2018 status. *Ann Rheum Dis.* 2019;78(4):446–53.
 31. Lee YH, Bae SC. Associations between circulating IL-17 levels and rheumatoid arthritis and between IL-17 gene polymorphisms and disease susceptibility: A meta-analysis. *Postgrad*

Med J. 2017;93(1102):465–71.

32. Liu Q, Yang J, He H, Yu Y, Lyu J. Associations between interleukin-10 polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis: a meta-analysis and meta-regression. *Clin Rheumatol*. 2018;37(12):3229–37.
33. Li P, Tao SS, Zhao MQ, Li J, Wang X, Pan HF, et al. Association Study of Matrix Metalloproteinases Gene Polymorphisms with Susceptibility to Rheumatoid Arthritis: A Meta-Analysis. *Immunol Invest*. 2015;44(7):603–15.
34. Scherer S, de Souza TB, de Paoli J, Brenol CV, Xavier RM, Brenol JCT, et al. Matrix metalloproteinase gene polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 2010;30(3):369–73.
35. Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2016;388(10055):2023–38.
36. Jacobsson LTH, Jacobsson ME, Askling J, Askling J, Knowler WC. Perinatal characteristics and risk of rheumatoid arthritis. *Bmj*. 2003;326(7398):1068–9.
37. Silman AJ, Newman J, Macgregor AJ. Cigarette smoking increases the risk of rheumatoid arthritis: results from a nationwide study of disease-discordant twins. *Arthritis Rheum*. 1996;39(5):732–5.
38. Stolt P, Bengtsson C, Nordmark B, Lindblad S, Lundberg I, Klareskog L, et al. Quantification of the influence of cigarette smoking on rheumatoid arthritis: results from a population based case-control study, using incident cases. *Ann Rheum Dis*. 2003;62(9):835–41.
39. Padyukov L, Silva C, Stolt P, Alfredsson L, Klareskog L. A Gene – Environment Interaction Between Smoking and Shared Epitope Genes in HLA – DR Provides a High Risk of Seropositive Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum*. 2004;50(10):3085–92.
40. Klareskog L, Stolt P, Lundberg K, Ka H, Bengtsson C, Grunewald J, et al. A New Model for an Etiology of Rheumatoid Arthritis Smoking May Trigger HLA – DR (Shared Epitope)–Restricted Immune Reactions to Autoantigens Modified by Citrullination. *Arthritis Rheum*. 2006;54(1):38–46.
41. Mathew AJ, Ravindran V. Infections and arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2014;28(6):935–59.
42. Kudaeva FM, Speechley MR, Pope JE. A systematic review of viral exposures as a risk for rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum*. 2018;48(4):587-596
43. Ball RJ, Avenell A, Aucott L, Hanlon P, Vickers MA. Systematic review and meta-analysis of the sero-epidemiological association between Epstein-Barr virus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2015;17(1):1–8.
44. 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(11):1588-94.
45. Stolt P, Källberg H, Lundberg I, Sjögren B, Klareskog L, Alfredsson L, et al. (2005). Silica exposure is associated with increased risk of developing rheumatoid arthritis: results from the Swedish EIRA study. *Ann Rheum Dis*. 2005;64(4):582-6.

46. Khurana R, Berney SM. Clinical aspects of rheumatoid arthritis. *Pathophysiology*. 2005;12(3):153–65.
47. Grassi W, De Angelis R, Lamanna G, Cervini C. Clinical features of rheumatoid arthritis. *Eur J Radiol*. 1998;27:S18-S24.
48. Turesson C, Fallon WMO, Crowson CS, Gabriel SE, Matteson EL. Extra-articular disease manifestations in rheumatoid arthritis : Incidence trends and risk factors over 46 years. *Ann Rheum Dis*. 2003;62(8):722–7.
49. Soukup T, Dosedel M, Někviňdova J, Kubena AA, Tacheci I, Duintjer Tebbens J, et al. The plausible association of MTHFR and ADORA2A polymorphisms with nodules in rheumatoid arthritis patients treated with methotrexate. *Pharmacogenet. Genomics*. 2017;27(2):43-50
50. He J, Ding Y, Feng M, Guo J, Sun X, Zhao J, et al. Characteristics of Sjögren’s syndrome in rheumatoid arthritis. *Rheumatol*. 2013;52(6):1084–9.
51. Britsemmer K, Ursum J, Gerritsen M, Van Tuyl L, Van Schaardenburg D. Validation of the 2010 ACR/EULAR classification criteria for rheumatoid arthritis: Slight improvement over the 1987 ACR criteria. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(8):1468–70.
52. Combe B, Landewe R, Daien CI, Hua C, Aletaha D, Álvaro-Gracia JM, et al. 2016 update of the EULAR recommendations for the management of early arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(6):948–59.
53. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, Mcshane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The american rheumatism association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1988;31(3):315–24.
54. Lunt M, Symmons DPM, Silman AJ. An evaluation of the decision tree format of the American College of Rheumatology 1987 classification criteria for rheumatoid arthritis: Performance over five years in a primary care-based prospective study. *Arthritis Rheum*. 2005;52(8):2277–83.
55. Fautrel B, Combe B, Rincheval N, Dougados M. Level of agreement of the 1987 ACR and 2010 ACR/EULAR rheumatoid arthritis classification criteria: An analysis based on ESPOIR cohort data. *Ann Rheum Dis*. 2012;71(3):386–9.
56. Fransen J, Van Riel PLCM. The Disease Activity Score and the EULAR response criteria. *Clin Exp Rheumatol*. 2005;23(5):S93.
57. Aletaha D, Smolen J. The Simplified Disease Activity Index (SDAI) and the Clinical Disease Activity Index (CDAI): A review of their usefulness and validity in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2005;23(5):S100.
58. Ostrowska M, Maśliński W, Prochorec-Sobieszek M, Nieciecki M, Sudoł-Szopińska I. Cartilage and bone damage in rheumatoid arthritis. *Reumatologia*. 2018;56(2):111–20.
59. Narváez JA, Narváez J, De Lama E, De Albert M. MR imaging of early rheumatoid arthritis. *Radiographics*. 2010;30(1):143–63.
60. Veale DJ, Orr C, Fearon U. Cellular and molecular perspectives in rheumatoid arthritis. *Semin Immunopathol*. 2017;39(4):343–54.
61. Narváez JA, Narváez J, Roca Y, Aguilera C. MR imaging assessment of clinical problems in

