



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**

Александра Вранић

**Циркулишуће микропартикуле и биомаркери
оксидационог стреса код пацијената оболелих од
реуматоидног артритиса**

Докторска дисертација

Коментор:

проф. др Александра Антовић

Коментор:

доц. др Мирјана Веселиновић

Крагујевац, 2019. године

САЖЕТАК

Увод: Реуматоидни артритис (РА) је хронична, инфламаторна, аутоимуна болест која узрокује синовитис и деструктивни артритис, прогресивно оштећење хрскавице и зглобова, деформитете праћене ван-зглобним, системским манифестацијама болести, снажан системски инфламаторни одговор са убрзаним развојем атеросклерозе, као и инвалидитет, скраћени животни век и повећан морталитет.

Циљ: Испитати утицај РА на концентрацију микропартикула, активирање хемостазе, појаву прокоагулабилног стања, фибринску мрежу и морфологију влакана фибриноског угрушка, параметре оксидационог стреса и антиоксидационог система заштите, као и утицај реуматоидног артритиса на биохемијске, хематолошке и хемостатске параметре и све анализе упоредити са здравим испитаницима.

Материјал и методе: Код 42 пацијента са РА и 48 здравих контрола, испитивана је концентрација микропартикула проточном цитометријом при чему су праћене микропартикуле које потичу од тромбоцита, леукоцита, моноцита, ендотелне микропартикуле, микропартикуле које експримирају П-селектин и Е-селектин и ткивни фактор. Хемостаза и појава прокоагулабилног стања праћена је глобалним методама, ендогеним тромбин потенцијалом и укупним хемостатски потенцијалом. Електронском микроскопијом испитан је утицај РА на фибринску мрежу и морфологију влакана фибриноског угрушка. Редокс статус је одређиван спектрофотометријски. Комплетне биохемијске, хематолошке и хемостатске анализе су урађене у Централној лабораторији Клиничког центра Крагујевац.

Резултати: Укупна концентрација микропартикула, концентрација микропартикула које потичу од тромбоцита и П-селектина, биле су повишене код пацијената са РА у односу на здраве испитанике. Глобалне методе хемостазе указују да је коагулација снажно погођена дуготрајном инфламацијом код пацијената са РА, и менопаузом код здравих жена. Електронском микроскопијом показано је да пацијенти са реуматоидним артритисом као и здраве контроле у менопаузи имају гушћу структуру фибриноског угрушка са мањим порамма, који је мање осетљив на фибринолизу. Про-оксидациони и антиоксидациони параметри праћени у студији указују на постојање оксидационог стреса и смањење активности антиоксидационог система заштите код пацијената. Сви неспецифични параметри инфламације били су повишени код пацијената са РА.

Закључак: Микропартикуле које потичу од тромбоцита могу бити потенцијални биомаркер за РА. Параметри глобалних хемостатских метода могу бити корисни у дијагностиковању и праћењу хиперкоагулационог стања код пацијената са РА. Код пацијената са реуматоидним артритисом постоји потреба за суплементацијом антиоксидансима.

Кључне речи: реуматоидни артритис, микропартикуле, глобалне методе хемостазе, електронска микроскопија, оксидациони стрес

ABSTRACT

Introduction: Rheumatoid Arthritis (RA) is a chronic, inflammatory, autoimmune disease that causes synovitis and destructive arthritis, progressive cartilage and joints damage, deformities followed by outside of the articular manifestations, systemic disease manifestations, a strong systemic inflammatory response with rapid development of atherosclerosis, disabilities, shortened life expectancy and increased mortality.

Aim: We aimed this study, therefore, to explore the effect of RA on the microparticles expression in peripheral blood, to assess hemostatic disturbances and the occurrence of procoagulable state, to identify fibrin clot properties and the morphology of fibrin clot fibers, to determine parameters of oxidative stress and the antioxidant system as well as the impact of rheumatoid arthritis on biochemical, hematological and hemostatic parameters and to compare all the analyzes with healthy subjects.

Material and methods: In 42 patients with RA and 48 healthy controls, the following parameters were examined using appropriate methods. The concentration of microparticles was determined by flow cytometry, whereby microparticles derived from platelets, leukocytes, monocytes, endothelial microparticles, microparticles expressing P-selectin, E-selectin and a tissue factor were determined. Parameters of hemostasis and the occurrence of a procoagulable condition were followed by global hemostatic methods, endogenous thrombin potential and overall hemostasis potential. The effect of RA on the fibrin network and the morphology of fibrin clot fibers was analyzed by electron microscopy. Redox status was determined spectrophotometrically. Biochemical, haematological and hemostatic analyzes were done in the Central Laboratory of the Clinical Center Kragujevac.

Results: The total concentration of microparticles, the concentration of platelet and P-selectin derived microparticles, were elevated in patients with RA compared to healthy subjects. Global hemostatic methods indicate that coagulation is strongly affected by long-term inflammation in patients with RA, and menopause in healthy women. Electron microscopy shown that patients with RA as well as healthy control had denser fibrin structures with smaller pores which are less prone to fibrinolysis. The prooxidative and antioxidant parameters followed in the study indicate the existence of oxidative stress and decreased activity of the antioxidant system in patients. All non-specific inflammatory parameters were elevated in patients with RA.

Conclusions: Platelet-derived microparticles could be a potential biomarker for RA. Global hemostatic methods can be useful in hypercoagulation diagnosing and monitoring in patients with RA. Futhermore, in patients with rheumatoid arthritis there is a need for supplements containing antioxidants.

Key words: rheumatoid arthritis, microparticles, global hemostatic methods, electron microscopy, oxidative stress

1. УВОД	2
1.1. Аутоимуне болести	2
1.2. Реуматоидни артритис	2
1.2.1. Епидемиологија.....	3
1.2.1.1. Инциденца и преваленца	4
1.2.2. Патогенеза болести.....	4
1.2.2.1. Хормонски дисбаланс.....	4
1.2.2.2. Генетски фактори.....	6
1.2.3. Реуматоидни артритис и менопауза.....	7
1.2.4. Клиничка слика реуматоидног артритиса	7
1.2.5. Реуматоидни артритис и ризик од кардиоваскуларних болести.....	7
1.2.6. Реуматоидни артритис: терапијске могућности	8
1.3. Микропартикуле.....	10
1.3.1. Настанак микропартикула.....	11
1.3.2. Подела и врста микропартикула.....	12
1.3.3. Микропартикуле и улога у патогенези болести.....	12
1.3.4. Микропартикуле и реуматоидни артритис.....	13
1.3.5. Улога микропартикула у ендотелној дисфункцији	15
1.3.6. Микропартикуле и хемостаза. Улога у коагулацији и фибринолизи	15
1.4. Хемостазни систем.....	17
1.4.1. Коагулација	17
1.4.1.1. Тромбин	17
1.4.1.2. Фибрин	18
1.4.2. Природни антикоагуланси	19
1.4.3. Фибринолиза	19
1.4.4. Карбоксипептидаза Б ₂ (син. <i>thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI)</i> , карбоксипептидаза У, плазма карбоксипептидаза Б).....	20
1.4.5. Коагулациони систем и инфламација. Реуматоидни артритис	21
1.5. Оксидациони стрес.....	24
1.5.1. Слободни радикали.....	24
1.5.2. Антиоксидациони систем заштите.....	26
1.5.3. Улога оксидационог стреса у реуматоидном артритису.....	26
2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА.....	29
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД.....	32
3.1. Испитаници.....	32
3.1.1. Контролна група	32
3.1.2. Експериментална група.....	33

3.2. Анамнестички подаци.....	35
3.3. Методе клиничке процене активности болести	36
3.3.1. Метода процене активности реуматоидног артритиса (<i>DAS28-Disease Activity Score</i>)	36
3.3.2. Метода процене функционалног статуса пацијената са РА	37
3.4. Методе лабораторијских испитивања	38
3.4.1. Узорковање крви.....	38
3.4.2. Методе обраде узорака крви	38
3.4.2.1. Обрада узорака крви за одређивање врсте и концентрације микропартикула.....	38
3.4.2.2. Обрада узорака крви за одређивање глобалних метода хемостазе.....	38
3.4.2.3. Обрада узорка крви за одређивање параметара оксидационог стреса и параметара антиоксидативне заштите	39
3.4.3. Методе одређивање биохемијских параметара.....	39
3.4.4. Методе одређивање хематолошких параметара	42
3.4.5. Методе процене серопозитивности/серонегативности	43
3.4.6. Методе одређивање параметара хемостазе	43
3.5. Глобалне методе хемостазе	45
3.5.1. Ендогени тромбин потенцијал.....	45
3.5.2. Укупни хемостатски потенцијал	46
3.5.3. Време фибринолизе угрушка.....	48
3.5.4. Методе анализе турбидиметријских података	49
3.6. Електронска микроскопија.....	50
3.7. Методе одређивање микропартикула.....	52
3.7.1. Концентрација микропартикула.....	52
3.7.1.1. Одређивање укупне концентрације микропартикула.....	52
3.7.2. Врста микропартикула	53
3.7.3. Одређивање концентрације појединачних микропартикула	53
3.8. Методе одређивања параметара редокс статуса	55
3.8.1. Методе одређивања параметара оксидационог стреса.....	55
3.8.1.1. Одређивање индекса липидне пероксидације (TBARS)	55
3.8.1.2. Одређивање водоник пероксида (H_2O_2).....	56
3.8.1.3. Одређивање супероксид анјон радикала (O_2^-).....	58
3.8.1.4. Одређивање нитрита (NO_2^-).....	59
3.8.2. Методе одређивања параметара антиоксидативног система заштите.....	61
3.8.2.1. Одређивање каталазе (CAT).....	61
3.8.2.2. Супероксид дисмутаза (SOD)	62
3.8.2.3. Одређивање редукованог глутатиона (GSH).....	62

3.8.3. Статистичка обрада података	64
4. РЕЗУЛТАТИ.....	66
4.1. Карактеристике испитаника.....	67
4.1.1. Демографске карактеристике испитаника.....	67
4.1.1.1. Активност реуматоидног артритиса	67
4.1.2. Демографске карактеристике испитаника на основу менопаузе	69
4.1.2.1. Активност реуматоидног артритиса праћена на основу менопаузе.....	69
4.1.3. Придружене болести испитаника.....	71
4.1.4. Придружене болести испитаника на основу менопаузе	72
4.2. Лабораторијске анализе.....	73
4.2.1. Утицај реуматоидног артритиса на биохемијске параметре	73
4.2.2. Утицај менопаузе на биохемијске параметре	75
4.2.3. Утицај реуматоидног артритиса на хематолошке параметре.....	77
4.2.3.1. Крвна слика.....	77
4.2.3.2. Леукоцитарна формула.....	79
4.2.4. Утицај менопаузе на хематолошке параметре	80
4.2.4.1. Крвна слика.....	80
4.2.4.2. Леукоцитарна формула.....	82
4.2.5. Утицај реуматоидног артритиса на хематостатске параметре	83
4.2.6. Утицај менопаузе на хематостатске параметре	83
4.2.7. Параметри за одређивање серопозитивности/серонегативности.....	85
4.3. Микропартикуле – врста и концентрација микропартикула	86
4.3.1. Укупна концентрација микропартикула.....	86
4.3.2. Концентрација различитих врста микропартикула у контролној и експерименталној групи.....	88
4.3.2.1. Концентрација микропартикула које потичу од тромбоцита (CD42 ⁺) ..	88
4.3.2.2. Микропартикуле које потичу од тромбоцита (CD42 ⁺) на основу присуства/одсуства фосфатидилсерина PS ⁺ /PS ⁻	90
4.3.2.3. Концентрација микропартикуле које потичу од моноцита (CD14 ⁺).....	91
4.3.2.4. Микропартикуле које потичу од моноцита (CD14 ⁺) на основу присуства/одсуства фосфатидилсерина PS ⁺ /PS ⁻	93
4.3.2.5. Концентрација микропартикуле које потичу од леукоцита (CD45 ⁺).....	94
4.3.2.6. Микропартикуле које потичу од леукоцита (CD45 ⁺) на основу присуства/одсуства фосфатидилсерина PS ⁺ /PS ⁻	96
4.3.2.7. Концентрација микропартикуле које потичу од ткивног фактора (CD142 ⁺).....	97
4.3.2.8. Микропартикуле које потичу од ткивног фактора (CD142 ⁺) на основу присуства/одсуства фосфатидилсерина PS ⁺ /PS ⁻	99
4.3.2.9. Концентрација микропартикуле које потичу од ендотела (CD144 ⁺)... 100	

4.3.2.10. Микропартикуле које потичу од ендотела (CD144 ⁺) на основу присуства/одсуства фосфатидилсерина PS ⁺ /PS ⁻	102
4.3.2.11. П-селектин (CD62P ⁺) у контролној и експерименталној групи	103
4.3.2.12. Микропартикуле које потичу од П-селектина (CD62P ⁺) на основу присуства/одсуства фосфатидилсерина PS ⁺ /PS ⁻	105
4.3.2.13. Е-селектин (CD62E ⁺) у контролној и експерименталној групи	106
4.3.2.14. Микропартикуле које потичу од Е-селектина (CD62E ⁺) на основу присуства/одсуства фосфатидилсерина PS ⁺ /PS ⁻	108
4.4. Глобалне методе хемостазе	109
4.4.1. Утицај реуматоидног артритиса на стварање тромбина праћено ендогеним тромбин потенцијалом	109
4.4.2. Утицај менопаузе на настанак тромбина праћено ендогеним тромбин потенцијалом	111
4.4.3. Утицај реуматоидног артритиса на настанак фибрина праћено укупним хемостатским потенцијалом	112
4.4.4. Утицај менопаузе на настанак фибрина праћено укупним хемостатским потенцијалом	112
4.4.5. Типичне криве агрегације фибрина и фибринолизе.....	114
4.4.6. Утицај реуматоидног артритиса на време лизирања угрушка (<i>CLT- Clot Lysis Time</i>)	115
4.4.7. Утицај менопаузе на време лизирања угрушка (<i>CLT- Clot Lysis Time</i>)	115
4.4.8. Турбидиметрија – анализа параметара фибринског угрушка и његове структуре.....	117
4.4.9. Утицај менопаузе на параметре турбидиметрије	118
4.5. Електронска микроскопија.....	119
4.6. Редокс статус	124
4.6.1. Параметри оксидационог стреса	124
4.6.1.1. Водоник-пероксид (H ₂ O ₂)	125
4.6.1.2. Супероксид ањон радикал (O ₂ ⁻).....	126
4.6.1.3. Нитрити (NO ₂ ⁻).....	127
4.6.1.4. Индекс липидне пероксидације (TBARS)	128
4.6.2. Параметри антиоксидационе заштите	129
4.6.2.1. Каталаза (CAT).....	131
4.6.2.2. Супероксид-дисмутаза (SOD).....	132
4.6.2.3. Редуковани глутатион (GSH).....	133
4.7. Корелација	134
5. ДИСКУСИЈА.....	141
5.1. Утицај реуматоидног артритиса на микропартикуле	142
5.2. Утицај реуматоидног артритиса на хемостазу	147
5.3. Утицај реуматоидног артритиса на редокс статус жена	154

6. ЗАКЉУЧЦИ	161
7. ЛИТЕРАТУРА.....	165

I

УВОД

1. УВОД

1.1. Аутоимуне болести

Аутоимуне болести се дефинишу као низ различитих обољења од орган-специфичних до системских поремећаја (1), које настају као последица губитка имунолошке толеранције организма на властите антигене.

У аутоимуне болести спада више од 70 различитих поремећаја (2) при чему скоро 5-8% укупне светске популације развије неку аутоимуноу болест. Од наведеног броја приближно 78% су жене при чему подаци указују да су жене у 2,7 пута већем ризику за добијање аутоимуне болести у односу на мушкарце (3). Сматра се да су аутоимуне болести четврти водећи узрок инвалидитета у популацији жена (4).

Реуматоидни артритис, системски еритемски лупус, примарни Сјогренов синдром, системска склероза (склеродерма), идиопатски инфламаторни миозитис као и системски васкулитиси спадају у групу аутоимуних болести које углавном, али не и искључиво, погађају зглобове и мишиће (1).

1.2. Реуматоидни артритис

Реуматоидни артритис (РА) је хронична, инфламаторна, аутоимуна болест која узрокује синовитис и деструктивни артритис, прогресивно оштећење хрскавице и зглобова, деформитете праћене ван-зглобним, системским манифестацијама болести, снажан системски инфламаторни одговор са убрзаним развојем атеросклерозе, као и инвалидитет, скраћени животни век и повећан морталитет (5, 6, 7) (услед кардиоваскуларних, инфективних и хематолошких болести) (8) и као таква представља значајан терет како за појединца тако и за друштво (9).

Реуматоидни артритис погађа скоро 1% укупне светске популације (10) при чему је однос оболевања од реуматоидног артритиса је 6:1 у корист популације жена код млађих испитаника (8) и 2:1 у старијој животној доби између 55-64 године при чему код старијих од 75 година, овај однос се изједначава или је већа стопа оболевања у мушкој популацији. Најчешћи почетак болести је у четрдесетим годинама (4). Недавна истраживања указују на то да поред полне разлике у инциденци оболевања од реуматоидног артритиса постоји

значајна разлика у активности болести између полова, при чему је значајно већа активност болести у женској популацији у односу на мушкарце (11). Поред тога, примећено је да су жене у повећаном ризику за развој већег броја аутоимуних болести истовремено (12).

РА представља хетерогену болест са различитом клиничком сликом и патогенетским механизмима између појединаца са овом дијагнозом кроз различите стадијуме болести. Иако су аутоантитела важна карактеристика РА (серопозитивни РА) неки пацијенти немају присутна аутоантитела (серонегативни РА). РА карактерише присуство аутоантитела на имуноглобулин Г (IgG је реуматоидни фактор) и цитрулисане протеине (антитела на циклични цитрулисани пептид) при чему се вредности ових параметара прате код ових пацијената (13).

Болест је комплексна и укључује факторе околине који могу да буду окидач болести код генетски предиспонираних особа (13). Пацијенти са РА имају повећану стопу морбидитета односно високу преваленцу оболевања од кардиоваскуларних болести као и повећан ризик за развој фаталних кардиоваскуларних догађаја као што су акутни инфаркт миокарда, мождани удар и срчана инсуфицијенција (14). Уколико није лечена на адекватан начин, болест доводи до прогресивног оштећења зглобова и трајног инвалидитета (13).