- rheumatoid arthritis. *Eur Radiol.* 2002;12(7):1819–28.
62. Firestein GS, McInnes IB. Immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Immunity.* 2017;46(2):183–96.
 63. Amin MA, Fox DA, Ruth JH. Synovial Cellular and Molecular Markers in Rheumatoid Arthritis. *Semin Immunopathol.* 2017;39(4):385–93.
 64. Hitchon CA, El-Gabalawy HS. The Synovium in Rheumatoid Arthritis. *Open Rheumatol J.* 2011;(5)107–14.
 65. Takemura S, Braun A, Crowson C, Kurtin, PJ, Cofield RH, Fallon WMO, et al. Lymphoid Neogenesis in Rheumatoid Synovitis. *J Immunol.* 2001;167(2):1072-80.
 66. Humby F, Bombardieri M, Manzo A, Kelly S, Blades MC, Kirkham B, et al. Ectopic Lymphoid Structures Support Ongoing Production of Class-Switched Autoantibodies in Rheumatoid Synovium. *PLoS Med.* 2009;6(1):e1.
 67. Schett G, Gravallesse E. Bone erosion in rheumatoid arthritis: mechanisms, diagnosis and treatment. *Nat Rev Rheumatol.* 2012;8(11):656–64.
 68. McInnes IB, Schett G. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med.* 2011;365(23):2205–19.
 69. Burrage PS, Mix KS, Brinckerhoff CE. Matrix Metalloproteinases: Role In Arthritis. *Front Biosci.* 2006;11(1):529-43.
 70. Gravallesse EM. Bone destruction in arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2002;61(Suppl 2):84–6.
 71. Jung YK, Kang YM, Han S. Osteoclasts in the Inflammatory Arthritis: Implications for Pathologic Osteolysis. *Immune Netw.* 2019;19(1):e2.
 72. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TWJ. Rheumatoid arthritis. *Lancet.* 2010;376(9746):1094–108.
 73. Uzzaman A, Cho SH. Classification of hypersensitivity reactions. *Allergy Asthma Proc.* 2012;33(Suppl 1):S96–S99.
 74. Actor JK, Ampel NM. Hypersensitivity : T Lymphocyte-mediated (Type IV). *eLS.* 2009.
 75. Smolen JS, Landewé R, Bijlsma J, Burmester G, Chatzidionysiou K, Dougados M, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update. *Ann Rheum Dis.* 2017;76(6):960–77.
 76. Eliaou JF, Andary M, Favier F, Carayon P, Poncelet P, Sany J, et al. Increase of class II HLA molecules on the membrane of B lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Autoimmunity.* 1988;1(3):217-22.
 77. Kerlan-Candon S, Louis-Pence P, Wiedemann A, Combe B, Clot J, Eliaou JF. Specific Overexpression of Rheumatoid Arthritis – Associated HLA – DR Alleles and Presentation of Low-Affinity Peptides. *Arthritis Rheum.* 2001;44(6):1281–92.
 78. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med.* 2007;204(6):1257–65.
 79. Haskó G, Cronstein B. Regulation of inflammation by adenosine. *Front Immunol.* 2013;4:85.

80. Sheth S, Brito R, Mukherjea D, Rybak LP, Ramkumar V. Adenosine receptors: Expression, function and regulation. *Int J Mol Sci.* 2014;15(2):2024–52.
81. Cronstein BN, Sitkovsky M. Adenosine and adenosine receptors in the pathogenesis and treatment of rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 2016;13(1):41–51.
82. Stamp LK, Hazlett J, Roberts RL, Frampton C, Highton J, Hessian PA. Adenosine receptor expression in rheumatoid synovium: A basis for methotrexate action. *Arthritis Res Ther.* 2012;14(3):R138.
83. Lukashev D, Ohta A, Apasov S, Chen JF, Sitkovsky M. Cutting Edge: Physiologic Attenuation of Proinflammatory Transcription by the G_s Protein-Coupled A_{2A} Adenosine Receptor In Vivo . *J Immunol.* 2004;173(1):21–4.
84. Varani K, Massara A, Vincenzi F, Tosi A, Padovan M, Trotta F, et al. Normalization of A_{2A} and A₃ adenosine receptor up-regulation in rheumatoid arthritis patients by treatment with anti-tumor necrosis factor α but not methotrexate. *Arthritis Rheum.* 2009;60(10):2880–91.
85. Fearon U, Canavan M, Biniiecka M, Veale DJ. Hypoxia, mitochondrial dysfunction and synovial invasiveness in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2016;12(7):385–97.
86. Csóka B, Himer L, Selmeczy Z, Vizi ES, Pacher P, Ledent C, et al. Adenosine A_{2A} receptor activation inhibits T helper 1 and T helper 2 cell development and effector function. *FASEB J.* 2008;22(10):3491-9.
87. Haskó G, Antonioli L, Cronstein BN. Adenosine metabolism, immunity and joint health. *Biochem Pharmacol.* 2018;151:307–13.
88. Wessels JAM, Kooloos WM, De Jonge R, De Vries-Bouwstra JK, Allaart CF, Linssen A, et al. Relationship between genetic variants in the adenosine pathway and outcome of methotrexate treatment in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006;54(9):2830–9.
89. Brown PM, Pratt AG, Isaacs JD. Mechanism of action of methotrexate in rheumatoid arthritis , and the search for biomarkers. *Nat Publ Gr.* 2016;12(12):731–42.
90. Pacheco R, Martinez-Navio JM, Lejeune M, Climent N, Oliva H, Gatell JM, et al. CD26, adenosine deaminase, and adenosine receptors mediate costimulatory signals in the immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(27):9583–8.
91. Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Linden J, Müller CE. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors—an update. *Pharmacol Rev.* 2011;63(1):1–34.
92. Cutolo M, Sulli A, Pizzorni C, Seriola B, Straub RH. Anti-inflammatory mechanisms of methotrexate in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2001;60(8):729–35.
93. Cekic C, Kayhan M, Koyas A, Akdemir I, Savas AC. Molecular mechanism for adenosine regulation of dendritic cells. *J Immunol.* 2017;198(Suppl 1):67.8.
94. Varani K, Padovan M, Vincenzi F, Targa M, Trotta F, Govoni M, et al. A_{2A} and A₃ adenosine receptor expression in rheumatoid arthritis: upregulation, inverse correlation with disease activity score and suppression of inflammatory cytokine and metalloproteinase release. *Arthritis Res Ther [Internet].* 2011;13(6):R197.
95. Cronstein BN, Levin RI, Philips M, Hirschhorn R, Abramson SB, Weissmann G. Neutrophil

adherence to endothelium is enhanced via adenosine A1 receptors and inhibited via adenosine A2 receptors. *J Immunol.* 1992;148(7):2201-6.

96. Bouma MG, Van Den Wildenberg FA, Buurman WA. Adenosine inhibits cytokine release and expression of adhesion molecules by activated human endothelial cells. *Am J Physiol - Cell Physiol.* 1996;270(2):C522-C529.
97. Sullivan GW, Lee DD, Ross WG, Divietro JA, Lappas CM, Lawrence MB, et al. Activation of A2A adenosine receptors inhibits expression of $\alpha 4/\beta 1$ integrin (very late antigen-4) on stimulated human neutrophils. *J Leukoc Biol.* 2004;75(1):127-34.
98. Cronstein BN, Levin R, Belanoff J, Weissmann G, Hirschhorn R. Adenosine: an endogenous inhibitor of neutrophil-mediated injury to endothelial cells. *J Clin Invest.* 1986;78(3):760-70.
99. Haskó G, Kuhel DG, Chen JF, Schwarzschild MA, Deitch EA, Mabley JG, et al. Adenosine inhibits IL-12 and TNF- α production via adenosine A2a receptor-dependent and independent mechanisms. *FASEB J.* 2000;14(13):2065-74.
100. Ferrante CJ, Pinhal-Enfield G, Elson G, Cronstein BN, Hasko G, Outram S, et al. The adenosine-dependent angiogenic switch of macrophages to an M2-like phenotype is independent of Interleukin-4 receptor alpha (IL4R α) signaling. *Inflammation.* 2013;36(4):921-31.
101. Rath-Wolfson L, Bar-Yehuda S, Madi L, Ochaion A, Cohen S, Zabutti A, et al. IB-MECA, an A3 adenosine receptor agonist prevents bone resorption in rats with adjuvant induced arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2006;24(4):400-6.
102. Mediero A, Kara FM, Wilder T, Cronstein BN. Adenosine A2A receptor ligation inhibits osteoclast formation. *Am J Pathol.* 2012;180(2):775-86.
103. Lappas CM, Rieger JM, Linden J. A2A Adenosine Receptor Induction Inhibits IFN- γ Production in Murine CD4 + T Cells. *J Immunol.* 2020;174(2):1073-80.
104. Hoskin DW, Butler JJ, Drapeau D, Haeryfar SMM, Blay J. Adenosine acts through an A3 receptor to prevent the induction of murine anti-CD3-activated killer T cells. *Int J Cancer.* 2002;99(3):386-95.
105. Huang BS, Apasov S, Koshiba M, Sitkovsky M. Role of A2a Extracellular Adenosine Receptor-Mediated Signaling in Adenosine-Mediated Inhibition of T-Cell Activation and Expansion. *Blood.* 1997;90(4):1600-10.
106. Gubner R, August S, Ginsberg V. Therapeutic suppression of tissue reactivity. II. Effect of aminopterin in rheumatoid arthritis and psoriasis. *Am J Med Sci.* 1951;221(2):176-182.
107. Weinblatt ME. Methotrexate in rheumatoid arthritis: a quarter century of development. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2013;124:16-25.
108. Black RL, O'Brien WM, Van Scott EJ, Auerbach R, Eisen AZ, Bunim JJ. Methotrexate Therapy in Psoriatic Arthritis: Double-Blind Study on 21 Patients. *JAMA.* 1964;189(10):743-7.
109. Williams HJ, Willkens RF, Samuelson CO, Alarcón GS, Guttadauria M, Yarboro C, et al. Comparison of low-dose oral pulse methotrexate and placebo in the treatment of rheumatoid arthritis. A Controlled Clinical Trial. *Arthritis Rheum.* 1985;28(7):721-30.
110. Weinblatt ME, Coblyn JS, Fox DA, Fraser PA, Holdsworth DE, Glass DN, et al. Efficacy of

low-dose methotrexate in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 1985;312(13):818–22.