1.2.1. Епидемиологија

Геоепидемиологија показује да код особа које су предиспонирани за развој аутоимуних болести, генетски фактори интерагују са начином живота и факторима околине који укључују социоекономски статус, инфективне агенсе, загађиваче животне средине као и витамин Д (у зависности од изложености сунцу) последично доводећи до развоја болести (2). Када говоримо о социо-економском статусу и утицају околине, доказано је да пушење има највећи утицај на предизпозицију за настанак болести и да је повезано са лошијом прогнозом болести (15).

Поред тога, индиректно је могуће да постоји повезаност између гојазности, резистенције на инсулин, коагулације и инфламације ослобађањем цитокина у масно ткиво, као што су фактор некрозе тумора α (*TNF α*) и интерлеукин 6 (*IL-6*), при чему имају велику улогу у свим претходно поменутиим стањима (16).

1.2.1.1. Инциденца и преваленца

Реуматоидни артритис има просечну инциденцу обољевања од 0,5 до 1% са тенденцијом смањења од севера ка југу и од урбаних до руралних подручја (17). Јужноевропске земље имају нижу преваленцу у односу на земље Северне Европе и Северне Америке. Нижа преваленца је забележена у земљама у развоју (4).

Инциденца и преваленца РА варирају у различитим популацијама. Највећа преваленца 5,3% забележена је у популација Пима Индијаца (18) и 6,8% у популацији Чипева Индијаца (19). Преваленца је 0,31% у Француској (20), 0,55% у Литванији (21), 0,56% у Турској (22), 0,8% у Великој Британији (4), што говори у прилог смањења инциденце од севера ка југу.

У Србији преваленца обољевања од РА износи 0,35 % док је однос јављања болести у женској популацији у односу на мушку 3,18:1 (23).

1.2.2. Патогенеза болести

Опште је прихваћено да су аутоимуне болести последица комплексне интеракције између генетских фактора и фактора околине међутим, механизми који су укључени у губитак толеранције су још увек нису потпуно познати (2).

У патогенезу РА укључено је неколико процеса. Дисрегулација урођеног и стеченог имунског одговора јавља се у различитим фазама болести. Телије урођеног и стеченог имунског система, солубилни медијатори, адхезиони молекули и аутоантитела доприносе развоју запаљења и структурних промена зглобова и унутрашњих органа (7).

1.2.2.1. Хормонски дисбаланс

Велики број аутоимуних болести чешће се јавља у женској популацији. Једно од могућих објашњења ове појаве је да хормонски и генетски фактори утичу на имунски систем другачије код жена и мушкараца што би могло да објасни разлику у преваленци обољевања од аутоимуних болести између полова. Ове хипотезе су донекле прихваћене с обзиром да се многе аутоимуне болести јављају или прогредирају приликом хормонских промена као што су касна адолесценција или трудноћа. Разлике у карактеристикама X

хромозома између мушкараца и жена који имају аутоимуноу болест, навела је истраживаче да мисле да је генетска подлога ове групе болести повезана и са генетским детерминантама пола. Ове хормонске промене као и генетски фактори могли би објаснити зашто су жене склоније развоју аутоимуних болести (3). Када говоримо о разликама између полова, жене имају јачи хуморални и целуларни имунски одговор у поређењу са мушкарцима и показују повишен однос CD4:CD8 због већег броја CD4 ћелија и већег нивоа циркулишућих антитела (24).

Естрогени, андрогени и пролактин су хормони који могу да утичу и на урођени и на адаптивни имунски систем и њихов дисбаланс може довести до повећање осетљивости на аутоимуне болести (25, 26). Слични хормонски дисбаланси у реуматоидном артритису показани су у многим студијама. Нивои естрогена у синовијалној течности у поређењу са андрогенима су значајно повишени и код жена и код мушкараца који имају реуматоидни артритис и имају активациони ефекат на пролиферацију макрофага и фибробласта (27).

Андрогени имају супресивни ефекат на хуморални и ћелијски имунски одговор и представљају природне анти-инфламаторне хормоне. Супротно томе, естрогени имају имуностимулаторну улогу на хуморални имунски одговор. Ниски нивои полних андрогена (тестостерона/дихидротестостерона) и надбубрежних андрогена (дихидроепиандростерона и његовог сулфата) као и нижи однос андрогена/естрогена откривени су у телесним течностима (крв, синовијална течност, брисеви, слива) код пацијената оба пола што указује на могућу улогу андрогена у патогенези ове болести (28).

Неколико физиолошких, патолошких и терапеутских стања може променити хормонски статус или периферну конверзију хормона укључујући менструални циклус, трудноћу, постпартални период, менопаузу, хронични стрес, инфламаторне цитокине као и употреба кортикостероида, оралних контрацептива, супституција стероидних хормона доводећи до промене односа андрогена и естрогена. Због тога је равнотежа између полних хормона и даље кључни фактор у регулацији имунолошких и инфламаторних одговора, а терапеутска модулација ове равнотеже треба да представља део напредних биолошких третмана за реуматоидни артритис и друге аутоимуне реуматске болести (28) (29).

У случајевима када су серумске концентрације естрогена нормалне код пацијената са реуматоидним артритисом, детектоване су ниже концентрације андрогена у серуму (тестостерона, андростендиона и дехидроепиандростерона) као и у синовијалној течности

код ових пацијената. Присуство измењеног баланса полних хормона у синовијалној течности пацијената са реуматоидним артритисом последично доводи до смањене концентрације имуносупресивних андрогена и повећане концентрације имуностимулационих естрогена што може повољно утицати на развој имунопосредованог синовитиса. Инфламаторни цитокини као што је фактор некрозе тумора – α могу значајно да стимулишу активност ароматазе у периферном ткиву и да индукују периферни метаболизам андрогена у естрогене. Управо због тога третман блокаторима фактора некрозе тумора – α утиче на нивое хормона у синовијалној течности пре него на нивое ових хормона у серуму при чему блокира конверзију андрогена (антиинфламаторних хормона) до естрогена (проинфламаторних хормона) индуковану ароматазом (30). Особе мушког пола које имају РА имају смањен ниво слободног тестостерона у серуму, што је у складу са хипотезом да андрогени анти-инфламаторни хормони имају протективни ефекат у реуматоидном артритису (31).

Генетска предиспозиција у комбинацији са епигенетским маркерима води ка каскади догађаја индукујући синовитис са последичним деструктивним артритисом при чему утиче на велики број екстра-артикуларних органа (7). Утицај фактора средине код генетски предиспонирајућих особа је од великог значаја у патогенези и развоју РА (32).

С обзиром да је реуматоидни артритис болест која има циркардијални дневни ритам (33), показано је да постоји каузална веза између дневне активности болести, хормоналног дисбаланса и секреције цитокина. Активност болести је највећа ујутру што корелира са нивом пролактина измереним у том периоду. Дисбаланс у корист проинфламаторних хормона (пролактина и цитокина) супротно од нивоа антиинфламаторних хормона може бити одговоран за дневни ритам активности болести код пацијената са активним реуматоидним артритисом (34).

1.2.2.2. Генетски фактори

Реуматоидни артритис је мултифакторијална болест која настаје као резултат интеракције генетских фактора и фактора околине. Главни генетски фактори укључени у реуматоидни артритис су *HLA-DRB1* и тирозин – фосфатазни ген *PTPN22* (15). Позитивна породична анамнеза повећава ризик за настанак РА отприлике три до пет пута (5) при

чему је овај ризик такође повећан код близанаца што указује на утицај генетских фактора у патогенези болести (35).

1.2.3. Реуматоидни артритис и менопауза

Менопауза се дефинише као изостанак менструације 12 месеци без патофизиолошког узрока. Природно се дешава око педесете године. Претходне студије указују на већу инциденцу јављања РА код жена у менопаузи. Постоје различити подаци који указују на време јављања као и активност болести у зависности од тренутка настанка РА (8). Недавна студија је показала да је рана менопауза удружена са повећаним ризиком за настанак РА у постменопаузалном периоду (36), док друга указује на то да је рана менопауза, пре 45 године, удружена са блажим током болести (37). Са друге стране, претходна истраживања показују да жене код којих се РА развије у менопаузи имају два пута већи ризик за настанак серонегативног РА као и жене код којих је наступила рана менопауза. Када је у питању постменопаузална хормонална терапија, употреба ових лекова дуже од 8 година била је удружена са повећаним ризиком за настанак серопозитивног РА (38).

1.2.4. Клиничка слика реуматоидног артритиса

Почетак РА је обично подмукао при чему се пацијенти жале на један или мањи број отечених зглобова, јутарњу укоченост инеспецифичне симптоме као што су умор и осећај налик грипу. Бол и оток зглобова у раног фази болести може бити асиметрично и не полиартикулаарно док у каснијим фазама болести прелази у симетрични полиартритис који могу да прате орган специфичне и системске манифестације (39). Због тога је неопходна брза и рана дијагностика и почетак терапије који уједно има и бољу прогнозу.

Код млађих жена примећено је погоршање болести непосредно пре менструације док је код жена у менопаузи повећана инциденца обољевања од реуматоидног артритиса што иде у прилог претходно објашњеној патогенези болести, да на развој РА утицај има промена равнотеже полних хормона (40).

1.2.5. Реуматоидни артритис и ризик од кардиоваскуларних болести

Претходна истраживања су показала да је преваленца кардиоваскуларних болести већа код пацијената са РА (41). Заједно са секундарним оштећењем зглобова као и прогресивним инвалидитетом, ризик од кардиоваскуларних болести је велики проблем (42) који представља главни узрок мрталитета код ових пацијената (43). Ризик од смрти услед кардиоваскуларних поремећаја, укључујући акутни инфаркт миокарда, цереброваскуларне инсулте и конгестивну срчану инсуфицијенцију, је 1,5 пута већи код пацијената са РА у односу на општу популацију. Недавна мета-анализа показала је да је ризик од кардиоваскуларних болести скоро 50% већи код пацијената са РА у односу на општу популацију (41).

Реуматоидни артритис као и велики број других аутоимуних болести сматра се протромботичким стањем. Претходне студије указују да аутоимуне болести, укључујући РА, представљају фактор ризика за развој кардиоваскуларних болести као и за венски тромбоемболизам, плућну тромбоемболију и дубоку венску тромбозу. Инфламација која постоји у основи РА може да повећа ризик за настанак венског и артеријског тромбоемболизма код ових пацијената (16, 44, 45).

1.2.6. Реуматоидни артритис: терапијске могућности

Лечење реуматоидног артритиса је отежено услед касне дијагнозе болести као и потешкоћа које постоје услед тежег постизања *treat-to-target* принципа терапије РА. Овај приступ је постао пожељан концепт у лечењу РА. Дефинише се као стратегија лечења у којој клиничари лече пацијенте довољно агресивно како би достигли и одржали специфичне циљеве као што су ремисија или ниска активност болести (46). Најбољи резултати се постижу уколико се терапијом започне на време, најбоље 3 месеца (највише 6), при чему може доћи до мањег оштећења и ремисије (47, 48).

У последњих 30 година број терапеутских агенаса за лечење РА значајно је порастао (39). Тренутно доступни лекови укључују нестереоидне антиинфламаторне лекове, глукокортикоиде, лекове који модификују болест (*DMARDs* – *disease-modifying anti-rheumatic drugs*) (конвенционалне као што је метотрексат или циљане као што су инхибитори јанус киназа и биолошки лекови (инхибитори интерлеукина-1 и интерлеукина-6, инхибитори фактора некрозе тумора) (39).

Сматра се да са лековима који модификују болест треба почети одмах након постављања дијагнозе са циљем ремисије или ниске активности болести. Метотрексат треба бити први избор у терапији осим уколико не постоје контраиндикације за примену. У том случају алтернативна терапија подразумева примену лефлуномида и сулфасалазина. Краткотрајна примена глукокортикоида је индикована приликом почетка примене или замене лекова који модификују болест али им треба смањити дозу или у потпуности искључити што пре је могуће. Може се размотрити и интра-артикуларна примена. Са билошким лековима се започиње када су присутни лоши прогностички фактори, присуство антитела на циклични цитрулисани пептид, реума фактор, висока активност болести и поред употребе виских доза метотрексата, ране ерозије при чему се најчешће комбинују са метотрексатом. Уколико постоји интолеранција на метотрексат, комбинација инхибитора интерлеукина-6 и циљани лекови који модификују болест могу имати предност у односу на друге биолошке лекове (50).

Недавне студије су показале да агресивна имуносупресија антагонистима фактора некрозе тумора као биолошких антиреуматских лекова који модификују болест, повезана са смањеним ризиком за настанак кардиоваскуларних болести (51). Такође, метотрексат у дози од ≥ 20 мг/недељно, циклоспорин А и биолошки лекови имају позитиван ефекат на атеросклерозу (52), услед чињенице да су акутни кардиоваскуларни догађаји углавном повезани са убрзаном атеросклерозом код пацијента са РА. Поред тога, биолошки лекови као што су инфликсимаб, цертолизумаб, адалимумаб и етарнецепт, показују побољшање ендотелне дисфункције у погледу супресије про-атеросклеротичних процеса (53).

Циљеви клиничког лечења РА укључују омогућавање брзе дијагнозе и неге и добру информисаност пацијената о употреби вишеструких третмана одобрених за лечење ове болести. Престанак пушења, контрола телесне тежине и лечење коморбидитета треба да буду део опште неге пацијената које могу утицати на терапију РА.

1.3. Микропартикуле

Ћелијска комуникација је дефинисана као група процеса који омогућавају дијалог између две или више ћелија организма као одговор на специфичне сигнале. Најједноставнија форма интерћелијске комуникације настаје услед преноса хемијских сигнала између суседних ћелија, директно преко протеинских канала између цитосола суседних ћелија или путем производње сигналних молекула који генеришу три типа комуникације: аутокрину, паракрину и ендокрину. Недавно је откривен нови механизам ћелијске комуникације који је посредован микропартикулама (54).

Општа карактеристика активираних ћелија је способност одвајања фрагмената са њихове плазма мембране. Ови фрагменти представљају хетерогену популацију малих, мембраном-обложених везикула, пречника од 0,1 до 1,0 μm које се називају микропартикуле (МП) (55) и имају важну улогу у физиолошким процесима као и у инфламацији, ангиогенези, ендотелној дисфункцији и тромбози. Прокоагулантни фосфолипиди и специфични рецептори који се налазе на површини микропартикула понашају се као гласници који повезују ове процесе (56).

Микропартикуле су првобитно сматране остацима ћелија али су данас препознате као мултифункционалне структуре које имају улогу у интрацелуларној комуникацији, транспорту компоненти молекула и индукцији ћелијских сигнала што указује на присуство микропартикула на великом броју биолошки активних молекула (57). Микропартикуле се ослобађају са мембране ћелија током процеса активације, механичког стреса или апоптозе (58). Будући да микропартикуле експримирају различите маркере на својој површини у зависности од њиховог порекла, могу се користити за проучавање ћелијских процеса и патогенезе болести (59). Неколико студија је показало присуство различитих врста нуклеинских киселина на микропартикулама. *MiRNA* која се налази на МП, омогућава интерћелијску комуникацију и комуникацију између органа при чему модификује експресију на циљаним ћелијама. *MiRNA* је присутна на МП здравих особа и показано је да има улогу у регулацији хомеостазе (60).

1.3.1. Настанак микропартикула

Механизам који доводи до настанка микропартикула није у потпуности објашњен али неколико студија указују да се настанак микропартикула одвија након хемијске и физичке апоптозе, након активације ћелија (61) или током оксидационог стреса, инфламаторних или прокоагулантних стимулуса (62). Велики број других различитих стимулуса укључен је у процес настанка МП као што су проинфламаторни цитокини (нпр. фактор некрозе тумора- α и интерлеукин- 1β), бактеријски липополисахариди, протеини комплемента (*C5b-9*), реактивне кисеоничне врсте, хипоксија, инхибитор активатора плазминогена, тромбин као и Ц-реактивни протеин (63).

Током апоптозе, настанак МП се дешава током активације протеин-киназе 1 и каспазе 3 које доводе до нарушавања структуре мембране односно бубрења, "blebbing" и последично до настанака неправилног испупчења на плазма мембрани и формирања МП. Поред тога, МП могу да настану као резултат активације ћелија различитим агонистима као што су тромбин и/или колаген (61). Активациони стимулус повећава улазак калцијума, започиње активацију калпаина, што је повезано са калцијум-зависном протеолизом цитоскелетних протеина који су неопходни за даљу процес настанка израштаја на мембрани и настанка МП. Поред тога, многи аутори су пријавили губитак асиметрије мембране као резултат експозиције фосфатидилсерина на површини ћелија на унутрашњем омотачу плазма мембране (64). Стимулус који одређује МП, регулише селективно сортирање специфичних састојака који дефинишу састав МП и биолошке информације које оне преносе. Услед тога, МП преносе различите нуклеарне, цитоплазматске састојке као и састојке мембрана оригиналне ћелије. МП експримирају низ површинских маркера који омогућавају њихову карактеризацију у односу на њихово ћелијско порекло употребом специфичних антитела (65). Антигени експримирани током активације ћелија могу бити корисне у идентификацији различитих путева ослобађања МП и разликовању патологије и оштећења која том приликом настају (62).

За разлику од апоптотичних ћелија за које је познато да настају у касним фазама апоптозе, МП се ослобађају током ране фазе апоптозе и настају када долази до промене цитоскелета ћелијске мембране и до настанка површинског израштаја. Супротно од тога, егзозоми настају када се интрацелуларне микропартикуле стапају са ћелијском

мембраном. Микропартикуле се одвајају од мембрана егзоцитозом у екстрацелуларну течност (61).

1.3.2. Подела и врста микропартикула

Постоји више врста микропартикула: тромбоцитне (*platelets-derived MPs (PMPs)*), ендотелне (*endothelium-derived MPs (EMPs)*) и леукоцитне (*leucocyte-derived MPs (LMPs)*) микропартикуле. Ендотелне микропартикуле експримирају адхезионе молекуле (као што су Е-селектин и П-селектин), који могу довести до везивања и активације леукоцита и моноцита. Поред тога, ендотелне МП могу носити велики мултимерни гликопротеин, Фон Вилебрандов фактор који стабилишу агрегацију тромбоцита (61). Међутим, микропартикуле могу ослободити све ћелије при чему оне које се најчешће налазе у крви потичу од тромбоцита, леукоцита и ендотелних ћелија а могу потицати и од гранулоцита, моноцита, лимфоцита (56, 66). Најраспрострањенији тип микропартикула у крви су микропартикуле које потичу од тромбоцита и резултат су пре свега активације тромбоцита, иако је њихово порекло од мегакариоцита такође могуће (67).