111. Andersen PA, West SG, O'Dell JR, Via CS, Claypool RG, Kotzin BL. Weekly pulse methotrexate in rheumatoid arthritis. Clinical and immunologic effects in a randomized, double-blind study. *Ann Intern Med*. 1985;103(4):489-96.
112. Thompson RN, Watts C, Edelman J, Esdaile J, Russell AS. A controlled two-centre trial of parenteral methotrexate therapy for refractory rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 1984;11(6):760-3.
113. Goekoop-Ruiterman YPM, De Vries-Bouwstra JK, Allaart CF, Van Zeben D, Kerstens PJSM, Hazes JMW, et al. Clinical and radiographic outcomes of four different treatment strategies in patients with early rheumatoid arthritis (the BeSt study): A randomized, controlled trial. *Arthritis Rheum*. 2005;52(11):3381–90.
114. Friedman B, Cronstein B. Methotrexate mechanism in treatment of rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*. 2019;86(3):301-7.
115. Van Ede AE, Laan RF, Rood MJ, Huizinga TW, Van De Laar MA, Van Denderen CJ, et al. Effect of folic or folinic acid supplementation on the toxicity and efficacy of methotrexate in rheumatoid arthritis: a forty-eight week, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Arthritis Rheum*. 2001;44(7):1515–24.
116. Morgan SL, Baggott JE, Vaughn WH, Austin JS, Veitch TA, Lee JY et al. Supplementation with Folic Acid during Methotrexate Therapy for Rheumatoid Arthritis: a double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med*. 1994;121(11):833–41.
117. Lima A, Bernardes M, Azevedo R, Seabra V, Medeiros R. Moving toward personalized medicine in rheumatoid arthritis: SNPs in methotrexate intracellular pathways are associated with methotrexate therapeutic outcome. *Pharmacogenomics*. 2016;17(15):1649–74.
118. Desmoulin SK, Hou Z, Gangjee A, Matherly LH. The human proton-coupled folate transporter: Biology and therapeutic applications to cancer. *Cancer Biol Ther*. 2012;13(14):1355-73.
119. Edno L, Bressolle F, Gomeni R, Bologna C, Sany J, Combe B. Total and free methotrexate pharmacokinetics in rheumatoid arthritis patients. *Ther Drug Monit*. 1996;18(2):128-34.
120. Godfrey C, Sweeney K, Miller K, Hamilton R, Kremer J. The population pharmacokinetics of long-term methotrexate in rheumatoid arthritis. *Br J Clin Pharmacol*. 1998;46(4):369–76.
121. Nuernberg B, Koehnke R, Solsky M, Hoffman J, Furst DE. Biliary elimination of low-dose methotrexate in humans. *Arthritis Rheum*. 1990;33(6):898-902.
122. Yamamoto T, Shikano K, Nanki T, Kawai S. Folylpolyglutamate synthase is a major determinant of intracellular methotrexate polyglutamates in patients with rheumatoid arthritis. *Sci Rep [Internet]*. 2016;6(1):1–8
123. Dalrymple JM, Stamp LK, O'Donnell JL, Chapman PT, Zhang M, Barclay ML. Pharmacokinetics of oral methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2008;58(11):3299–308.
124. Malik F, Ranganathan P. Methotrexate pharmacogenetics in rheumatoid arthritis: A status report. *Pharmacogenomics*. 2013;14(3):305–14.
125. Baggott JE, Vaughn WH, Hudson BB. Inhibition of 5-aminoimidazole-4-carboxamide

ribose transformylase, adenosine deaminase and 5'-adenylate deaminase by polyglutamates of methotrexate and oxidized folates and by 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside and ribotide. *Biochem J.* 1986;236(1):193–200.

126. Baggott JE, Morgan SL, Sams WM, Linden J. Urinary adenosine and aminoimidazolecarboxamide excretion in methotrexate-treated patients with psoriasis. *Arch Dermatol.* 1999;135(7):813–7.
127. Montesinos MC, Desai A, Delano D, Chen JF, Fink JS, Jacobson MA, et al. Adenosine A2A or A3 receptors are required for inhibition of inflammation by methotrexate and its analog MX-68. *Arthritis Rheum.* 2003;48(1):240–7.
128. Le F, Townsend-Nicholson A, Baker E, Sutherland GR, Schofield PR. Characterization and Chromosomal Localization of the Human A2a Adenosine Receptor Gene: ADORA2A. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;223(2):461–7.
129. Peterfreund RA, MacCollin M, Gusella J, Fink JS. Characterization and expression of the human A2a adenosine receptor gene. 1996;66(1):362–8.
130. Yu L, Frith MC, Suzuki Y, Peterfreund RA, Gearan T, Sugano S, et al. Characterization of genomic organization of the adenosine A2A receptor gene by molecular and bioinformatics analyses. *Brain Res.* 2004;1000(1-2):156–73.
131. Atkinson MR, Townsend-Nicholson A, Nicholl JK, Sutherland GR, Schofield PR. Cloning, characterisation and chromosomal assignment of the human adenosine A3 receptor (ADORA3) gene1. *Neurosci Res.* 1997;29(1):73-79.
132. Murrison EM, Goodson SJ, Edbrooke MR, Harris CA. Cloning and characterisation of the human adenosine A3 receptor gene. 1996;384(3):243–6.
133. Salvatore CA, Jacobson MA, Taylor HE, Linden J, Johnson RG. Molecular cloning and characterization of the human A3 adenosine receptor. *Proc Natl Acad Sci.* 1993;90(21):10365–9.
134. Mohandas T, Sparkes RS, Passage MB, Sparkes MC, Miles JH, Kaback MM. Regional mapping of ADA and ITP on human chromosome 20: cytogenetic and somatic cell studies in an X/20 translocation. *Cytogenet Genome Res.* 1980;26(1):28–35.
135. Franca R, Rebora P, Bertorello N, Fagioli F, Conter V, Biondi A, et al. Pharmacogenetics and induction/consolidation therapy toxicities in acute lymphoblastic leukemia patients treated with AIEOP-BFM ALL 2000 protocol. *Pharmacogenomics J.* 2017;17(1):4–10.
136. Sumi S, Marinaki AM, Arenas M, Fairbanks L, Shobowale-Bakre M, Rees DC, et al. Genetic basis of inosine triphosphate pyrophosphohydrolase deficiency. *Hum Genet.* 2002;111:360–7.
137. Lin S, McLennan AG, Ying K, Wang Z, Gu S, Jin H, et al. Cloning, Expression, and Characterization of a Human Inosine Triphosphate Pyrophosphatase Encoded by the ITPA Gene. *J Biol Chem.* 2001;276(22):18695–701.
138. Karki R, Pandya D, Elston RC, Ferlini C. Defining “mutation” and “polymorphism” in the era of personal genomics. *BMC Med Genomics.* 2015;8(1):1–7.
139. Turnpenny P, Ellard Sian. *Emery’s Elements of Medical Genetics.* 13. izdanje. Elsevier. 2007.

140. Nelson MR, Marnellos G, Kammerer S, Hoyal CR, Shi MM, Cantor CR, et al. Large-scale validation of single nucleotide polymorphisms in gene regions. *Genome Res.* 2004;14(8):1664–8.
141. Relling MV, Evans WE. Pharmacogenomics in the clinic. *Nature.* 2015;526:343–50.
142. Shinohara M, Saitoh M, Nishizawa D, Ikeda K, Hirose S, Takanashi JI, et al. ADORA2A polymorphism predisposes children to encephalopathy with febrile status epilepticus. *Neurology.* 2013;80(17):1571–6.
143. Beste C, Stock AK, Ness V, Epplen JT, Arning L. Differential effects of ADORA2A gene variations in pre-attentive visual sensory memory subprocesses. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2012;22(8):555–61.
144. Childs E, Hohoff C, Deckert J, Xu K, Badner J, De Wit H. Association between ADORA2A and DRD2 Polymorphisms and Caffeine-Induced Anxiety. 2008;33(12):2791–800.
145. Sherry ST, Ward M, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, et al. dbSNP : the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(1):308–11.
146. Kim SH, Kim YK, Park HW, Kim SH, Kim SH, Ye YM, et al. Adenosine deaminase and adenosine receptor polymorphisms in aspirin-intolerant asthma. *Respir Med.* 2009;103(3):356–63.
147. Burgis NE. A disease spectrum for ITPA variation: Advances in biochemical and clinical research. *J Biomed Sci.* 2016;23(1):1–13.
148. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(3):1215.
149. Aletaha D, Alasti F, Smolen JS. Optimisation of a treat-to-target approach in rheumatoid arthritis : strategies for the 3-month time point. *Ann Rheum Dis.* 2016;75(8):1479-85.
150. Farragher TM, Lunt M, Fu B, Bunn D, Symmons DPM. Early treatment with , and time receiving , first disease-modifying antirheumatic drug predicts long-term function in patients with infl ammatory polyarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2010;69(4):689–95.
151. Szekanecz Z, Meskó B, Poliska S, Váncsa A, Szamosi S, Végh E, et al. Pharmacogenetics and pharmacogenomics in rheumatology. *Immunol Res.* 2013;56:325–33.
152. Donahue KE, Schulman ER, Gartlehner G, Jonas BL, Coker-Schwimmer E, Patel S V., et al. Comparative Effectiveness of Combining MTX with Biologic Drug Therapy Versus Either MTX or Biologics Alone for Early Rheumatoid Arthritis in Adults: a Systematic Review and Network Meta-analysis. *J G Intern Med.* 2019;34(10):2232-45.
153. Breedveld FC, Weisman MH, Kavanaugh AF, Cohen SB, Pavelka K, Van Vollenhoven R, et al. The PREMIER Study: a multicenter, randomized, double-blind clinical trial of combination therapy with adalimumab plus methotrexate versus methotrexate alone or adalimumab alone in patients with early, aggressive rheumatoid arthritis who had not had previous methotrexate treatment. *Arthritis Rheum.* 2006;54(1):26-37.
154. Emery P, Burmester GR, Bykerk VP, Combe BG, Furst DE, Barré E, et al. Evaluating drug-free remission with abatacept in early rheumatoid arthritis: Results from the phase 3b, multicentre, randomised, active-controlled AVERT study of 24 months, with a 12-month, double-blind treatment period. *Ann Rheum Dis.* 2015;74(1):19-26.