1.3.3. Микропартикуле и улога у патогенези болести

Микропартикуле поседују јаку биолошку активност и учествују у патогенези многих аутоимунних болест (68). Повишен број циркулишућих микропартикула, посебно ендотелних микропартикула, је заједничка карактеристика кардиоваскуларних болести (59).

Микропартикуле које потичу од тромбоцита су одавно идентификовани као транспортни систем за многе прокоагулантне молекуле, као што је ткивни фактор. Транспорт и испорука ових молекула може довести до тромбозе (67) а има улогу и у кардиоваскуларним болестима укључујући кардиоваскуларне поремећаје који убрзано настају код аутоимунних болести (69). Ниво циркулишућих микропартикула који потичу од тромбоцита се мења током различитих болести као што су реуматоидни артритис, системски еритемски лупус, карцином, кардиоваскуларне болести и инфекције, указујући на њихово могуће учешће у прогресији болести (70).

Због познате чињенице и везе између МП које потичу од тромбоцита и кардиоваскуларних болести (69), постоји претпоставка да повећана експресија МП може објаснити повећану смртност у овој популацији.

Поред микропартикула које потичу од тромбоцита, у крви се налази велики број микропартикула које потичу од леукоцита и које могу довести до запаљења и потенцијално до аутоимуности (6).

Познато је да су циркулишуће ендотелне МП удружене са атеротромботичким ризиком и могу да обезбеде потенцијалне предиктивне вредности за ова стања. Показано је да плазма CD144⁺ ендотелне микропартикуле могу да се користе као предиктивни фактор за будуће кардиоваскуларне догађаје код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом (71).

1.3.4. Микропартикуле и реуматоидни артритис

МП могу имати значајну у инфламацији и имуномодулацији. Значајни подаци који указују на улогу тромбоцита код упалних артритиса и аутоимуних болести, уједно указују на постојање "комуникације" између коагулационог система и система инфламације. У зависности од стадијума болести, МП могу послужити као биомаркери за груписање пацијената и евалуацију информација о активацији хемостазе, активности или прогнози болести. Ранија истраживања указују да је ниво серумских МП које потичу од тромбоцита у директној корелацији са активношћу болести (6, 72).

Након активације или смрти ћелија, повишен ниво МП се јавља у крви пацијената многих различитих болести као што су аутоимуне болести, укључујући РА. С обзиром да формирање МП настаје бубрењем ћелијске мембране оригиналне ћелије, може се претпоставити да МП у РА могу транспортовати на своју површину аутоантигене, као што су на пример цитрулисани протеини, који на овај начин доводе до формирања аутоантитела. Поред тога, веза између МП и антицитрулисаних протеинских антитела може индуковати формирање имуних комплекса који могу да доведу до настанка агрегата и преципитата у синовијама или ендотелу доприносећи инфламацији која је типична за ову патологију (61).

У овој болести, генетске, епигенетске модификације и фактори спољашње средине као што је пушење интерагују и кулминирају доводећи до продукције специфичних

аутоантитела (*antibodies to citrullinated proteins or ACPAs*), запаљења зглобова и деструкције костију. Овај процес је снажно посредован цитокинима као што су фактор некрозе тумора α (*TNF- α*), интерлеукин – 1 (*IL-1*) и интерлеукин – 6 (*IL-6*). С обзиром на повезаност цитокина и продукције МП од стране имунских ћелија (нпр. стимулацијом ТЛР – *Toll-like receptors*) и важној улози тромбоцита у имунском одговору, многи истраживачи су фокусирани на МП као важне медијаторе који локално доводе до синовитиса и системски до васкуларних сметњи (6).

Након активације, тромбоцити ослобађају проинфламаторне тромбоцитне МП, које интерагују са леукоцитима доводећи до запаљења зглобова и системске инфламације у РА (73). Микропартикуле које потичу од тромбоцита су присутне у синовијалној течности пацијената са реуматоидним артритисом као и у другим формама инфламаторног артритиса али не и у синовијалној течности пацијената који имају остеоартритис. Микропартикуле које потичу од тромбоцита представљају проинфламаторни фактор који преко *IL-1* индукује одговор цитокина. Коришћењем фармаколошког и генетског приступа, рецептор за гликопротеин VI колаген представља окидач за генерацију МП које потичу од тромбоцита у патофизиологији РА (74, 75). Гликопротеин VI је колагени рецептор за тромбоците који се везује за субендотелни колаген након руптуре атеросклеротичног плака (76). Постоји неколико механизма који указују на који начин се тромбоцити активирају и ослобађају микропартикуле у реуматоидном артритису. Тромбоцити се могу активирати преко неколико путева од којих су неки већ мета за превенцију тромбозе; стимулација рецептора тромбоксана A_2 за тромбоците (блокирана помоћу антагонисте овог рецептора *SQ 29548*), везивање за *P2Y₁₂* рецептор помоћу аденозин 5' дифосфат (инхибира га клопидогрел) и *GP1b-IX* комплекс гликопротеина на мембрани тромбоцита који се везује за Вон Вилебрандов фактор. Мишеви или људи којима недостаје гликопротеин VI су здрави, нема развоја реуматоидног артритиса због чега блокирање овог рецептора представља нови терапијски приступ (74).

У реуматоидном артритису односно реуматоидном зглобу, микропартикуле могу стимулирати синовитис преко транспорта цитокина, хемокина, комплемената и фактора ангиогенезе (73, 77). Претходна истраживања указују да су тромбоцити извор МП у синовијалној течности док су моноцити и гранулоцити извор МП у зглобовима (78).

1.3.5. Улога микропартикула у ендотелној дисфункцији

Дисфункција ендотелних ћелија јавља се као заједнички именоватељ за различите и врло распрострањене кардиоваскуларне болести. Недавно, повећан број циркулишућих прокоагулантних ендотелних микропартикула пронађен је код пацијената са акутним исхемијом миокарда, прееклампсијом и дијабетесом, што указује на то да ове микропартикуле представљају маркер дисфункције ендотелних ћелија (79). Поред тога, ендотелна дисфункција је повезана са другим васкуларним поремећајима као што су акутни коронарни синдром, коронарна артеријска болест, хипертензија, мождани удар, периферна артеријска болест (63).

У кардиоваскуларним поремећајима, ендотелни антигени CD31 и CD62E, посебно експримирани на микропартикулама током апоптотичке или цитокинске стимулације, могу бити од посебног значаја (62). МП које су настале од активираних/апоптотичких Т ћелија промовишу ангиогенезу кроз повећање адхезионих протеина и проангиогенетичких фактора у ендотелном ћелијама (79).

Када су експримиране на ћелијама, микропартикулама или циркулишу као солубилна форма, селектини који потичу од леукоцита, тромбоцита или ендотелних ћелија, имају снажан допринос иницирања настанка тромба (80) и пропагацији, пре свега преко генерисања МП. Високи ниво циркулишућих П-селектина је повезан са повећаном тромбозом и настанком запаљења зида вена, док је недостатак П-селектина и Е-селектина повезан са смањењем тромбозе. Поред тога, МП које потичу од леукоцита су повезане са настанком венског тромба. Ови подаци указују на веома важну улогу селектина у венској тромбогенези и показују да П-селектин и МП које потичу од леукоцита могу бити добри циљеви за ограничавање стварања венског тромба (80). Код пацијената са дијабетес мелитусом код којих је познато да долази до развоја убрзане атеросклерозе, пронађене су значајно повишене вредности П-селектина и Е-селектина као и микропартикула које потичу од тромбоцита (81). Поред тога, претходна истраживања указују на то да инхибиција селектина смањује формирање тромба (82).

1.3.6. Микропартикуле и хемостаза. Улога у коагулацији и фибринолизи

Микропартикуле имају важна прокоагулантна својства, која су заснована на доступности фосфатидилсерина, прокоагулантног аминокиселиног фосфолипида изложеног након

стимулације, који је неопходан за ензимске комплексе згрушавања крви као и на могућем присуству ткивног фактора, главног иницијатора каскаде коагулације (83). С обзиром на чињеницу да је ткивни фактор есенцијалан за хемостазу, повећана експресија ТФ унутар атеросклеротичног плака и повишени нивои микропартикула позитивних на ТФ промовишу тромбозу (84). Експримирање ТФ од стране ћелија зида крвних судова дуго је сматрано обавезним у артеријској тромбози. Апоптотске ћелије глатких мишића и моноцити су главни снабдевачи ткивног фактора крвним судовима – носећи ослобођене МП у крвоток, што је праћено поремећајем или ерозијом атеросклеротичног плака. (62).

Поред тога, МП експримирају друге молекуле који могу да утичу на активацију коагулације, укључујући Фон Вилебрандов фактор, који може промовисати стабилност агрегата тромбоцита као и гликопротеин П-селектин, који интерагује са ТФ и посредује везивање за тромбоците и неутрофиле (61).

Микропартикуле показују фибринолитичку и протеолитичку активност. Недавне студије су показале да МП могу да обезбеде каталитичку површину за конверзију плазминогена у плазмин експресијом активатора плазминогена типа урокиназе (*urokinase-type plasminogen activator (uPA)*) и његовог рецептора (*uPAR*), чиме обезбеђују профибринолитичку улогу. МП које настају од активираних ендотелних ћелија могу да обезбеде каталитичку површину за паракрину генерацију плазмине (85).

Стандардизација у детекцији МП као и њихова примена као прогностичког параметра могла би бити корисна у циљу стратификације ризика као и предвиђања исхода болести за различите патолошке процеса као и код пацијената који су у ризику да оболе од истих.

1.4. Хемостазни систем

Активација коагулационог система на месту повреде крвног суда доводи до стварања тромбина и конверзије фибриногена у фибрин који формира фибрински угрушак и спречава губитак крви из оштећеног крвног суда. Ако је коагулациони систем неадекватно или превише активиран депозиција фибрина може се јавити и у интактним крвним судовима, доводећи до тромбозе. Насупрот томе, фибринолитички систем има способност да разгради фибринску мрежу било да је формирана током нормалне хемостазе или у процесу тромбозе (86).

1.4.1. Коагулација

1.4.1.1. Тромбин

Главни иницијатор стварања тромбина индукованог инфламацијом је ткивни фактор. Инфламаторни медијатори као што су Ц – реактивни протеин, активација комплемента, *TNF α* и *IL-6* могу бити окидач за синтезу ткивног фактора (16). У физиолошким условима експресија ТФ је ограничена на екстраваскуларне ћелије међутим, проинфламаторни стимулуси су способни да индукују експресију ТФ на моноцитима и ендотелним ћелијама (87). ТФ повећава инфламацију повећањем интраваскуларног депозита фибрина и формирањем проинфламаторних фрагмената фибрина као и генерисањем коагулационих протеаза, укључујући фактор VIIa, фактор Xa и тромбин, који активирају рецепторе активирани протеазама (84).

Блокирање активности ткивног фактора може у потпуности да блокира активацију коагулације индуковану инфламацијом. Ткивни фактор се везује за фактор VIIa, након чега тако настали комплекс катализује конверзију фактора X до Xa, који заједно са фактором Va формира комплекс, протромбин (фактор II) који са калцијумом генерише настанак тромбина (фактор IIa). Једна од главних улога тромбина је превођење фибриногена у фибрин (88). Једном активирани тромбин додатно активира тромбоците који даље утичу на коагулацију и имају улогу у настанку микропартикула. Даљим везивањем ткивног фактора, тромбина или других активираних коагулационих протеаза за специфичне протеаза активирани рецептори на инфламаторним ћелијама могу да утичу на процес инфламације, да доведу до ослобађања инфламаторних цитокина који ће даље

последично утицати на процесе коагулације и фибринолизе (88). Генерисање тромбина је кључни процес у коагулацији који одређује степен хемостазе или тромботичког процеса (89).

1.4.1.2. Фибрин

Као што је претходно поменуто, једна од главних улога тромбина јесте превођење фибриногена у фибрин. Фибриноген је гликопротеин, величине 340kDa са различитим местима за везивање која су или изложена на самом молекулу или постају доступна након специфичних структурних промена. Коришћењем ових места за везивање, фибриноген и његови деривати могу да комуницирају са више различитих протеина у плазми и са ћелијским рецепторима при чему су те интеракције неопходне за нормалну функцију фибриногена и утичу на процесе као што је формирање фибринског угрушка или фибринолиза као и на друге процесе као што је инфламација (90).

Фибриноген садржи више домена за везивање других молекула и састоји се од два сета А α -, В β - и γ ланаца са вишеструким интер- и интра- дисулфидним мостовима. Представља молекул који има много потенцијалних места за везивање за друге молекуле, која су делимично изложена за везивање без било каквих конформација молекула фибриногена. Остала места су маскирана и постају доступна током конверзије фибриногена у фибрин. Синтетише се на добро контролисан начин како би се омогућило добијање довољне количине фибриногена за адекватну хемостазу као и повећање нивоа фибриногена као одговор на различите стимулусе. Базалне вредности фибриногена варирају при чему се сматра да је 50% варијација детерминисано генетским факторима (91).

Фибриноген и фибрин могу директно стимулирати експресију проинфламаторних цитокина (као што су фактор некрозе тумора и интерлеукин-1) на моноклеарним ћелијама и довести до продукције хемокина од стране ендотелних ћелија и фибробласта (88).

Фибриноген носи више адхезивних секвенци за препознавање леукоцитних интегрина. Када се посматра функција фибрина (фибриногена) у инфламаторним процесима, леукоцитни интегрин α M β 2 (Mac-1) је од највећег значаја. Везује се високим

афинитетом за секвенце на γ А ланцу (91). Интеракција између фибриногена и леукоцитног интегрина α M β 2 је од великог значаја за развој РА (92).

1.4.2. Природни антикоагуланси

Три главна антикоагулантна пута која регулишу коагулацију јесу антитромбин, протеин Ц-систем и инхибитор ткивног фактора (*tissue factor pathway inhibitor-TFPI*). Раније је поменуто да је ткивни фактор главни иницијатор стварања тромбина и почетка коагулације, при чему се његовим блокирањем помоћу инхибитора ткивног фактора (*TFPI*) може зауставити процес коагулације. Међутим, приликом активације коагулације изазване инфламацијом, функција сва три пута може бити смањена.

Атитромбин је главни инхибитор тромбина. Током озбиљних инфламаторних процеса, нивои антитромбина су значајно смањени услед повећане потрошње или смањеног стварања.

У физиолошким условима *протеин Ц* се активира тромбином у присуству тромбомодулина као кофактора (88). Тромбомодулин (ТМ) је молекул који је кључни активатор антикоагулантних и антифибринолитичких путева, на чију експресију утиче инфламација. Представља мембрански протеин тип 1 који се налази на ендотелним ћелијама. Након везивања за ТМ, тромбин губи прокоагулантну активност и постаје активатор система протеина Ц при чему особине тромбина од прокоагулантних постају антикоагулантне. До губика прокоагулантних својстава тромбина долази услед везивања тромбомодулина за функционално важна места тромбина при чему блокира интеракције са другим протеинима који везују тромбин (93). Показано је да различити инфламаторни цитокини као и васкуларне повреде смањују експресију ТМ на ендотелним ћелијама што доводи до повећања укупног прокоагулантног ефекта (91). Везивање тромбомодулина не само да доводи до приближно 100 пута веће активације протеина Ц, већ и блокира конверзију фибриногена у фибрин посредовану тромбином и инхибира везивање тромбина за ћелијске рецепторе на тромбоцитима и инфламаторним ћелијама и на тај начин показује значајну антиинфламаторну активност (88).

1.4.3. Фибринолиза

Акутни фибринолитички одговор на инфламацију јесте ослобађање активатора плазминогена, ткивног активатора плазминогена (*tissue-type plasminogen activator (t-PA)*) и урокиназног активатора плазминогена (*urokinase-type plasminogen activator (u-PA)*) са места у ендотелним ћелијама у којима се складиште (88).

1.4.4. Карбоксипептидаза Б₂ (син. *thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI)*, карбоксипептидаза У, плазма карбоксипептидаза Б)

Комплекс тромбина и ТМ резултује убрзаном активацијом инхибитора фибринолизе (*thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI)*) (94). Активација коагулационог система доводи до формирања тромбина и истовремено, активацијом *TAFI*, доводи до заштите формираног угрушка од преурањене фибринолизе. Постало је познато да *TAFI* систем представља везу између коагулационе и фибринолитичке каскаде и омогућава синхронизацију ова два система (95). *TAFI*, познат још и као карбоксипептидаза Б (*Thrombin-activatable plasma carboxypeptidase B (CPB)*), настаје у јетри као зимоген (*proCPB*) и такође је детектована у тромбоцитима (96). Поред тога, мегакариоцити могу синтетисати *TAFI* због чега, као што је претходно поменуто, може бити присутан интрацелуларно у тромбоцитима у концентрацији око $50 \text{ ng} / 1 \times 10^9$ тромбоцита (97). Активација карбоксипептидазе Б се дешава током тромботичких догађаја, уклањањем такозваног активационог пептида на *N*-крају *proCPB*. Иако тромбин и плазмин могу да активирају *proCPB in vitro* цепањем активационог пептида, кофактор тромбина тромбомодулин убрзава активацију карбоксипептидазе Б приближно 1000 пута формирањем тромбин/тромбомодулин комплекса, који се сматра физиолошким активатором *proCPB* (96). Уклањањем *C*- краја резидуе лизина, изложеноу на делимично разграђеном фибрину, карбоксипептидаза Б смањује везивање плазминогена и ткивног активатора плазминогена за фибрин, сузбијајући везивање фибринолитичког ензима плазмина (98). Наколико проинфламаторних медијатора као што су *C5a*, остеопонтин и брадикинин су препознати као супстрати карбоксипептидазе Б *in vitro*. Цепањем фибринског лизина и спречавањем фибринолизе, карбоксипептидаза Б може имати прокоагулантну и проинфламаторну улогу. Смањењем активности проинфламаторних медијатора, *C5a*, остеопонтина и брадикинина, карбоксипептидаза Б може имати антиинфламаторну улогу (96).