155. Sutcliffe M, Radley G, Barton A. Personalized medicine in rheumatic diseases : how close are we to being able to use genetic biomarkers to predict response to TNF inhibitors?. *Expert Rev Clin Immunol* . 2020;16(4):389-96.
156. Ling SF, Bluett J. Pharmacogenetics of methotrexate response in rheumatoid arthritis: an update. *Pharmacogenomics*. 2020;21(1):3–6.
157. Kłak A, Paradowska-Gorycka A, Kwiatkowska B, Raciborski F. Personalized medicine in rheumatology. *Reumatologia*. 2016;54(4):177–86.
158. Eektimmerman F, Swen JJ, Madhar MB, Allaart CF, Guchelaar HJ. Predictive genetic biomarkers for the efficacy of methotrexate in rheumatoid arthritis : a systematic review. *Pharmacogenomics J*. 2020;20(2):159-68.
159. Owen SA, Hider SL, Martin P, Bruce IN, Barton A, Thomson W. Genetic polymorphisms in key methotrexate pathway genes are associated with response to treatment in rheumatoid arthritis patients. *Pharmacogenomics J*. 2013;13(3):227–34.
160. Restrepo LF, Giraldo R, Londoño J, Pinzón C, Cortes A, Ballesteros G, et al. Pharmacogenetics of methotrexate in rheumatoid arthritis : A systematic review. *Rev Colomb Reumatol*. 2016;23(2):102–14.
161. Fransen J, Kooloos WM, Wessels JAM, Huizinga TWJ, Guchelaar HJ, Van Riel PLCM, et al. Clinical pharmacogenetic model to predict response of MTX monotherapy in patients with established rheumatoid arthritis after DMARD failure. *Pharmacogenomics*. 2012;13(9):1087–94.
162. Collins JE, Johansson FD, Gale S, Kim S, Shrestha S, Sontag D, et al. Predicting Remission Among Patients With Rheumatoid Arthritis Starting Tocilizumab Monotherapy: Model Derivation and Remission Score Development. *ACR Open Rheumatol*. 2020;2(2):65–73.
163. Jenko B, Lusa L, Tomsic M, Praprotnik S, Dolzan V. Clinical – pharmacogenetic predictive models for MTX discontinuation due to adverse events in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics J*. 2017;17(5):412-18.
164. Jenko B, Tomšič M, Jekić B, Milić V, Dolžan V, Praprotnik S. Clinical pharmacogenetic models of treatment response to methotrexate monotherapy in Slovenian and Serbian rheumatoid arthritis patients: Differences in patient’s management may preclude generalization of the models. *Front Pharmacol*. 2018;9:20.
165. Forslind K, Hafstro I, Ahlmen M, Svensson B, et al. Sex: a major predictor of remission in early rheumatoid arthritis?. *Ann Rheum Dis*. 2007;66(1):46–52.
166. Sharma S, Das M, Kumar A, Marwaha V, Shankar S, Singh P, et al. Purine biosynthetic pathway genes and methotrexate response in rheumatoid arthritis patients among north Indians. *Pharmacogenet Genomics*. 2009;19(10):823–8.
167. Hider SL, Thomson W, Mack LF, Armstrong DJ, Shadforth M, Bruce IN. Polymorphisms within the adenosine receptor 2a gene are associated with adverse events in RA patients treated with MTX. *Rheumatology*. 2008;47(8):1156–9.
168. Chen Y, Zou K, Sun J, Yang Y, Liu G. Are gene polymorphisms related to treatment outcomes of methotrexate in patients with rheumatoid arthritis? A systematic review and meta-analysis. *Pharmacogenomics*. 2017;18(2):175–95.
169. Wessels JAM, Van Der Kooij SM, Le Cessie S, Kievit W, Barerra P, Allaart CF, et al. A

- clinical pharmacogenetic model to predict the efficacy of methotrexate monotherapy in recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2007;56(6):1765–75.
170. Hohoff C, Mullings EL, Heatherley S V., Freitag CM, Neumann LC, Domschke K, et al. Adenosine A2A receptor gene: Evidence for association of risk variants with panic disorder and anxious personality. *J Psychiatr Res.* 2010;44(14):930–7.
 171. Goñi JR, De La Cruz X, Orozco M. Triplex-forming oligonucleotide target sequences in the human genome. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(1):354–60.
 172. Cannata A, De Luca C, Korkina LG, Ferlazzo N, Ientile R, Curro M, et al. The SNP rs2298383 Reduces ADORA2A Gene Transcription and Positively Associates with Cytokine Production by Peripheral Blood Mononuclear Cells in Patients with Multiple Chemical Sensitivity. *Int J Mol Sci.* 2020;21(5):1858.
 173. Tsujimoto SI, Yanagimachi M, Tanoshima R, Urayama KY, Tanaka F, Aida N, et al. Influence of ADORA2A gene polymorphism on leukoencephalopathy risk in MTX-treated pediatric patients affected by hematological malignancies. *Pediatr Blood Cancer.* 2016;63(11):1983–9.
 174. Berlacher M, Mastouri R, Philips S, Skaar TC, Kreutz RP. Common genetic polymorphisms of adenosine A2A receptor do not influence response to regadenoson. *Pharmacogenomics.* 2017;18(6):523–9.
 175. Vital M, Bidegain E, Raggio V, Esperon P. Molecular characterization of genes modifying the age at onset in Huntington's disease in Uruguayan patients. *Int J Neurosci.* 2016;126(6):510–3.
 176. Rogers PJ, Hohoff C, Heatherley S V., Mullings EL, Maxfield PJ, Evershed RP, et al. Association of the anxiogenic and alerting effects of caffeine with ADORA2A and ADORA1 polymorphisms and habitual level of caffeine consumption. *Neuropsychopharmacology.* 2010;35(9):1973–83.
 177. Oliveira S, Ardais AP, Bastos CR, Gazal M, Jansen K, De Mattos Souza L, et al. Impact of genetic variations in ADORA2A gene on depression and symptoms: a cross-sectional population-based study. *Purinergic Signal.* 2019;15(1):37–44.
 178. Turčin A, Dolžan V, Porcelli S, Serretti A, Plesničar BK. Adenosine Hypothesis of Antipsychotic Drugs Revisited: Pharmacogenomics Variation in Nonacute Schizophrenia. *Omi A J Integr Biol.* 2016;20(5):283–9.
 179. Kobold N, Jenko B, Tomsic M, Dolžan V, Praprotnik S. Adora2a polymorphisms influence methotrexate adverse events in rheumatoid arthritis. *Isr Med Assoc J.* 2019;5(21):333–8.
 180. Charles BA, Conley YP, Chen G, Miller RG, Dorman JS, Gorin MB, et al. Variants of the adenosine A2A receptor gene are protective against proliferative diabetic retinopathy in patients with type 1 diabetes. *Ophthalmic Res.* 2011;46(1):1–8.
 181. Freitag CM, Agelopoulos K, Huy E, Rothermundt M, Krakowitzky P, Meyer J, et al. Adenosine A2A receptor gene (ADORA2A) variants may increase autistic symptoms and anxiety in autism spectrum disorder. *Eur Child Adolesc Psychiatry.* 2010;19(1):67–74.
 182. Hohoff C, Garibotto V, Elmenhorst D, Baffa A, Kroll T, Hoffmann A, et al. Association of Adenosine Receptor Gene Polymorphisms and In Vivo Adenosine A1 Receptor Binding in The Human Brain. *Neuropsychopharmacology.* 2014;39(13):2989–99.