Показано је да концентрација *TAFI* може да корелира са концентрацијом реактаната акутне фазе као што је Ц-реактивни протеин, указујући да експресија гена *TAFI* може бити под утицајем инфламаторних стимулуса као што су цитокини и глукокортикоидни хормони (94). Велики број студија указује на улогу *TAFI* у инфламацији и активацији ћелија али нема података о могућој улози у стварању микропартикула (99).

1.4.5. Коагулациони систем и инфламација. Реуматоидни артритис

Претходна истраживања указују да коагулациони и урођени имунски систем имају заједничко еволуционо порекло што објашњава интезивну повезаност између инфламаторних цитокина и фактора коагулације при чему су многе компоненте важне за оба система (16).

Инфламација и коагулација представљају повезане процесе који могу значајно утицати један на други. Ова интеракција се јавља на више нивоа као што су активација тромбоцита, формирање фибрина као и на нивоу физиолошких антикоагулационих путева. Инфламација мења тромботички одговор повећавајући прокоагулансе и смањујући антикоагулансе и фибринолизу. Међутим, *инфламација не само да доводи до активације коагулације, већ и коагулација значајно утиче на активацију инфламације*. Активација коагулације и депозиција фибрина, као последица инфламације, може се сматрати суштинским делом одбране домаћина против, на пример, инфективних агенаса како би се зауставила даља инвазија агенса и последични инфламаторни одговор ограничио на одређено подручје. Међутим, претерани или недовољно контролисани одговор, може довести до ситуације у којој коагулација и тромбоза доприносе болести као што је формирање тромба на руптурираном атеросклеротичном плаку уз присуство великог броја инфламаторних ћелија. Овакво стање доводи до акутних артеријских тромботичних догађаја, акутног инфаркта миокарда или нестабилне ангине пекторис (88).

Фактори коагулације као што је тромбин или антикоагулантни протеини као што је активирани протеин Ц, могу активирати специфичне ћелијске рецепторе на моноклеарним или ендотелним ћелијама што може утицати на продукцију цитокина или на апоптозу инфламаторних ћелија (88). Инфламаторни цитокини доводе до различитих протромботичких стања као што су ендотелна дисфункција, експресија

ткивног фактора и активација коагулације, инхибиција фибринолизе и протеина Ц. Други важни медијатори који доводе до хиперкоагулабилности узроковане инфламацијом су микропартикуле, тромбоцити, неутрофили, тромбин и фибриноген, $\alpha 1$ – антитрипсин, фактор XII и каликреин – кинин систем (100).

Тромбоцити имају важну улогу у патогенези тромбозе изазване инфламацијом, посебно у стањима акутне артеријске тромбозе, или руптуре атеросклеротског плака као што је код акутног коронарног синдрома. Ерозијом интима крвог суда и изложеношћу субендотелног колагена долази до адхезије тромбоцита и активације. Тромбоцити могу бити активирани директно преко проинфламаторних медијатора. Формирањем тромбина долази до активације других тромбоцита и процес се наставља. Поред овога, активација тромбоцита може убрзати формирање фибрина и другим механизмима. Експресија П-селектина на мембрани тромбоцита не само да доводи до везивања тромбоцита за леукоците и ендотелне ћелије већ и повећава експресију ткивног фактора на моноцитима (88).

Хронична системска инфламација у РА мења хемостатске механизме у корист тромбозе, активацијом коагулационог система, инхибицијом фибринолизе и смањењем физиолошких антикоагулационих путева (100). Као што је раније поменуто, инфламација и коагулација су повезани процеси при чему се интеракција између ова два система одвија на неколико нивоа, као што су активација тромбоцита, стварање фибрина као и као и на нивоу физиолошких антикоагулационих путева тј. инфламација мења тромботички одговор повећавајући прокоагуланте и смањујући антикоагулансе (88). Тако, присуство протромботичких стања делују синергистички са традиционалним факторима ризика и доприносе повећаном кардиоваскуларном ризику (15). Ово је од посебног значаја, знајући са се РА чешће јавља код жена и то код жена у репродуктивној доби (3). Међутим, повезаност са традиционалним факторима ризика за настанак кардиоваскуларних болести не објашњава у потпуности прерану атеросклерозу код пацијената оболелих од реуматоидног артритиса (14, 16).

На основу свега наведеног постоје јасни докази да су коагулација и инфламација уско повезани процеси који значајно могу да утичу један на други. Веза између ових система постоји на нивоу активације тромбоцита, настанку фибрина као и на нивоу физиолошких антикоагулантних путева.

1.5. Оксидациони стрес

Два ентитета која учествују у патофизиологији готово свих болести јесу оксидациони стрес и инфламација. У хомеостатским и физиолошким условима, реактивне кисеоничне врсте у малим количинама имају улогу у ћелијској и митохондријалној сигнализацији и функционалности. Међутим, уколико дође до пораста концентрација, реактивне кисеоничне врсте могу посредовати оштећењу ћелија и ткива које последично доводи до запаљења и оксидационог стреса (101). Оксидациони стрес је динамичан феномен који представља неравнотежу између прооксидационих и антиоксидационих параметара у корист прооксиданата и у патогенезу болести укључен је на сложен начин (102).

1.5.1. Слободни радикали

Реактивне врсте представљају хетерогену групу која се састоји од слободних радикала и нерадикала.

Хемијска једињења као што су водоник пероксид (H_2O_2) и пероксинитит јон ($ONOO^-$), представљају нерадикалске компоненте, немају неспарене електроне али се понашају као слободни радикали и помажу реакције слободних радикала (103).

Слободни радикали су молекули, атоми или јони, који садрже један или више неспарених електрона и као такви су способни за самостално постојање. Најједноставнији слободни радикал је атом водоника с обзиром на чињеницу да има само један електрон и као такав мора бити неспарен. Хомолитичка фисија је један од начина настанка слободних радикала, при чему слободни радикали настају додатком једног електрона нерадикалу, нпр. када дође до раскидања ковалентне везе и по један електрон из ковалентне везе остаје на сваком атому. Пример хомолитичке фисије је када цепањем молекула воде настаје водородни радикал (H^\bullet) и хидроксил радикал (OH^\bullet) (104).

Слободни радикали могу настати на више начина:

1. *Ендогено*: физиолошки, као нуспроизвод митохондријалног транспортног ланца током ћелијског дисања, услед инфламаторних процеса, исхемије/реперфузије и хроничних болести као што су карцином, атеросклероза;

2. *Егзогено*: Излагањем спољашњим загађењима, УВ зрачењу, употребом цигарета, метаболизмом ксенобиотика.

Слободни радикали се деле у више категорија у зависности од тога који атом је у центру: реактивне врсте кисеоника (*reactive oxygen species (ROS)*); реактивне врсте азота (*reactive nitrogen species (RNS)*); реактивне врсте угљеника (*reactive carbon species (RCS)*) и реактивне врсте сумпора (*reactive sulfur species (RSS)*) (Табела 1). (103)

Табела 1. Слободни радикали, врсте и подела

Реактивне врсте кисеоника - ROS	Радикалски облици	Нерадикалски облици
	Супероксид ањон радикал - $O_2^{\cdot-}$	Водоник пероксид – H_2O_2
	Хидроксил радикал – OH^{\cdot}	Хипохлорна киселина – $HOCl$
	Пероксил радикал – ROO^{\cdot}	Озон – O_3
	Алкоксил радикал – RO^{\cdot}	Синглет кисеоник – 1O_2
	Хидропероксил радикал – HOO^{\cdot}	
Реактивне врсте азота - RNS	Радикалски облици	Нерадикалски облици
	Азот-моноксид радикал – NO^{\cdot}	Азот-диоксид ањон – NO_2^-
	Азот-диоксид радикал – NO_2^{\cdot}	Азот-триоксид – N_2O_3
		Нитронијум јон – NO_2^+
		Пероксинитрит ањон – $OONO^-$
		Алkil пероксинитрит – $ROONO$
		Нитроксил ањон – NO^-
		Нитроксил ањон – NO^+
		Нитрил хлорид - NO_2Cl
Реактивне врсте угљеника - RCS	Алkil радикал – R^{\cdot}	
	Алкоксил радикал – RO^{\cdot}	
	Пероксил радикал - ROO^{\cdot}	
Реактивне врсте сумпора - RSS	Тиол радикал – RS^{\cdot}	
	Глутатион радикал – GS^{\cdot}	
	Диглутатион-дисулфид радикал – $GSSG^{\cdot-}$	ањон

1.5.2. Антиоксидациони систем заштите

Основна улога антиоксидационог система заштите се оглада у заштити организма од штетних утицаја оксидационог стреса до којег далази услед повећане концентрације прооксиданата. Антиоксидациони систем заштите се са састоји из 3 нивоа:

- 1) *Примарни*: чине га ензими који разграђују слободне радикале: каталаза (CAT), супероксид дисмутаза (SOD), глутатион-пероксидаза (GPx), глутатион редуктаза (GR) и неензимске компоненте као што су глутатион (GSH), аскорбинска киселина, β -каротен, α -токоферол (103, 105, 106);
- 2) *Секундарни*: обухвата специфичне оксидоредуктазе као што су тиолне-трансферазе, протеин-АДП-рибозилтрансферазе, АТР и Ca_2^+ независне трансферазе, пигменте (као што је мелатонин) и неке стабилне липидне молекуле (ЛДЛ) (103);
- 3) *Терцијарни*: обухвата протеине који везују прелазне метале (церулоплазмин који везује бакар као и апоферитин који везује гвожђе) (103, 105).

1.5.3. Улога оксидационог стреса у реуматоидном артритису

У последњих неколико година, примећено је да су оксидациони стрес и смањена антиоксидативна заштита главне карактеристике пацијената оболелих од реуматоидног артритиса (102). Као одговор на запаљење у РА, прекомерна продукција реактивних кисеоничних врста се обично генерише из ендогеног извора као што је митохондријални ланац транспорта електрона, процесом оксидативне фосфорилације. Кисеоничне врсте у РА имају различито порекло и могу настати активирањем макрофага у синовијалној мембрани, хондроцитима, али и путем активираних неутрофила у синовијалној шупљини (107). Реакција производње реактивних кисеоничних врста праћена је повећаном регулацијом различитих ензима као што су *NADPH* оксидаза, *NO* синтаза као и ксантин оксидаза (108). Након тога, комплекс *NADPH* оксидазе катализира редукцију кисеоника до супероксид анјон радикала. Осим уколико концентрација ове реактивне кисеоничне врсте није неутралисана супероксид дисмутазом, она последично доводи до смртоносне комбинације са азот-моноксидом, синтезе токсичног пероксинитрита. Компоненте хрскавице и екстрацелуларног матрикса оштећене су или директно или индиректно супероксидним анјон радикалом, заједно са другим кисеоничним и азотним врстама, смањујући синтезу компоненти матрикса као што су колаген и протеоглигани (109). Осим

тога, H_2O_2 -зависна инхибиција синтезе протеогликана доприноси оштећењу хрскавице у РА услед интеракције са механизмима обнављања протеолитичких и оксидативних оштећења (110).

Повећане вредности реактивних кисеоничних врста потенцијално су штетне за различите макромолекуле и могу довести до погоршања физиолошких процеса и оштећења ћелијских мембрана, липида, протеина и нуклеинских киселина. Ово доводи до брзог протоновања - смањења $-SH$ група, деаминације ДНК база и липидне пероксидације (111). Поред тога, пероксидација липида укључена је у патогенезу многих болести као што су карцином, дегенеративне болести као и инфламаторне болести. Може се мерити као реактивна тиобарбитурна киселина (TBARS) и може играти важну улогу у свим наведеним процесима (112). Повећана пероксидација липида пријављена је у различитим биолошким узорцима болесника са реуматоидним артритисом (113). Поред тога, није изненађујуће да је смањена биорасположивост азот-моноксида и смањена активност ендотелне азот-моноксид синтазе, удружена са продукцијом реактивних кисеоничних врста, што представља добро познати механизам који доводи до ендотелне дисфункције (63).

Људски организам је развио систем антиоксидативне заштите у циљу превенције ефеката прооксиданата и заштите ћелија од оксидативног оштећења. Ензими укључени у неутрализацију и елиминацију реактивних кисеоничних врста су супероксид дисмутаза (SOD), глутатион-пероксидаза (GSH-Px) и каталаза (CAT) као и глутатион редуктаза (GR), глутатион-С-трансфераза (GST), тиоредоксин редуктаза (TR) и хем оксигеназа (109). Каталаза и редуковани глутатион имају афинитет за H_2O_2 . Афинитет каталазе расте услед повећаних вредности H_2O_2 (114) док супероксид дисмутаза има главни ефекат у неутрализацији супероксид анјон радикала (109).

На основу свега наведеног, можемо рећи да је реуматоидни артритис комплексна болест која у својој патогенези има укључен велики број различитих механизма. Наш циљ је да испитамо у каквом односу и на који начин су концентрација микропартикула, хемостаза и оксидациони стрес повезани у РА. Поред тога, поставља се питање да ли и на који начин можемо пратити активност болести поред метода које су данас у клиничкој примени.

II

ЦИЉ

ИСТРАЖИВАЊА

2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

На основу претходно изнетих података и резултата истраживања већег броја аутора, постављени су следећи циљеви овог истраживања:

Општи циљеви:

1. Испитати утицај реуматоидног артритиса на концентрацију микропартикула (микропартикуле које потичу од тромбоцита, леукоцита, моноцита, ендотелне микропартикуле, микропартикуле које експримирају П-селектин и Е-селектин и ткивни фактор) и упоредити ове вредности са здравим испитаницима.
2. Испитати утицај реуматоидног артритиса на активирање хемостазе и појаву прокоагулационог стања у овој популацији и упоредити са здравим испитаницима, односно испитати утицај реуматоидног артритиса на глобалне методе хемостазе (ендогени тромбин потенцијал (*ETP – Endogenous thrombin potential*) и укупни хемостатски потенцијал (*OHP – Overall Hemostasis Potential*) у наведеним популацијама.
3. Електронском микроскопијом испитати утицај реуматоидног артритиса на фибринску мрежу и морфологију влакана фибринског угрушка.
4. Испитати утицај реуматоидног артритиса на параметре оксидационог стреса (липидних пероксида (TBARS), азот монооксида - NO (мерен у облику нитрита), супероксид анјон радикала (O_2^-), и водоник пероксида (H_2O_2)) и упоредити са здравим контролама.
5. Испитати утицај реуматоидног артритиса на параметре антиоксидационог система заштите (редуковани глутатион (GSH), супероксид дисмутаза (SOD), каталаза (CAT)) и упоредити са здравим испитаницима.
6. Испитати утицај реуматоидног артритиса на биохемијске, хематолошке и хемостатске параметре и упоредити са здравим испитаницима.

Специфични циљеви:

1. Испитати утицај менопаузе на активацију коагулације код здравих испитаника и оболелих од реуматоидног артритиса.
2. Испитати утицај менопаузе на параметре оксидационог стреса код здравих испитаника и оболелих од реуматоидног артритиса.
3. Испитати утицај менопаузе на параметре антиоксидационог система заштите.
4. Испитати утицај менопаузе на биохемијске, хематолошке и хемостатске параметре

ХИПОТЕЗЕ

1. Пацијенти оболели од реуматоидног артритиса имају већу концентрацију микропартикула у крви у односу на здраве испитанике.
2. Реуматоидни артритис значајно утиче на активирање хемостазе и појаву прокоагулационог стања, које се може пратити глобалним методама хемостазе.
3. Реуматоидни артритис доводи до хиперкоагулационог стања код жена пре менопаузе с обзиром да код здравих жена менопауза доводи до активације хемостазе.
4. Реуматоидни артритис неповољно утиче на фибринску мрежу и морфологију влакана фибриноског утруска.
5. Реуматоидни артритис, као инфламаторна болест, независно од старости доводи до активације коагулације код жена.
6. Реуматоидни артритис значајно утиче на редокс статус.
7. Реуматоидни артритис значајно утиче биохемијске, хематолошке и хемостатске параметре.

III

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД

3.1. Испитаници

Истраживање је спроведено у Клиничком центру Крагујевац на Клиници за Интерну медицину, одељење за реуматологију. У истраживање је укључено 90 испитаника који су подељени у две групе:

1. Контролна група – здрави испитаници ($n = 42$)
 - a. Контролна група < 50 година (пременопауза) ($n=14$)
 - b. Контролна група > 50 година (менопауза) ($n=34$)
2. Експериментална група – пацијенти са дијагностикованим реуматоидним артритисом ($n = 48$)
 - a. Експериментална група < 50 година (пременопауза) ($n=11$)
 - b. Експериментална група > 50 година (менопауза) ($n=31$).

Сви учесници истраживања су пре укључења у студију потписали писмени пристанак. Истраживање је одобрено од стране Етичког одбора Клиничког центра Крагујевац (одлука бр.: 01/17-3278).

3.1.1. Контролна група

Критеријуми за укључивање/искључивање из студије су следећи:

а. Критеријуми за укључивање:

- особе женског пола;
- старости између 40 и 65 година;
- особе које су у могућности и вољне да дају писани информисани пристанак и да поштују све захтеве протокола.

б. Критеријуми за искључивање:

- акутна или хронична инфекција;
- претходне хоспитализације због цереброваскуларних, кардиоваскуларних поремећаја и венског тромбоемболизма у претходних годину дана;
- трансфузија крви и крвних деривата;

- дијабетес (било који тип);
- карцином било које локализације и стадијума;
- инсуфицијенција јетре;
- инсуфицијенција бубрега;
- историја реуматоидног артритиса, запаљенске болести зглобова или тренутно постојећа запаљенска болест зглобова изузев РА или други системски аутоимуни поремећај;
- употреба следећих лекова: антикоагуланаса и/или кортикостероида, антиромбоцитних лекова (ацетилсалицилна киселина), нестереоидних антиинфламаторних лекова или инхибитора преузимања серотонина у временском периоду краћем од 3 дана пре вађења крви због могућег утицаја на ниво микропартикула.

Следећи критеријуми за искључивање засновани су на лабораторијским анализама:

- креатинин: више од 1,5 пута изнад горње границе нормалних вредности;
- аланинаминотрансфераза (АЛТ) или аспартатаминотрансфераза (АСТ): више од 1,5 пута изнад горње границе нормалних вредности;
- број тромбоцита мањи од $100 \times 10^9/l$.

3.1.2. Експериментална група

а. Критеријуми за укључивање:

- особе женског пола којима је дијагностикован реуматоидни артритис пре више од 5 година;
- старости између 40 и 65 година година;
- особе које су у могућности и вољне да дају писани информисани пристанак и да поштују све захтеве протокола;
- имају постављену дијагнозу РА који је наступио у одраслом добу како је дефинисано критеријумима класификације за РА Америчког колеџа за реуматологију (АЦР)/Европске лиге против реуматизма (ЕУЛАР) из 2010. године (115)
- имају средњу активност болести на основу индекса активности болести *DAS28 (Disease Activity Score-28)*. Средња активност болести се дефинише као вредност *DAS28* већа од 2,6 а мања од 5,1;

- примале су метотрексат током најмање 12 недеља непосредно пре узимања крви, од чега је потребно да су најмање 8 недеља пре рандомизације примали стабилну дозу између 15 и 25 мг недељно;
- примају терапију са адекватном и стабилном дозом фолне киселине (не мање од 5 мг недељно);
- у својој терапију имају стабилну дозу од ≤ 10 мг дневно преднизона током 6 недеља;
- нису користили нестероидне антиинфламаторне лекове 3 дана пре вађења крви (више од 5 времена полуелиминације).

б. Критеријуми за искључивање:

- употреба кортикостероида у дози ≥ 10 mg дневно;
- акутна или хронична инфекција;
- претходне хоспитализације због цереброваскуларних, кардиоваскуларних поремећаја и венског тромбоемболизма у претходних годину дана;
- трансфузија крви и крвних деривата;
- дијабетес (било који тип);
- карцином било које локализације и стадијума;
- инсуфицијенција јетре;
- инсуфицијенција бубрега;
- историја запаљенске болести зглобова или тренутно постојећа запаљенска болест зглобова изузев РА или други системски аутоимуни поремећај;
- употреба следећих лекова: антикоагуланаса, антиромбоцитних лекова (ацетилсалицилна киселина), нестероидних антиинфламаторних лекова или инхибитора преузимања серотонина у временском периоду краћем од 3 дана пре вађења крви због могућег утицаја на ниво микропартикула.

Следећи критеријуми за искључивање засновани су на лабораторијским анализама:

- креатинин: више од 1,5 пута изнад горње границе нормалних вредности;
- аланинаминотрансфераза (АЛТ) или аспартатаминотрансфераза (АСТ): више од 1,5 пута изнад горње границе нормалних вредности;
- број тромбоцита мањи од $100 \times 10^9/l$.

3.2. Анамнестички подаци

Након верификације присуства/одсуства реуматоидног артритиса а пре узимања узорка крви, забележени су анамнестички подаци о сваком учеснику истраживања. Том приликом, од пацијената су узети подаци о пушењу, менопаузи, медицинска историја и медикаментозна терапија. Сва питања која су постављена пацијентима наведена су у табели (Табела 2).

Табела 2. Анамнестички подаци узети приликом узорковања крви.

1.	Име и презиме
2.	Година рођења
3.	Висина и тежина
4.	Да ли болујете од нечега, колико дуго?
5.	Терапија за наведена обољења
6.	Да ли сте у последња 3 дана користили лекове које иначе не користите у својој терапији?
7.	Да ли сте имали неку операцију и када (навести претходне хоспитализације)
8.	Да ли сте имали инфаркт, мождани удар или тромбофлебитис?
9.	Да ли имате поремећај функције јетре или бубрега?
10.	Подаци о менопаузи (Да ли имате поремећај циклуса Да ли сте у менопаузи? Колико дуго?)
11.	Да ли сте пушач? ДА- колико дуго? НЕ Бивши пушач: Уколико сте бивши пушач, колико дуго не конзумирате цигарете?

За пацијенткиње са РА додатна питања су била:

Табела 3. Додатни анамнестички подаци за пацијенте са РА.

1.	Када Вам је дијагностикован РА?
2.	Терапија за РА? Колико дуго сте на наведеној терапији?
3.	Одређивање DAS28
4.	HAQ – DI упитник
5.	pVAS – визуелно-аналогна скала

3.3. Методе клиничке процене активности болести

3.3.1. Метода процене активности реуматоидног артритиса (DAS28-Disease Activity Score)

Клиничка процена активности болести спроведена је коришћењем DAS28, док је функционални статус праћен HAQ (*Health Assessment Questionnaire*) валидираним упитником.

1. DAS28 – Златни стандард за процену активности болести је одређивање индекса активности болести DAS28 који укључује број отечених, број болних зглобова, опште здравље пацијената исказано визуално-аналогном скалом на 100mm и седиментацију и DAS28CRP који уместо седиментације укључује Ц-реактивни протеин. Процена скорa активности болести на основу овог параметра, заснована је на лабораторијском резултату седиментације, при чему се за процену активности болести овом методом, прегледају и следећи зглобови: ручни зглобови, лактови, рамена, матакарпофалангеални, проксимални интерфалангеални зглобови и интерфалангеални зглобови палца шака, а у обзир се узима и pVAS – визуелно-аналогна скала (болесникова свеукупна процена болести).

$$\text{DAS 28-SE} = 0,56 \times \sqrt{(\text{ББ328})} + 0,28 \times \sqrt{(\text{БО328})} + 0,70 \times \log(\text{SE}) + 0,014 \times (\text{pVAS})$$

$$\text{DAS28-CRP} = 0.56 \times (\text{ББ328}) + 0.28 \times (\text{БО3-28}) + 0.36 \times \ln(\text{CRP} + 1) + 0.96 + 0.14 \times \text{VAS}$$

2. Број болних зглобова (ББЗ) - налаз укупног броја болних зглобова утврђеним лекарским прегледом, од укупно 28 зглобова који се прате.
3. Број отечених зглобова (БОЗ) - налаз укупног броја отечених зглобова утврђеним лекарским прегледом, од укупно 28 зглобова који се прате.

4. Пацијентова свеукупна процена болести – визуелно-аналогна скала (pVAS) – представља пацијентову процену утицаја РА на његово свеукупно стање, одговарајући на питање: ”Узимајући у обзир свеобухватни утицај РА на Вас, како се осећате данас?”. Оцена је на скали од 0-100mm, при чему вредност 0mm значи веома добро док 100mm значи веома лоше (116, 117, 118).

Табела 4. Процена активности болести на основу вредности DAS28 (119).

Вредности DAS28	Активност РА
< 2,6	ремисија
≤ 3,2	ниска
> 3,2 и < 5,1	умерена
> 5,1	висока

3.3.2. Метода процене функционалног статуса пацијената са РА

HAQ – DI (*Health Assessment Questionnaire*) – пацијент самостално одговара на писани упитник за процену функционалног статуса, у обављању активности свакодневног живота, преведен на српски језик. Садржи скуп питања која служе за процену функционалног статуса пацијента и за процену додатне помоћи која им је потребна да заврше неки задатак. Упитник се састоји из 20 питања, у 8 одељака, уз део о евентуалном коришћењу ортопедских помагала и помоћи других особа. Одељци се односе на питања у вези облачења, устајања, храњења, ходања, хигијене, дохватања, стезања, као и обављања свакодневних активности.

За сваку од ових категорија, пацијенту је понуђено да одговори са колико тешкоћа их обавља, од 0-3 (0-без тешкоћа, 3-са много тешкоћа). За валидну процену функционалног статуса потребно је да се одговори минимално на 6/8 одељака. Збир појединачних оцена, подељен са 20, уз подешавање према евентуалној употреби ортопедског помагала, даје HAQ – DI збир. Мањи збир означава бољи функционални статус (120).

3.4. Методе лабораторијских испитивања

3.4.1. Узорковање крви

Узорковање крви спроведено је на Клиници за Интерну медицину, одељење за реуматологију у Клиничком центру Крагујевац. Крв је узоркована након потврде присуства односно одсуства свих укључујућих/искључујућих критеријума, ујутру, између 8 и 10 сати а најмање 10 сати након узимања хране, у обе групе. За узорковање крви коришћен је вакутајнер систем за узимање венске крви (*BD Vacutainer Blood Collection System*) и игла 21G.

3.4.2. Методе обраде узорака крви

3.4.2.1. *Обрада узорака крви за одређивање врсте и концентрације микропартикула*

За одређивање концентрације микропартикула крв је узоркована коришћењем вакутајнера са цитратним пуфером (3,2% натријум-цитрат; 109 mmol/L). Након узимања крви, узорци су остављени на собној температури највише сат времена, након чега су центрифугирани на 2000 g 15 минута на собној температури, у циљу издвајања плазме сиромашне тромбоцитима. Издвојена плазма је аликвотирана (500µl) и замрзнута на -80°C до почетка извођења експеримената. Пре почетка експеримената, узорак је отопљен у воденом купатилу на 37°C 5 минута, затим центрифугиран на 2000 g 20 минута након чега је издвојени супернатант рецентрифугиран на 13000 g 2 минута. Супернатант добијен након другог центрифугирања, коришћен је за наставак анализе.

3.4.2.2. *Обрада узорака крви за одређивање глобалних метода хемостазе*

За одређивање глобалних метода хемостазе, ендогеног тромбин потенцијала (*ETP – Endogenous thrombin potential*), укупног хемостатског потенцијала (*OHP – Overall Haemostasis Potential*), укупног коагулационог потенцијала (*OCP – Overall Coagulation Potential*) и укупног потенцијала фибринолизе (*OFP – Overall Fibrinolysis Potential*), приликом узорковања крви, користили смо вакутајнер са цитратним пуфером (3,2% натријум-цитрат; 109 mmol/L). Након узимања крви, узорци су остављени на собној температури највише сат времена, након чега су центрифугирани на 2000 g 15 минута на

собној температури, плазма је издвојена и аликвотирана (500 μ l) а затим замрзнути на – 80°C до почетка експеримента.

Одређивање врсте и концентрације микропартикула као и глобалних метода хемостазе спроведено је на Каролинска Институту у Стокхолму, Шведска.

3.4.2.3. Обрада узорка крви за одређивање параметара оксидационог стреса и параметара антиоксидативне заштите

Параметри оксидационог стреса и антиоксидативне заштите одређивани су спектрофотометријски из плазме и еритроцита. За узорковање крви коришћен је вакутајнер са цитратним пуфером (3,2% натријум-цитрат; 109 mmol/L). Након узорковања, крв је центрифугирана на 3000 rpm 10 минута, издвојена је плазма, након чега је спроведено испирање еритроцита на следећи начин. У односу 1:3 додаје се хладан физиолошки раствор и рецентрифугира под истим условима 3 пута. Након трећег пута, одстрани се супернатант, издвоји се 1ml еритроцита и дода 3ml хладне дестиловане воде. Тако одвојена плазма и еритроцити чувани су на температури од –20°C до почетка извођења експеримента.

Параметри оксидационог стреса и антиоксидативне заштите одређивани су на Институту за кардиоваскуларну физиологију, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу.

3.4.3. Методе одређивање биохемијских параметара

Приликом узорковања крви испитаницима је узета крв за извођење биохемијских анализа. Коришћен је вакутајнер који не садржи пуфер и игла 21G. Биохемијске анализе за све учеснике истраживања одређиване су у Централној лабораторији Клиничког центра у Крагујевцу. У табели су наведени сви одређивани биохемијски параметри (Табела 5).

Табела 5. Биохемијски параметри и методе одређивања.

Параметар	Метода и апарат за анализу
Седиментација (mm/h)	<i>Westergren</i> метода, Vacuette ESR analyzer
Ц-реактивни протеин (mg/L)	Турбидиметријска метода, Beckman Coulter AU680 analyzer
Глукоза (mmol/L)	Хексокиназни метод, биохемијски анализатор Beckman Coulter AU680
Уреа (mmol/L)	Ензимски метод, биохемијски анализатор Beckman Coulter AU680
Креатинин (umol/L)	Модификована <i>Jaffe</i> метода, биохемијски анализатор Beckman Coulter AU680
Мокраћна киселина (umol/L)	Модификована <i>Fossati</i> метода, биохемијски анализатор Beckman Coulter AU680
Укупни билирубин (umol/L)	Модификација класичне диазо методе, биохемијски анализатор Beckman Coulter AU680
Директни билирубин (umol/L)	Варијанта класичне методе <i>Van den Bergh</i> и <i>Mueller</i> , биохемијски анализатор Beckman Coulter AU680
Феритин (ug/L)	Турбидиметријска метода, биохемијски анализатор Beckman Coulter AU680
Укупни протеини (g/L)	Модификација биуретске методе, биохемијски анализатор Beckman Coulter AU680
Албумин (g/L)	Колориметријска метода бром-крезол зелено, биохемијски анализатор Beckman Coulter AU680
Глобулини (g/L)	Израчунавају се из разлике укупних протеина и албумина, биохемијски анализатор Beckman Coulter AU680
Холестерол (mmol/L)	колориметријска ензимска метода – комбинација естеразе и оксидазе у један ензимски реагенс, Beckman Coulter AU680 analyzer
Триглицериди (mmol/L)	процедура се заснива на низу повезаних ензимских реакција; Beckman Coulter AU680 analyzer
ХДЛ (mmol/L)	колориметријска ензимска метода, Beckman Coulter AU680 analyzer;
ЛДЛ (mmol/L)	is calculated by FF (total cholesterol (TC) minus high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol minus triglycerides (TGs)/5 in mg/dl)
Индекс атеросклерозе	ЛДЛ/ХДЛ
Однос (Холестерол/ХДЛ)	Холестерол/ХДЛ

АСТ (IU/L)	<i>IFCC</i> метода, биохемијски анализатор Beckman Coulter AU680
АЛТ (IU/L)	<i>IFCC</i> метода, биохемијски анализатор Beckman Coulter AU680
Гама-ГТ (IU/L)	Модификована <i>Szasz</i> метода, биохемијски анализатор Beckman Coulter AU680
Алкална фосфатаза (U/L)	<i>IFCC</i> метода, биохемијски анализатор Beckman Coulter AU680
Лактат-дехидрогеназа (U/L)	Модификована <i>Wacker</i> метода, биохемијски анализатор Beckman Coulter AU680
Креатин-киназа (U/L)	Модификована <i>IFCC</i> метода, биохемијски анализатор Beckman Coulter AU680
Креатин киназа МБ (U/L)	Модификована <i>IFCC</i> метода, биохемијски анализатор Beckman Coulter AU680
Гвожђе (umol/L)	Варијанта <i>Schade</i> методе, биохемијски анализатор Beckman Coulter AU680
УИБЦ (umol/L)	Колориметријска метода, биохемијски анализатор Beckman Coulter AU680
ТИБЦ (umol/L)	Израчунава се као збир <i>Fe</i> и УИБЦ, биохемијски анализатор Beckman Coulter AU680
ТСАТ (%)	<i>Fe</i> /ТИБЦ изражено у процентима, биохемијски анализатор Beckman Coulter AU680
Калијум (mmol/L)	Јон-селективне електроде <i>ISE</i> метод, биохемијски анализатор Beckman Coulter AU680
Натријум (mmol/L)	Јон-селективне електроде <i>ISE</i> метод, биохемијски анализатор Beckman Coulter AU680
Хлориди (mmol/L)	Јон-селективне електроде <i>ISE</i> метод, биохемијски анализатор Beckman Coulter AU680
Калцијум (mmol/L)	Колориметријска метода – <i>Arsenazo III</i> , биохемијски анализатор Beckman Coulter AU680
Фосфор (mmol/L)	Колориметријска метода – модификација <i>Daly</i> и <i>Ertingshausen</i> методе, биохемијски анализатор Beckman Coulter AU680
Магнезијум (mmol/L)	Колориметријска метода – <i>xylidyl blue</i> , биохемијски анализатор Beckman Coulter AU680

ХДЛ – липопротеини велике густине; *ЛДЛ* – липопротеини мале густине; *АСТ* – аспартат аминокиселин-трансфераза; *АЛТ* – аланин аминокиселин-трансфераза; *Гама-ГТ* – гама-глутамил-трансфераза; *ТИБЦ* – укупни капацитет везивања гвожђа; *УИБЦ* – резервни капацитет везивања гвожђа; *ТСАТ* – проценат сатурације трансферина гвожђем.

3.4.4. Методе одређивање хематолошких параметара

Поред биохемијских параметара свим пацијентима одређиване су вредности хематолошких параметара, комплетна крвна слика са леукоцитарном формулом. Коришћен је вакутајнер са ЕДТА пуфером и игла 21G. Хематолошке анализе за све учеснике истраживања одређиване су у Хематолошкој лабораторији Клиничког центра у Крагујевцу. У табели су наведени сви одређивани хематолошки параметри (Табела 6).

Табела 6. Хематолошки параметри и методе одређивања.

Параметар	Метода и апарат за анализу
Леукоцити ($10^9/L$)	Бројање крвних ћелија је вршено на хематолошком бројачу Beckman Coulter LH780 који ради на принципу регистровања и мерења промена у електричном отпору који стварају крвне ћелије суспендоване у проводљивом раствору пролазећи кроз пукотину одређеног промера
Неутрофили (%)	Метод бројања ћелија и апарат исти као код леукоцита
Лимфоцити (%)	Метод бројања ћелија и апарат исти као код леукоцита
Моноцити (%)	Метод бројања ћелија и апарат исти као код леукоцита
Еозинофили (%)	Метод бројања ћелија и апарат исти као код леукоцита
Базофили (%)	Метод бројања ћелија и апарат исти као код леукоцита
Неутрофили (#) ($10^9/L$)	Метод бројања ћелија и апарат исти као код леукоцита
Лимфоцити (#) ($10^9/L$)	Метод бројања ћелија и апарат исти као код леукоцита
Моноцити (#) ($10^9/L$)	Метод бројања ћелија и апарат исти као код леукоцита
Еозинофили (#) ($10^9/L$)	Метод бројања ћелија и апарат исти као код леукоцита
Базофили (#) ($10^9/L$)	Метод бројања ћелија и апарат исти као код леукоцита
Еритроцити ($10^{12}/L$)	Метод бројања ћелија и апарат исти као код леукоцита
Хемоглобин (g/L)	Цијанметхемоглобинска метода, Beckman Coulter LH780
Хематокрит (L/L)	MCV(fl) x број eritrocita (10^{12})
MCV (fL)	Средњи волумен еритроцита
MCH (pg)	Средњи садржај хемоглобина у еритроциту конц. хемоглобина (g/L) / број еритроцита (10^{12})
MCHC (g/L)	Средња концентрација хемоглобина у еритроциту конц. хемоглобин(g/L)/хематокритна вредност

RDW	Коефицијент варијације дистрибуције волумена еритроцита
Тромбоцити ($10^9/L$)	Метод бројања ћелија и апарат исти као код леукоцита
MPV (fL)	Средњи волумен тромбоцита
PCT	Волумен крви који заузимају тромбоцити
PDW	Коефицијент варијације дистрибуције волумена тромбоцита

% - удео параметра у укупној запремини; # - апсолутни број ћелија; **MCV** – просечни волумен еритроцита (*mean cell volume*); **MCH** – просечна количина хемоглобина у еритроциту (*mean hemoglobin concentration*); **MCHC** – просечна концентрација хемоглобина на литар еритроцита (*mean cell hemoglobin concentration*); **RDW** – мера варијабилности величине еритроцита (*red blood cell distribution width*); **MPV** – просечан волумен тромбоцита (*mean platelets volume*); **PCT** – запремински удео тромбоцита у јединици пуне крви (*plateletcrit*); **PDW** – расподела тромбоцита по волумену (*platelet distribution width*).