183. Zhai YJ, Liu P, He HR, Zheng XW, Wang Y, Yang QT, et al. The association of ADORA2A and ADORA2B polymorphisms with the risk and severity of chronic heart failure: A case-control study of a northern Chinese population. *Int J Mol Sci.* 2015;16(2):2732–46.
184. He HR, Li YJ, He GH, Qiang H, Zhai YJ, Ma M, et al. The Polymorphism in ADORA3 Decreases Transcriptional Activity and Influences the Chronic Heart Failure Risk in the Chinese. *Biomed Res Int.* 2018;2018:4969385.
185. Kim SH, Nam EJ, Kim YK, Ye YM, Park HS. Functional variability of the adenosine A3 receptor (ADORA3) gene polymorphism in aspirin-induced urticaria. *Br J Dermatol.* 2010;163(5):977–85.
186. Han J, Shon J, Hwang JY, Park YJ. Effects of coffee intake on dyslipidemia risk according to genetic variants in the adora gene family among korean adults. *Nutrients.* 2020;12(2):493.
187. Bierau J, Lindhout M, Bakker JA. Pharmacogenetic significance of inosine triphosphatase. *Pharmacogenomics.* 2007;8(9):1221–8.
188. Dervieux T, Wessels JAM, Van Der Straaten T, Penrod N, Moore JH, Guchelaar HJ, et al. Gene – gene interactions in folate and adenosine biosynthesis pathways affect methotrexate efficacy and tolerability in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenet Genomics.* 2009;19(12):935–44.
189. Lee YC, Cui J, Costenbader KH, Shadick NA, Weinblatt ME, Karlson EW. Investigation of candidate polymorphisms and disease activity in rheumatoid arthritis patients on methotrexate. *Rheumatology.* 2009;48(6):613–7.
190. Cha EY, Jeong HE, Kim WY, Shin HJ, Kim HS, Shin JG. Brief introduction to current pharmacogenomics research tools. *Transl Clin Pharmacol.* 2016;24(1):13-21.

SPISAK SKRAĆENICA

ABC – ATP vezujuće kasete

ACPA – antitela na ciklični citrulisani peptid

ACR - „American College of Rheumatology”, američki koledž za reumatologiju

ADA – adenzin deaminaza

ADOR – adenzinski receptor

ADORA2A – adenzinski receptor tip A2A

ADORA3 – adenzinski receptor tip A3

ADP – adenzin difosfat

AICAR – 5-aminoimidazol 4-karboksamid ribonukleotid

ALT - alanin aminotransferaza

AMP – adenzin monofosfat

AMPD1 – adenzin monofosfat deaminaza 1

ANA – antinuklearna antitela

APC – antigen prezentujuća ćelija

ARA – American Rheumatism Association

AST – aspartat aminotransferaza

ATP – Adenzin trifosfat

BAK – BCL2 antagonist killer 1

BBZ – broj bolnih zglobova

BOZ – broj otečenih zglobova

CCP – ciklisani citruli

CCR – hemokinski receptor sa CC motivom

CD – cluster of differentiation

CDAI – Clinical Disease Activity Index

CRE – cAMP responsivni element

CRP – C reaktivni proteina

CTL – citotoksični T-limfociti

CTLA – antigen asociran sa citotoksičnim T limfocitima

DAS - Disease Activity Score

DAS28 - Disease Activity Score 28

DHFR – dihidrofolat reduktaza

DIP – distalni interfalangealni zglobovi

DMARD – „Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs”, bolest modifikujući lekovi

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina

EBV – Epstein-Barr-ov virus

EDTA – Etilendiamintetrasirćetna kiselina

ENT – ekvilibrijumski transporteri nukleozidna

EULAR – „European League Against Rheumatism”, Evropska liga za borbu protiv reumatizma