3.4.5. Методе процене серопозитивности/серонегативности

У циљу процене серопозитивности/серонегативности пацијента са дијагностикованим РА, у Централној лабораторији Клиничког центра у Крагујевцу спроведене су следеће лабораториске анализе (Табела 7):

Табела 7. Параметри за праћене серопозитивности/серонегативности пацијента.

Параметар	Метода и апарат за анализу
Реума фактор	Турбидиметријска метода, Beckman Coulter AU680 analyzer
анти-ССР antitela	Roche метода (метода - <i>Electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA)</i>), Cobas e411 analyzer

анти-ССР антитета – антитета на циклични цитрулисани пептид

3.4.6. Методе одређивање параметара хемостазе

У истраживању су спроведени *општи тестови* као и *глобалне методе хемостазе* у циљу праћена коагулације и фибринолизе у наведеним популацијама. Општи тестови

хемостазе спроведени су у Централној лабораторији Клиничког центра у Крагујевцу док су глобалне методе хемостазе спроведене на Каролинска Институту у Шведској.

Општи тестови хемостазе

Приликом узорковања крви, испитаницима је узета крв за одређивање параметара хемостазе. Коришћен је вакутајнер са цитратним пуфером (3,2% натријум-цитрат; 109 mmol/L) и игла 21G. Параметри хемостазе за све учеснике истраживања одређивани су у Централној лабораторији Клиничког центра у Крагујевцу. У табели су наведени хемостатски параметри су одређивани у овом истраживању (Табела 8).

Табела 8. Општи параметри хемостазе

Параметар	Метода и апарат за анализу
Фибриноген	<i>Clauss</i> метода, ACL TOP analyzer by Instrumentation Laboratory
АПТТ (сек)	Време потребно да се формира стабилан угрушак се бележи у секундама и представља АПТТ. Заснива се на принципу да се у цитратној плазми, додатком супституента тромбоцита, фактора XII и CaCl ₂ доводи до формирања стабилног угрушка; ACL TOP300 Instrumentation Laboratory
ПТ	Мерење времена потребног за формирање угрушка плазме пацијента коришћењем Ca –тромбопластина, Апарат – ACL TOP300 Instrumentation Laboratory
ИНР	Протромбинско време узорка (сек) / протромбинско време (сек) стандардне плазме

АПТТ – активирано парцијално тромбoplastинско време; *ПТ* – протромбинско време; *ИНР* – интернационални нормализовани однос.

3.5. Глобалне методе хемостазе

3.5.1. Ендогени тромбин потенцијал

Праћење вредности тромбина кроз *ETP* есеј (ендогени тромбин потенцијал), одређивано је колорифотометријски на *BCS® XP System* апарату (Слика 1), према упутству произвођача (Siemens).



Слика 1. *BCS® XP System* апарата за колорифотометријско одређивање ендогеног тромбин потенцијала

Из криве настанка тромбина (График 1), одређивано је 4 параметра: *ETP* (мерење укупног ендогено генерисаног тромбина); *t_lag* (време до почетка стварања тромбина); *C_max* (максимална концентрација тромбина) и *t_max* (време када је постигнута максимална концентрација тромбина). Вредности ЕТП-а израчунате су као површина испод криве (AUC) стварања тромбина и представљена је у процентима (%). Вредности *C_max* представљене су такође у процентима (%), док се вредности *t_lag* и *t_max* представљају у секундама (сек). Коефицијенати варијације интра- и интер-есеја за нормалну плазму били су 1,06 % и 1,74 %, док су вредности за хипокоагулабилну биле 1,82 % and 3,92 % (121).

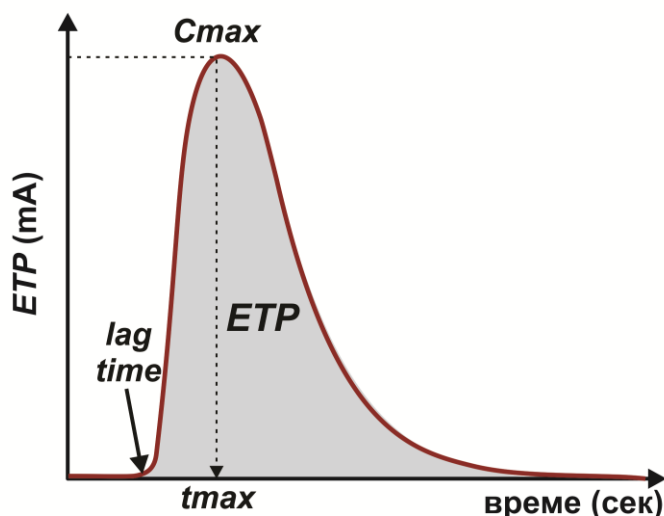


График 1. Крива настанка тромбина. Ендогени тромбин потенцијал

3.5.2. Укупни хемостатски потенцијал

Укупни хемостатски потенцијал је глобална метода хемостазе која се заснива на мерењу агрегације фибрина која је представљена као површина испод криве. Одређује се из плазме сиромашне тромбоцитима у коју се додаје мале количине егзогеног тромбина и активатора ткивног плазминогена. Приликом настанка криве агрегације фибрина, фибриноген који је изворно присутан у плазми постепено се конвертује у фибрин генерисан тромбином. Истовремено, активација плазминогена производи плазмин који разграђује фибрин. Сходно томе, свака вредност апсорбанце представља ниво фибрина у одговарајућој временској тачки а површина испод криве представља равнотежу између настанка и протеолизе фибрина током периода мерења.

Ова метода се заснива на криви агрегације фибрина која настаје услед анализе узорак плазме са цитратним пуфером у коју се додају мале количине тромбина са или без ткивног активатора плазминогена (*t-PA – tissue type plasminogen activator*).

Када се формира крива агрегације фибрина, фибриноген се постепено преводи у фибрин каталитичком реакцијом посредованом генерисаним тромбином. Са друге стране, услед додавања *t-PA*, плазминоген је активиран да производи плазмин, који последично разграђује фибрин. Као резултат, свака вредност апсорбанце представља ниво фибрина у

одређеном времену. Површина испод криве представља баланс између генерисања и протеолизе фибрина кроз период мерења нивоа фибрина.

У зависности од тога да ли се додаје *t-PA* или не, добијемо две криве (График 2): (1) *OHP* (*Overall hemostasis potential* – укупни хемостатски потенцијал) када се дода *t-PA*; (2) *OCP* (*Overall coagulation potential* – укупни коагулациони потенцијал) без додавања *t-PA*. Разлика између ова два параметра представља укупни фибринолитички потенцијал (3) *OFP* (*Overall fibrinolysis potential* – укупан фибринолитички потенцијал) који се прерачунава на основу претходно добијених података *OHP* и *OCP*: $[(OCP - OHP) / OCP] \times 100\%$.

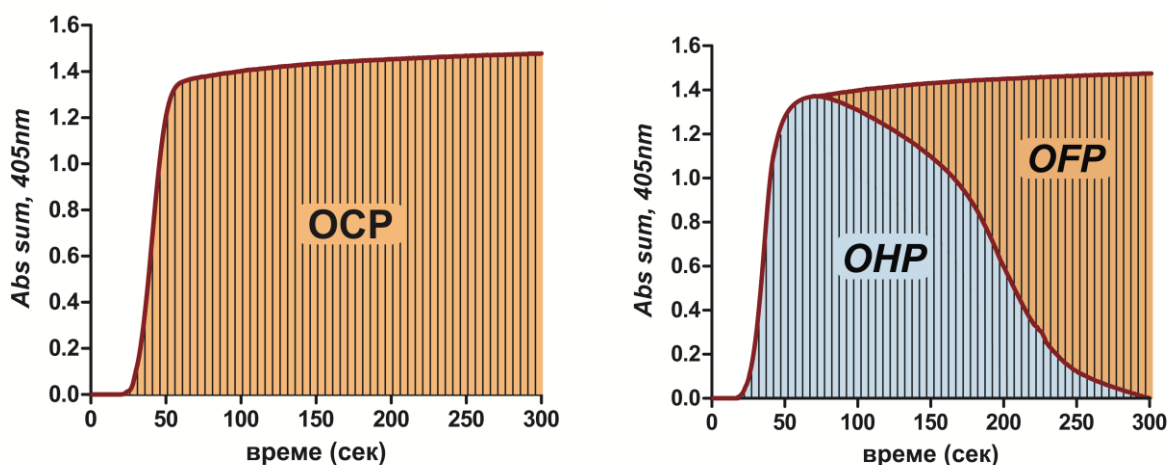
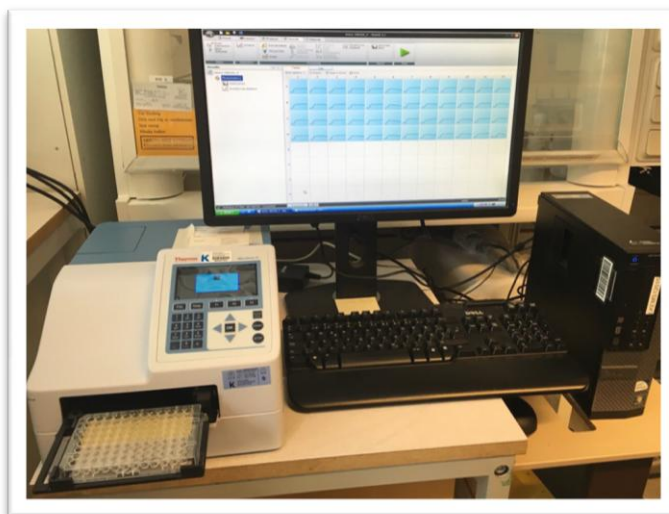


График 2. Криве коагулације и фибринолизе: а) *OCP* – укупни коагулациони потенцијал; б) *OHP* – укупни хемостатски потенцијал и *OFP* – укупни фибринолитички потенцијал.

Узорак крви за ову методу се узима ујутру, најмање 10 сати након не узимања хране. За узорковање крви коришћен је вакутајнер са цитратним пуфером (3,2% натријум-цитрат; 109 mmol/L). Узорци су центрифугирани највише сат времена након узорковања на 2000 x g 15 минута у циљу добијања плазме сиромашне тромбоцитима (*PPP* – *platelet-poor plasma*). Узорак је до почетка експеримента чуван на температури – 80°C.

Пре почетка експеримента, крв се одмрзава на воденом купатилу на температури 37°C у трајању од 5-7 минута. У микроплејт се додаје 20µL фосфолипидног реагенса, који садржи синтетички фосфатидилсерин, фосфатидилхолин и сфингомијелин (*Rossix*, *Möln dal, Sweden*; 0.11 mmol/l) разблаженог са tris-HCl пуфером (pH = 7.5; 66mmol/L TRIS; 130mmol/L NaCl; 4M HCl) у односу 1:1 (конц. 0,25mmol/L). Након тога додаје се 140µL

плазме, док се као контрола користи пулована нормална плазма (*PNP – pooled normal plasma*). Припреми се тромбин (конц. 10U/ml) и *t-PA* (конц. 0,1mg/ml). Од направљених раствора тромбина и *t-PA* добијају се два финална пуфера: (1) тромбин (конц. 0,04U/ml) и *t-PA* (300ng/ml) додавањем претходно направљеног раствора (tris-HCl пуфер и 1mol/L CaCl₂) (конц. 34mmol/L). Апсорбанца се читава на 405 nm, сат времена, на сваких 12 секунди, при чему се конструише крива агрегације фибрина. Вредност се читава спектрофотометријски на елиза читачу *Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Scientific* приказаном на слици 2. Површина испод криве се израчунава као сума свих вредности апсорбанце (Abs-sum) (122).



Слика 2. *Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Scientific*, апарат за читавање вредности укупног хемостатског потенцијала

3.5.3. Време фибринолизе угрушка

Време фибринолизе угрушка (*CLT – clot lysis time*) је дефинисано као време од средњег времена формирања угрушка („*clotting time*“) до средњег времена фибринолизе угрушка и одређује се на основу криве агрегације фибрина.

Време фибринолизе угрушка може да се користи за индиректно одређивање инхибитора фибринолизе (*TAFI – thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor*) мерењем овог времена пре и после додавања инхибитора карбоксипептидазе (*PTCI – potato tuber carboxypeptidase inhibitor*; конц. 50 mg/mL), специфичног инхибитора *TAFI*.

ΔCLT представља разлику времена фибринолизе угрушка добијено одузимањем вредности времена фибринолизе без и након додатка инхибитора фибринолизе, $PTCI$. На овај начин меримо $TAFI$ активност (параметар који инхибира фибринолизу). Када блокирамо активност $TAFI$ додатком $PTCI$, долази до ослобађања фибринолизе, брже лизе угрушка и скраћивања времена фибринолизе угрушка (График 3).

Време згрушавања (CT – *clotting time*) одређује се из OCP криве агрегације фибрина. Када сигмоидална крива турбидуметрије достигне свој плато, тангента може да се повуче дуж најстрмијег дела. Пресек са осом времена је дефинисан као време згрушавања (122).

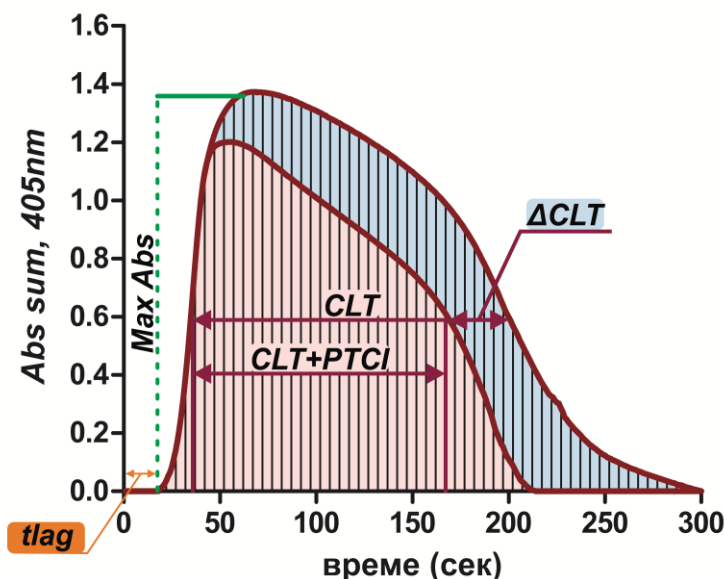


График 3. Крива агрегације фибрина. CLT – време фибринолизе угрушка; $PTCI$ – *potato tuber carboxypeptidase inhibitor* – инхибитор карбоанхидразе; ΔCLT – разлика између времена лизе угрушка пре и након додавања $PTCI$.

3.5.4. Методе анализе турбидиметријских података

Релативни баланс између формирања угрушка и фибринолизе, самтра се да указује на тромботски потенцијал након васкуларне повреде. Развој кардиоваскуларних болести је повезан са тромботичком компонентом, иницираном васкуларним оштећењем. Код оклузивне артеријске болести, развој тромба богатог тромбоцитима подржан је

фибринском мрежом, при чему формирање фибрина зависи од сложених интеракција између компоненти коагулационе каскаде.

Следеће турбидиметријске варијабле су одређивање из коагулационог есеја: (1) *lag time*: представља време у којем је формирано довољно протофибрила за детекцију. Узета је као временска тачка у којој је дошло до експоненцијалног повећања апсорбанце; (2) максимална апсорбанца (*MaxAbs*) представља повећање вредности апсорбанце од почетних до максималних вредности; (3) *slope* (нагиб): најстрмији део криве агрегације фибрина; показује бочну агрегацију и фазу формирања влакана (123); (4) *Lag Abs Avrg* – просечна вредност апсорбанце од почетка стварања криве коагулације до *lag time* (времена када се формира довољно протофибрила за детекцију); (5) *Max Abs-Lag Abs* – апсорбанца која се добија одузимањем вредности *MaxAbs* (максималне апсорбанце) и *Lag Abs Avrg* (просечне вредности апсорбанце од почетка стварања криве коагулације до *lag time*); (6) *Max Abs time* – време када се постиже максимална апсорбанца; (7) *Slope time* – време које се добија одузимањем *Max Abs time* (време када се постиже максимална апсорбанца) и *lag time* (време када се формира довољно протофибрила за детекцију).

На овај начин ближе можемо да опишемо угрушак који се формира као и сам процес коагулације.

3.6. Електронска микроскопија

Угрушци за електронску микроскопију су припремљени на следећи начин. Након испитивања глобалних хемостатских метода, угрушци који су формираны након *OHP* методе, испрани су раствором *PBS* (*phosphate-buffered saline*), фосфатним пуфером, и фиксирани у 2,5% глутаралдехиду 60 минута на собној температури, након чега су чувани на 4°C. Пре почетка експеримента, узорци су испрани у дестилованој води и остављени у 70% етанолу током 10 минута, 95% етанолу 10 минута, чистом етанолу 15 минута на собној температури и чистом ацетону 10 минута и након тога пребачени су у тетраметилсилан 10 минута и сушени на ваздуху. Након сушења, узорци су монтирани на алуминијумском стубу и премазани угљеником (*Bal-Tec MED 010, Lichtenstein*). Узорци су анализирани на електронском микроскопу (*Ultra 55 field emission scanning electron microscope, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany*) на 3 kV (124).

Мерење дебљине влакана репрезентативних узорака била су спроведена на пет различитих подручја угрушка, и средња вредност 10 фибринских нити по подручју коришћена је као финална вредност дебљине влакана.

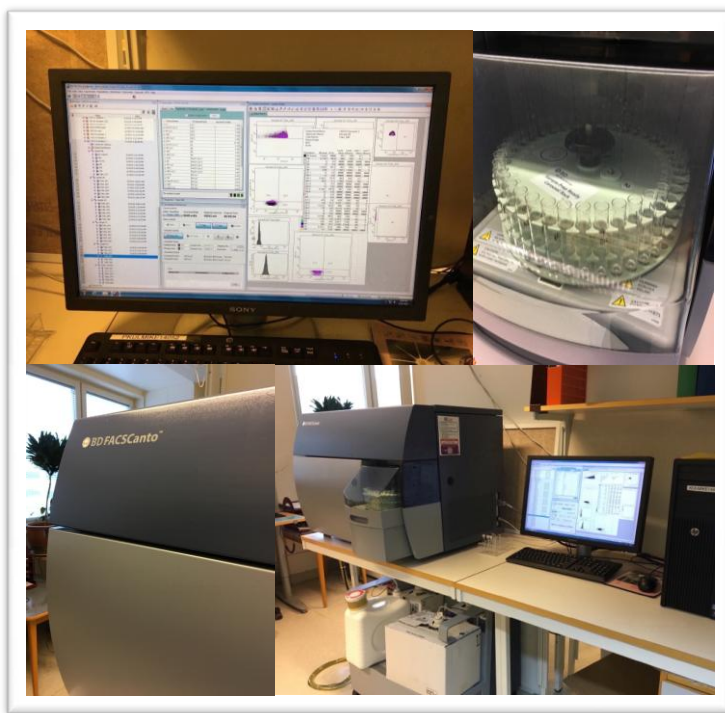
3.7. Методе одређивање микропартикула

Претходно замрзнута плазма сиромашна тромбоцитима, одмрзава се у воденом купатилу 5 минута на (37°C) након чега се центрифугира на 2000 g 20 минута на собној температури. Након тога, одваја се супернатант који се рецентрифугира на 13 000 g 2 минута на собној температури. Супернатант добијен након другог центрифугирања, коришћен је за анализу. Укупна запремина од 20µl узорка се инкубира са 5µl одговарајућих антитела, 30 минута у мраку (66).

3.7.1. Концентрација микропартикула

3.7.1.1. Одређивање укупне концентрације микропартикула

Укупна концентрација МП одређена је као број догађаја позитивних на фосфатидилсерин. Као контрола коришћен је тритон. Прво је постављен опсег за МП позитивне на фосфатидилсерин, након чега је исти опсег коришћен за одређивање концентрације МП у контролној и експерименталној групи.



Слика 3. BD FACSCanto™, апарат за одређивање концентрације микропартикула

3.7.2. Врста микропартикула

У истраживању су коришћена следећа антитела: *lactadherin-FITC* (BD, USA); *CD42a-PE* (МП које потичу од тромбоцита; BD, USA); *CD14-PE* (МП које потичу од моноцита; BD, USA), *CD45-APC* (МП које потичу од леукоцита; BD, USA); *CD62P- PE* (П-селектин; BD, USA); *CD62E- PE* (Е-селектин; BD, USA); *CD142-PE* (ткивни фактор; BD, USA); *CD144-PE* (ендотелне МП; BD, USA). Микропартикуле су одређиване проточном цитометријом на *BD FACSCanto™* цитометру (Слика 3).

Опсег у којем се налазе МП (“gate”) одређен је помоћу *Megamix plus beads FSC* (*BioCytex, Marseille, France*). Микропартиккле су дефинисане као честице мање од 1 μ m, позитивне или негативне на *lactadherin*.

Као контрола коришћене су изотопске контроле и тритон X-100.

Изотопске контроле (*IgG1-FITC, IgG1-PE, IgG1-APC*) су коришћене како би се дефинисале границе за позитивне и негативне МП. Поред тога, као контрола коришћен је тритон X-100, нејонски сулфактант, дериват полиетилен-гликола, који је коришћен као детерцент. Циљ коришћења тритона био је да се уклоне све МП присутне у узорку, да се као такав користи као контрола односно да се те вредности пореде са вредностима добијеним у нашим узорцима (здравим испитаницима и пацијентима оболелим од РА).

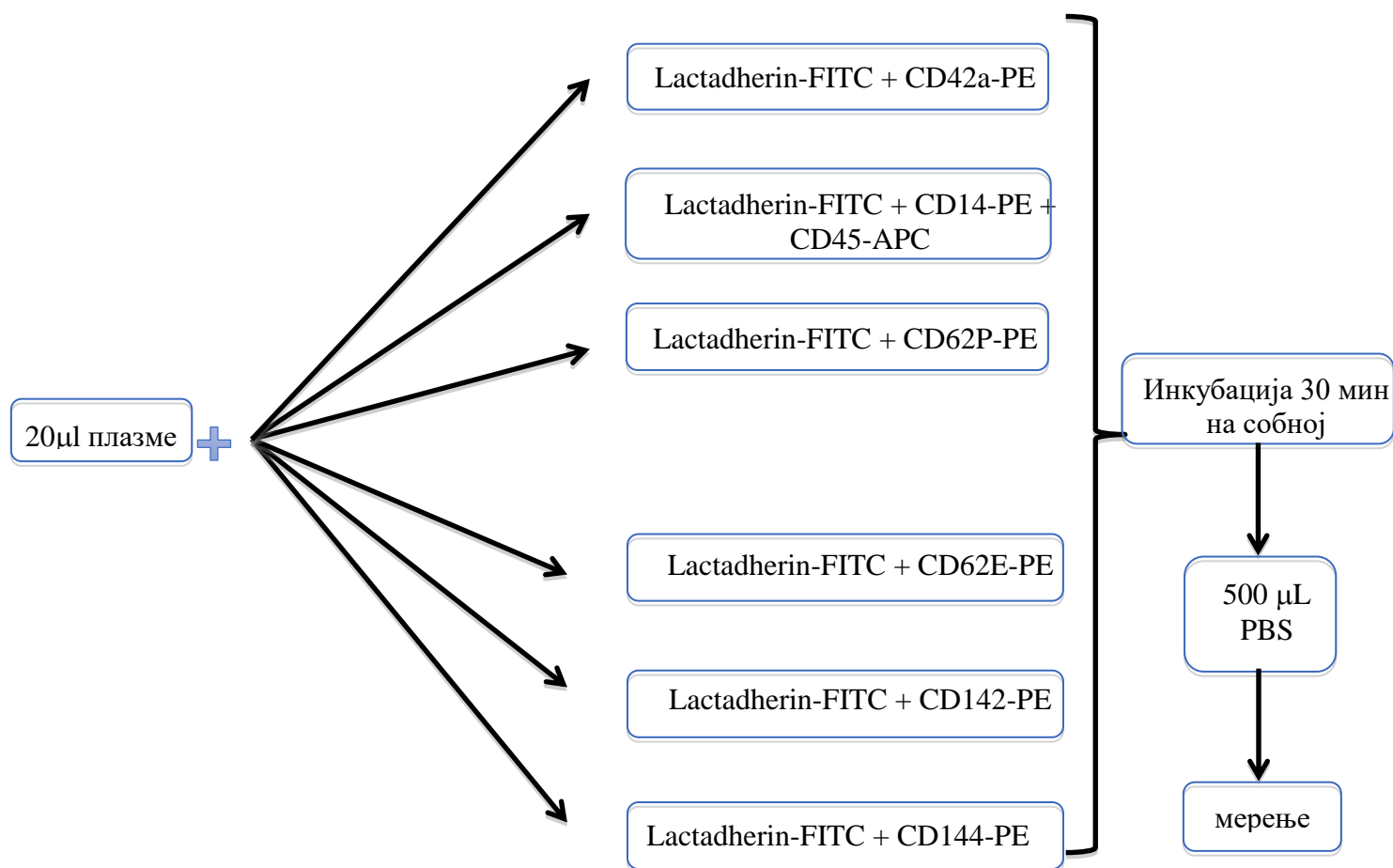
3.7.3. Одређивање концентрације појединачних микропартикула

Концентрација МП одређивана је на основу граница постављених у тритон групи. Прво је одређен “gate” којим су обухваћене све МП које постоје у узорку. Вредности најниже границе за све врсте МП постављене су пре почетка извођења експеримената. Границе су одређиване на основу *Megamix-Plus SSC beads* који се користи за постављање граница приликом одређивања МП а који је компатибилан са апаратом коришћеним за одређивање МП.

Вредности доње границе прерачунате су на основу формуле а на основу вредности добијених употребом *Megamix-Plus SSC beads*-а. Како бисмо имали исте услове за све узорке, на основу средњих вредности добијених на основу ове формуле, одређено је да доња граница буде 3400. Вредности горње границе добијене су дистрибуцијом *SSC* параметра и као вредност узета је највећа вредност добијена *Megamix-Plus SSC beads*-ом.

Та вредност износила је 8×10^4 . Наведене вредности коришћене су за све узорке у свим групама.

Након постављања граница за све МП које се налазе у узорку, постављене су границе за сваку појединачну врсту МП, које су одређиване у студији. Као доња и горња граница коришћене су претходно одређене вредности, док се опсег у којем се налазе МП за сваку појединачну врсту постављао елиминацијом велике групе ћелија. Основни услов за постављање одговарајућег опсега био је да се унутар постављених граница налази мање од 0,01% ћелија колико се очекује да постоји у узорку. Опсег је прво постављен у тритон групи за одређену врсту МП а затим је исти коришћен је унутар једне врсте МП, како бисмо обезбедили исте услове у свим испитиваним узорцима. Поступак је поновљен за сваку врсту одређиваних МП. Протокол одређивања микропартикула и комбинације антитела приказане су на слици 4.



Слика 4. Протокол и комбинација антитела коришћених у истраживању.

3.8. Методе одређивања параметара редокс статуса

Параметри оксидационог стреса и параметри антиоксидативне заштите одређивани у Лабораторији за експерименталну кардиоваскуларну физиологију Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу. Сви параметри од интереса за наше истраживање мерени су спектрофотометријски на апарату марке Specord S-600 Analytik Јена, Велика Британија.

3.8.1. Методе одређивања параметара оксидационог стреса

Из узорака плазме одређивани су следећи параметри оксидационог стреса: индекс липидне пероксидације (TBARS), водоник-пероксид (H_2O_2), нитрити (NO_2^-) и супероксид анјон радикал (O_2^-). Концентрација TBARS је изражавана у μM а концентрација осталих параметара у nM због разлике у укупној количини TBARS, која је за један ранг величина већа од свих осталих параметара.

Супстанце и реагенси за одређивање параметара оксидационог статуса

За аналитичко одређивање параметара оксидационог статуса, коришћени су комерцијални реагенси *pro analysis* квалитета произвођача Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Немачка.

3.8.1.1. Одређивање индекса липидне пероксидације (TBARS)

Одређивање индекса липидне пероксидације рађено је индиректном методом, а базирано на стварању реактивних продуката при реакцији са тиобарбитуратном киселином (енг. *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*; **TBARS**) (125). Метода се заснива на одређивању нивоа липидних пероксида на основу реакције једног од њих, малонилдиалдехида (MDA) са тиобарбитурном киселином (ТВА).

Реагенси

2-тиобарбитурна киселина (ТВА, $\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$), $M_r=144,15$; натријум хидроксид (NaOH) $M_r=40,00$.

Поступак

Екстракт се добија комбиновањем 400 μl 28% трихлорсирћетне киселине (ТСА) и 800 μl плазме, затим се 15 минута оставља на лед, након чега се 15 минута врши центрифугирање на 6000 грм. У 800 μl супернатанта додаје се 200 μl 1% тиобарбитурне киселине, а потом се добијени узорци кувају у воденом купатилу 15 минута на 100°C. Након наведене инкубације узорци се прилагођавају собној температури. Поступак за слепу пробу је исти, само се уместо плазме користи дестилована вода. Мери се спектрофотометријски на таласној дужини од 530 nm.

Концентрација ослобођених TBARS добијана је на основу следеће једначине:

$$\text{nmol TBARS/ml плазме} = \Delta A (\text{Au-Asp}) / 1.56 \times 1.25$$

при чему је Au апсорбанца узорка, док је Asp апсорбанца следеће пробе, док су 1.56 и 1.25 корекциони фактор за овај есеј. Након тога, количина ослобођених TBARS по граму срчаног ткива се одређивала на следећи начин:

$$\text{nmol TBARS/минути/g wt} = \Delta A / 1.56 \times 1.25 \times \text{CF/m}_{\text{срца}}$$

3.8.1.2. Одређивање водоник пероксида (H_2O_2)

Концентрација H_2O_2 се одређује након оксидације фенол црвеног коју у присуству H_2O_2 катализује ензим пероксидаза из рена (енгл. *Horse Radish Peroxidase HRPO*). Добијено једињење се спектрофотометријски одређује на таласној дужини $\lambda=610\text{nm}$ (126).

Реагенси

Калијум хидрогенфосфат дихидрат ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) $M_r=214,23$; калијум дихидрогенфосфат дихидрат ($\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) $M_r=164,09$; натријум хлорид (NaCl) $M_r=58,44$; водоник пероксид (H_2O_2), $M_r=34,01$; D(+)-глукоза монохидрат (декстроза), $M_r=198,17$; фенол црвено (*phenol red*, $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{O}_5\text{S}$), $M_r=354,4$; пероксидаза из коњске ротквице (енгл. *peroxidase from horse radish* – HRPO EC 1.11.1.7), $M_r=44 \text{ kDa}$.

Поступак

У епрувете (90) пипетира се 200 μL плазме и 800 μL непосредно направљеног раствора фенол црвеног (енгл. *Phenol Red Solution-PRS*) који садржи 140 mM NaCl, 10 mM калијум фосфатног пуфера (pH=7), 5.5 mM D+ глукозе и 0.28mM фенол црвеног. Потом се додаје 10 μL (1:20) HRPO, припремљен *ex tempore*. Узорци су остављани на собној температури 10 минута, а затим се подеси pH \approx 12, помоћу 1 M NaOH. Као слепа проба, уместо плазме, коришћена је дестилована вода.

Концентрација ослобођеног H_2O_2 у узорку који се испитује добија се на основу калибрационе криве претходно добијене мерењем узорака познате концентрације. одређиваног за сваки есеј. За конструкцију стандардне криве, користи се стандардни (Stock) раствор H_2O_2 , уз претходну проверу концентрације (A_{230} за 10 mM H_2O_2 износи 0,810). У 3 епрувете је пипетирано: (уместо плазме) 5, 10 и 20 μl , 1 mM раствора H_2O_2 , 200 μl дестиловане воде, 800 μl раствора фенол црвеног и 10 μl (1:20) HRPO. Након инкубације од 10 минута на собној температури, подешена је pH \approx 12 помоћу 1 M NaOH (10 μl). Тако је финална концентрација H_2O_2 у 3 узорака стандарда износила: 2,75; 5,49; и 10,99 nmol/ H_2O_2 /ml. Мерење апсорбанце (A) спровођене су на таласној дужини максималне апсорпције $\lambda_{\text{max}}=610\text{nm}$, у стакленим киветама, запремина 1 ml на спектрофотометру. Од добијених апсорбанци одузима се вредност апсорбанце слепе пробе (B), чиме се добија коначна апсорбанца (ΔA).

Концентрација, а затим и количина ослобођеног H_2O_2 у узорку плазме израчунавана је на основу:

Фактор апсорбанце (F) по једном nmol-у водоник пероксида:

$$F = \Delta A / \text{nmol } \text{H}_2\text{O}_2 / \text{cuv}$$

На основу апсорбанце узорка на $\lambda_{\text{max}}=610\text{nm}$ (A_u) и њеног упоређивања са слепом пробом (A_{sp}) израчунава се финална апсорбанца (ΔA) ($A = A_u - A_{\text{sp}}$). Помоћу овако добијене апсорбанце, фактора F и количине плазме употребљених у есеју израчунавана је концентрација и количина H_2O_2 у узорку плазме по формули:

$$\text{nmol } \text{H}_2\text{O}_2 / \text{ml } \text{плазме} = \Delta A / F$$

Након тога, количина ослобођеног H_2O_2 по граму срчаног ткива се одређивана је на следећи начин:

$$\text{nmol } \text{H}_2\text{O}_2 / \text{ml } / \text{минут} / \text{g wt} = \Delta A / F \times CF / m_{\text{срца}}$$

3.8.1.3. Одређивање супероксид анјон радикала (O_2^-)

Приликом одређивања концентрације O_2^- коришћена је особина O_2^- да се у реакцији са нитро тетразолијум плавим (енгл. **Nitro Tetrazolium Blue – NTB**) ствара нитроформазан плаво (127). Мерење се спроводило на таласној дужини максималне апсорпције $\lambda_{\max}=550\text{nm}$.

Реагенси

TRIS (Трис (хидроксиметил) аминометан, $C_4H_{11}NO_3$), $M_r=121,14$; 37% хлороводонична киселина (HCl), $\rho=1,19\text{ gcm}^{-3}$, $M_r=36,5$; Na_2EDTA , $M_r=372,24$; Нитро-тетразолијум плаво хлорид (NBT, $C_{40}H_{30}ClN_{10}O_6$), $M_r=817,6$; Желатин ($C_{15}H_{11}N_2NaO_2$), $M_r=61,5\text{ kDa}$.

Поступак

Есејна смеша (“*assay mixture*”) се састоји од 0,1mM EDTA, 50 mM TRIS-HCL пуфера (pH= 8,6), 0,1mg/ml желатина и 0,1mM NBT. Пре употребе раствор се претходно гасира азотом под притиском у трајању од једног часа. Као слепа проба уместо узорка плазме коришћена је дестилована вода. Спектрофотометријско мерење се врши при таласној дужини $\lambda=550\text{nm}$.

У епрувете (90) је пипетирано 50 μl узорака плазме и 950 μl есејне смеше, чиме реакција отпочиње. На самом почетку реакције измери се екстинкција смеше и нотира се као екстинкција E1. Сваких 60 секунди се врши мешање пластичним штапићем и нотира екстинкција након мешања до своје стабилизације, што подразумева две узастопне приближно исте екстинкције. Последња екстинкција се означава као E2. Исти поступак се примењује и за слепу пробу. Као слепа проба користи се есејна смеша.