EVGF – endotelni vaskularni faktor rasta

FRET – fluorescence resonant energy transfer

FSS – fibroblastima slični sinoviociti

GGH – γ -glutamil hidrolaza

GRG – gornja referentna granica

GWA studija – genome wide association study, studije asocijacije celokupnog genoma

HCV – hepatitis C virus

HLA – humani leukocitni antigen

IL – interleukin

IMP – inozin monofosfat

ITPA – inozin trifosfataza

IRF – interferon regulatorni faktor

KASP – Kompetitive Allele Specific PCR

MAF – Minor Allele Frequency, učestalost retkog alela

MAPK – mitogenom aktivirane proteinske kinaze

MCP – metakarpofalangealni zglobovi

MHC – Major histocompatibility complex, glavni kompleks histokompatibilnosti

MMP – matriks metaloproteinaza

MTHFR – metilen tetrahidrofolat reduktaza

MTP - metatarzofalangealni zglobovi

MTX – metotreksat

NAD⁺ – nikotinamid adenin dinukleotid

NCBI – National Center for Biotechnology Information

NFκβ – nuklearni faktor kapa beta

NSAIL – nesteroidni antiinflamatorni lekovi

PADI - peptidil arginin deaminaza

PCFT – protonski vezan transporter folata

PIP – proksimalni interfalangealni zglobovi

PCR – Polymerase chain reaction, lančana reakcija polimerizacije

PTPN – proteinska tirozin fosfataza, nerekceptorski tip

RA – reumatoidni artritis

RANK – član 11 superfamilije faktora nekroze tumora

RANKL – ligand člana 11 superfamilije faktora nekroze tumora

RFC – redukovani folatni nosač

RF – reumatoidni faktor

RNK – ribonukleinska kiselina

SDAI – Simple Disease Activity Index

SDS – Natrijum dodecil sulfat

SE – sedimentacija eritrocita

SNP – polimorfizam jednog nukleotida

STAT – provodnik signala i aktivator transkripcije

T2T – „treat to target”, ciljano lečenje

TFO – tripleks formirajući oligonukleotid

THF – tetrahidrofolat

TIMP – thivni inhibitor matriks metaloproteinaze

TLR –Toll-u slični receptori

TNF – faktor nekroze tumora

TYMS – timidilat sintaza

UTR – regionkoji se ne prevodi translacijom

BIOGRAFIJA

Rođena je 30.1.1987. godine u Pančevu (Republika Srbija). Zaposlena je na Institutu za humanu genetiku Medicinskog fakulteta u Beogradu u zvanju asistenta za užu naučnu oblast Humana genetika.

Medicinski fakultet u Beogradu upisala je školske 2006/2007. godine. Diplomirala je 17.10.2012. godine sa prosečnom ocenom 9,67. Obavezni lekarski staž obavila je od novembra 2012. godine do maja 2013. godine u Domu zdravlja Pančevo i Opštoj bolnici u Pančevu. Stručni ispit je položila u maju 2013. godine.

Specijalističke akademske studije - modul: Reumatologija upisala je školske 2013/2014. godine na Medicinskom fakultetu u Beogradu. Završni akademski specijalistički rad sa temom „Profil antifosfolipidnih antitela kod obolelih od antifosfolipidnog sindroma" je odbranila 2.9.2016. godine.

U periodu 1.9.2014-1.9.2015 godine predavala je Zdravstvenu kulturu i Ekologiju sa zdravstvenim vaspitanjem u Ekonomsko-trgovinskoj školi „Paja Marganović u Pančevu". Od 5.3.2015 do 14.9.2015. godine predavala je stručne predmete u Srednjoj medicinskoj školi „Stevica Jovanović" u Pančevu.

28.10.2015. godine izabrana je, a 28.10.2016. reizabrana u zvanje saradnika u nastavi za užu naučnu oblast Humana genetika.

2.11.2017. godine izabrana je u zvanje asistenta za užu naučnu oblast Humana genetika na Medicinskom fakultetu u Beogradu.

Od oktobra 2015. godine učestvuje u pripremi i realizaciji nastave iz Humane genetike, a od oktobra 2016. godine učestvuje i u izvođenju nastave iz Humane genetike na engleskom jeziku. Od januara 2016. godine aktivno je uključena u naučno-istarživački rad i zdravstvenu delatnost koja se obavlja u laboratorijama Instituta.

Od jula 2020. uključena je u rad na projektu „Rokers" u okviru programa PROMIS Fonda za nauku RS za mlade istraživače.

Od novembra 2020. godine pohađa specijalističku nastavu u oblasti Laboratorijska medicina.

Čita, piše i govori engleski jezik.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Милка Грк

Број индекса ММ11/15

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Утицај полиморфизама гена који кодирају аденозинске рецепторе на ефикасност и токсичност монотерапије метотрексатом код пацијената са реуматоидним артритисом

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 8.2.2021



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Милка Грк

Број индекса ММ11/15

Студијски програм Молекуларна медицина

Наслов рада: Утицај полиморфизама гена који кодирају аденозинске рецепторе на ефикасност и токсичност монотерапије метотрексатом код пацијената са реуматоидним артритисом

Ментор проф. др Биљана Јекић, доц. др Вера Милић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 8.2.2021.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Утицај полиморфизама гена који кодирају аденозинске рецепторе на ефикасност и токсичност монотерапије метотрексатом код пацијената са реуматоидним артритисом

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 8. 2. 2021.



1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.