Концентрација ослобођеног O_2^- добијена је на основу следећих једначина

$$\Delta E_u = E_{2u} - E_{1u} \text{ (за узорак)}$$

$$\Delta E_{sp} = E_{2sp} - E_{1sp} \text{ (за слепу пробу)}$$

$$\Delta E = \Delta E_u - \Delta E_{sp}$$

$$\text{nmol O}_2^-/\text{ml узорка} = \Delta E/0.015 \times 1/0.05$$

Након тога, количина ослобођеног O_2^- по граму срчаног ткива се одређивала према следећој једначини:

$$\text{nmol O}_2^- / \text{минут/g} = \Delta E/0.015 \times 1/0.05 \times \text{CF}/m_{\text{срца}}$$

3.8.1.4. Одређивање нитрита (NO_2^-)

Количина ослобођеног NO_2^- у плазми се процењује индиректном методом – одређивањем нитрита захваљујући чињеници да се NO у реакцији са кисеоником претвара у нитрит у еквимоларном односу (128). Одређивање нитрита је доступно за разлику од директног мерења NO .

Реагенси

Сулфанилна киселина (4-амино бензенсулфонска киселина, $\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_3\text{S}$), $M_r=173,19$; N-(1-нафтил)-етилендиамин дихидрохидрат (NEDA, $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{C}_{12}\text{N}$), $M_r=259,18$; амонијум хлорид (NH_4Cl), $M_r=53,49$; Боракс ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$), $M_r=381,4$; 85% орто-фосфорна киселина (H_3PO_4), $\rho=1,685 \text{ gcm}^{-3}$; натријум нитрит (NaNO_2), $M_r=69,00$.

Поступак

Метода мерења нитрита се у биохемијском смислу заснива на реакцији нитрита са Griess-овим реагенсом чиме се добија диазо-комплекс који даје раствору љубичасту боју. Griess-ов реагенс се припрема *ex tempore*, непосредно пре аналитичког одређивања, мешањем једнаких запремина (v/v) 1 % сулфанилне киселине, растворене у 5 % орто-фосфорној киселини (може се чувати на собној температури) и 0,1 % воденог раствора: N-(1-нафтил)-етилендиамин дихидрохлорида (NEDA), који се чува у тамној бочици на 4°C , због своје високе фотохемијске реактивности.

Након стабилизације боје по додавању Griess-овог реагенса (5 мин) резултат се добија након спектофотометријског мерења на таласној дужини $\lambda=550\text{nm}$. Концентрација нитрита у узорку који се испитује добија се на основу калибрационе криве претходно добијене мерењем узорака познате концентрације. Као слепа проба уместо узорака плазме коришћена је дестилована вода.

У епрувете (90) је пипетирано 0,2 ml узорка плазме, 0,1 ml PCA (3N) и 0,4 ml 20 mM EDTA. Након 10-15 минута на леду и центрифугирањем на 600rpm у трајању од 15 минута, одлије се супернатант и у талог дода 220 μ l K_2CO_3 . У 200 μ l добијеног естракта плазме се додаје 250 μ l свеже направљеног Griess-ов реагенса и 125 μ l амонијачног пуфера (pH=9,0), кога сачињавају амонијум хлорид (NH_4Cl) и натријум тетраборат ($Na_2B_4O_7$). Амонијачни пуфер, који се у току припеме мора загревати, због изузетно слабе растворљивост натријум тетрабората, има за сврху стабилизацију диазо-комплекса.

Концентрација ослобођених нитрита у узорцима одређивана је на основу калибрационе криве. Калибрациона крива је конструисана на основу екстинкција узорка, који су у себи садржале познату концентрацију нитрита, након њихове реакције са Griess-овим реагенсом у присуству пуфера. Добијана је пипетирањем различитих количина воденог раствора 1 mM $NaNO_2$ у 1 ml Krebs-Hensenleitov-ог раствора и то: 3, 6, 12, 24 μ l, чиме је добијена концентрација нитрита од: 2.18, 4.37, 8.73 и 17.34 nmol NO_2^- /ml. Након стабилизације боје на собној температури 5-10 минута приступа се детерминисању концентрације ослобођених нитрита спектрофотометријски на таласној дужини од $\lambda=550$ nm. Концентрација, а затим количина ослобођених нитрита добијана је на основу:

Одређивања стандардног фактора (F), који се добијао из следеће једначине:

$$\frac{\text{Екстинкција стандарда} - \text{екстинкција слепе пробе}}{\text{Концентрација } NaNO_2 \text{ у стандарду}}$$

за сваки појединачни стандард (F1-F4), а затим добијањем њихове аритметичке средине.

Дељењем разлике екстинкција узорка и слепе пробе са стандардом F:

$$\text{nmol } NO_2/\text{ml узорка} = \Delta E (E_u - E_{sp})/F.$$

Након тога, количина ослобођених нитрита по граму срчаног ткива се одређивала на следећи начин:

$$\text{nmol } NO_2/\text{минут/g wt} = \Delta E/F \times CF \text{ (коронарни проток)/}m_{\text{срца}}$$

3.8.2. Методе одређивања параметара антиоксидативног система заштите

Изолувани еритроцити за одређивање параметара антиоксидативне заштите је припремљен према McCord и Fridovich садржи око 50 g Hb/l (129). Из лизата крви су одређивани параметари антиоксидационог система заштите: каталаза (CAT), супероксид дисмутаза (SOD) и редуковани глутатион (GSH). Активност каталазе и супероксид дисмутазе изражена је у U/gHb $\times 10^3$, док је ниво глутатион редуктазе изражен као nmol/ml RBCs.

Супстанце и реагенси за одређивање параметара антиоксидативне заштите

За аналитичко одређивање параметара оксидационог статуса, коришћени су комерцијални реагенси *pro analysis* квалитета произвођача Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Немачка.

3.8.2.1. Одређивање каталазе (CAT)

У лизату крви одређивана је концентрација каталазе према *Beutler*-овој методи (130). Метода се заснива на спектрофотомеријском праћену брзине разградње водоник-пероксида у присуству каталазе на таласној дужини од 230 nm при којој H₂O₂ апсорбује светлост.

Концентрација водоник пероксида израчунава се на основу екстинкционог коефицијента, који је за H₂O₂ на 230 nm, 0,071, по формули:

$$C = \Delta A / 0,071$$

Након тога, добијена концентрација се разблажује до 10 mM.

Поступак

Укупна запремина од 50 μ l CAT буфера, 100 μ l узорка и 1 ml 10 mM H₂O₂ (који започиње реакцију) додата је у кварцну кивету, након чега се приступило мерењу узорака на таласној дужини од $\lambda=230$ nm. Као слепа проба уместо лизата крви коришћена је дестилована вода.

Активност се изражава у јед/mg протеина, а јединица је дефинисана као количина редукованог H₂O₂, изражена у μ M, у минути. Израчунавање се врши према следећој једначини:

$$\Delta A * R / 0,071 * Low * V$$

при чему је ΔA – промена апсорбанце у минути; R – разблажење; V – запремина узорка (ml); Low – количина протеина (mg/ml сонификата).

3.8.2.2. Супероксид дисмутаза (SOD)

Одређивање активности супероксид дисмутазе засновано је на епинефринској методи (131). Мерење се спроводи спектрофотометријски на таласној дужини од 480nm, на којој се детектује брзина аутооксидације. Ова метода припада методи ”негативног” типа јер прати смањење брзине аутооксидације у алкалној средини које зависи од супероксид анјон радикала. Као слепа проба уместо лизата крви коришћена је дестилована вода.

Поступак

Мешањем 100 μ l лизата и 1 ml карбонатног буфера се започиње процес, након чега се додаје 100 μ l епинефрина. Мерење се спроводи спектрофотометријски на таласној дужини од 470 nm.

Активност SOD се изражава у јединицама њене активности по граму Hb (unit/gHb) (132). Израчунавање се спроводи према наведеној реакцији:

$$SOD - 1 = 2(\Delta K - \Delta A) * R / V * Hb * \Delta K$$

ΔK је промена апсорпције контролне реакције у минути; ΔA је промена апсорпције реакције са узорком у минути; V је запремина узорка која се сипа у реакциону смешу (ml); Hb количина хемоглобина (g/100ml лизата); R је разблажење.

3.8.2.3. Одређивање редукованог глутатиона (GSH)

Метода одређивања редукованог глутатиона заснива се на реакцији оксидације глутатиона са 5,5-дитиобис-6,2-нитробензоичном киселином, методом по *Beutler*-у (133). Ниво редукованог глутатиона одређиван је спектрофотометријски на таласној дужини од 420 nm. Као слепа проба уместо лизата крви коришћена је дестилована вода.

Поступак

GSH се екстрахује тако што се у 0,1 ml 0,1% EDTA дода 0,4 ml узорка и 0,75 ml раствора за преципитацију. Раствор за преципитацију се прави према тако што се помеша 1,67 g метафосфорне киселине, 0,2 g EDTA, 30 g NaCl, а потом допуни до 100 ml дестилованом водом.

После мешања на *Vortex* мешалици наведена смеша 0,1% EDTA и раствора за преципитацију се екстрахује 15 минута на леду и центрифугира 10 минута на 4000 rpm. У епрувете се пипетира 300 μ l узорка, 750 μ l Na₂HPO₄ и 100 μ l DTNB (1 mg DTNB/ml 1% натријум цитрата). Као слепа проба се користи дестилована вода. Мерење нивоа GSH се одвија спектрофотометријски на 420 nm.

Концентрација, а затим и количина редукованог глутатиона у еритроцитима одређује се на основу стандардне криве за сваки есеј. За конструкцију стандардне криве користи се стандардни *Stock*-раствор редукованог глутатиона концентрације 1,5 mmol/l тако што се у 4 епрувете пипетира 10, 20, 30 и 40 μ l 1 mM раствора GSH, 300 μ l хладног перфузног *Krebs-Hensenleit*-овог раствора. На овај начин се одређује концентрација нитрита у узорцима стандарда (nmol/GSH/ml). Мерење апсорбанце (A) врши се на таласној дужини максималне апсорпције од 420 nm. Од добијених апсорбанци одузима се вредност апсорбанце следеће пробе (B), чиме се добија коначна апсорбанца (ΔA). Помоћу овако добијене апсорбанце, стандардног фактора (F), и количине венског ефлуента употребљеног у есеју израчунава се концентрација глутатиона у венском ефлуенту према следећој формули:

$$\text{nmol GSH / ml еритроцита} = \Delta A / F$$

3.8.3. Статистичка обрада података

Статистичка обрада експерименталних података је спроведена на следећи начин:

- 1) За опис параметара од значаја, у зависности од њихове природе, користила се: фреквенција, проценти, узорачка средња вредност, узорачка медијана, узорачка стандардна девијација, ранг и 95% интервали поверења.
- 2) За испитивање нормалности расподеле употребљени су тестови *Kolmogorov Smirnov* и *Shapiro Wilk*, и графици: хистограм и *normal QQ plot*.
- 3) За тестирање разлика између параметара користио се Студентов т-тест, *Mann-Whitney* тест, Фишеров тест апсолутне вероватноће, једнофакторска или двофакторска анализа варијансе (ANOVA). Приликом тестирања разлика између параметара, употребљавао се непараметријски аналог једнофакторске анализе варијансе, *Kruskal-Wallis* Н тест, са нивоом значајности од 0,05.
- 4) За тестирање повезаности између континуалних варијабли са другим испитиваним параметрима, употребљен је непараметријски статистички тест корелације, *Pearson*-ов и *Spearman*-ов коефицијент корелације, на основу којег је дефинисан смер и јачина повезаности.
- 5) Статистичка обрада података је рађена у статистичком пакету *SPSS 20.0 for Windows* (*IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp.*), *GraphPad Prism 5* (*Version for Windows, GraphPad Software, La Jolla California, USA*) и *FlowJo V10, LLC for Windows*.
- 6) Вредности $p < 0,05$ сматрале су се значајне, док су вредности $p < 0,01$ сматране високо значајним.

IV

РЕЗУЛТАТИ

4. РЕЗУЛТАТИ

У првом делу резултата, приказане су демографске карактеристике испитиваних група, контроле и пацијената са РА као и демографске карактеристике свих учесника истраживања, подељених према менопаузи. Поред демографских карактеристика, приказани су традиционални фактори ризика и придружене болести за све испитанике, као и активност болести и функционални статус пацијената са РА.

У другом делу приказани су резултати лабораторијских параметара: биохемијских, хематолошких и параметара хемостазе, унутар испитиваних група, као и подељених на основу менопаузе.

У трећем делу резултата, приказани су резултати врсте и концентрације микропартикула, праћених код свих испитаника.

У четвртом делу, приказани су резултати хемостатских параметара, глобалних метода хемостазе, коагулације и фибринолизе, време лизирања тромба као и електронски приказ тромба, у контролној и експерименталној групи, као и у групама испитаника подељених на основу менопаузе.

У петом делу, приказани су резултати редокс статуса, односно, вредности параметара оксидационог стреса и антиоксидационог система заштите унутар обе групе, као и између подгрупа дефинисаних на основу менопаузе.

У шестом делу приказани су резултати корелације праћених параметара.

4.1. Карактеристике испитаника

4.1.1. Демографске карактеристике испитаника

У истраживање је укључено 48 здравих контрола женског пола и 42 пацијента женског пола, са дијагностикованим РА. Између контролне групе и пацијената са РА није постојала значајна разлика у погледу традиционалних кардиоваскуларних фактора ризика као што су пушење, 41,7% према 40,5%, и индекса телесне масе, $26,13 \pm 3,90 \text{ kg/m}^2$ према $26,16 \pm 4,87 \text{ kg/m}^2$. Поред тога, није постојала разлика између у старости између здравих испитаника и пацијената ($54,15 \pm 6,29$ година према $54,81 \pm 9,05$ година) нити у броју непушача (41,7% према 45,2%) и бивших пушача (16,6% према 14,3%). Демографске карактеристике испитиваних група приказане су у табели 9а.

Табела 9а. Демографске карактеристике испитаника

Карактеристике испитаника	Контрола	РА
Број испитаника	48	42
Старост (године)	$54,15 \pm 6,29$	$54,81 \pm 9,05$
Индекс телесне масе (kg/m^2)	$26,13 \pm 3,90$	$26,16 \pm 4,87$
Менопауза (Да/Не)	34/14	31/11
Пушење (n, %)		
Да	20 (41,7%)	17 (40,5%)
Не	20 (41,7%)	19 (45,2%)
Бивши пушач	8 (16,6%)	6 (14,3%)

Вредности су представљене као средња вредност \pm стандардна девијација или учесталост (%). n – број испитаника.

4.1.1.1. Активност реуматоидног артритиса

Средња дужина трајања болести код пацијената била је $12,8 \pm 8,0$ година, док је активност болести, мерена параметром DAS28, била средња до висока, са средњом вредношћу $3,8 \pm 1,1$, у тренутку узорковања крви, при чему је од укупног броја пацијената 9 (20%) било у ремисији ($\text{DAS28} < 2,5$). Сви пацијенти су лечени стандардним протоколом,

применом метотрексата у дози 15–25 mg недељно и преднизолону (≤ 10 mg дневно). Просечна стабилна доза метотрексата 12 недеља пре укључења износила је $17,02 \pm 2,72$ mg/недељно.

Функционални статус пацијената, праћен HAQ упитником, износио је $1,26 \pm 0,24$, док је пацијентова свеукупна процена болести износила $60,12 \pm 14,32$ mm. Већина пацијената била је позитивана на реума фактор ($n = 36$; 86%) и цитрулинска антитрела ($n = 40$; 95%). Од укупног броја, 5 пацијената је имало екстра-артикуларне манифестације у форми реуматоидних чворова на лактовима и малим зглобовима шака. Сви праћени параметри функционалног статуса, активности болести и клиничког стања пацијената приказани су у табели 9б.

Табела 9б. Параметри за праћење функционалног статуса, активности болести и клиничког стања пацијената са РА

Карактеристике болести	РА
Дужина трајања РА (године)	$12,81 \pm 8,00$
DAS28	$3,75 \pm 1,09$
DAS28-ЦРП	$3,22 \pm 1,12$
Функционални статус (HAQ)	$1,26 \pm 0,24$
Број болних зглобова	$4,60 \pm 4,77$
Број отечених зглобова	$1,48 \pm 1,84$
Пацијентова свеукупна процена болести (pVAS) (mm)	$60,12 \pm 14,32$
Реума фактор	$91,50 \pm 71,43$
Реума фактор позитивни (n, %)	36 (86%)
АСРА	$173,05 \pm 128,68$
АСРА позитивни (n, %)	40 (95%)
Број екстраартикуларних манифестација (n, %)	5 (12%)

Вредности су представљене као средња вредност \pm стандардна девијација и учесталост (%). n – број испитаника. DAS28 – Disease Activity Score-28; АСРА – антитела на циклични цитрулисани пептид

4.1.2. Демографске карактеристике испитаника на основу менопаузе

У истраживање је укључено 14 здравих жена у пременопаузи и 34 здравих жена у менопаузи. Од укупног броја пацијенткиња, 11 жена је било у пременопаузи, док је 31 пацијенткиња била у менопаузи. Најстарија контрола која није била у менопаузи имала је 53 године, док је најмлађа пацијенткиња у менопаузи имала 45 година. Постменопаузалне контроле имале су престанак менструације пре $8,2 \pm 4,1$ година, док је у групи постменопаузалних пацијената број година износио $9,3 \pm 4,5$, без статистички значајне разлике. Демографске карактеристике испитиваних група на основу менопаузе приказане су у табели 10а.

Табела 10а. Демографске карактеристике испитаника на основу менопаузе.

Карактеристике пацијената	(1) Контрола пременопауза	(2) Контрола менопауза	(3) РА пременопауза	(4) РА менопауза
Број испитаника	14	34	11	31
Старост (године)	$47,00 \pm 2,88^{a*, c*}$	$57,09 \pm 4,74^{d**}$	$43,64 \pm 6,22^{f**}$	$58,77 \pm 6,08$
Индекс телесне масе (kg/m^2)	$24,06 \pm 3,18^{a*, c*}$	$26,99 \pm 3,89^{d*}$	$23,59 \pm 4,66^{f*}$	$27,07 \pm 4,68$
Пушење (n,%)				
Да	7 (50%)	14 (41,2%)	5 (45,5%)	12 (38,75)
Не	6 (42,9%)	13 (38,2%)	6 (54,5%)	13 (41,9%)
Бивши пушач	1 (7,1%)	7 (20,6%)	/	6 (19,4%)

Вредности су представљене као средња вредност \pm стандардна девијација и учесталост (%). n – број испитаника. Статистичка значајност између група: ^a1 и 2; ^c1 и 4; ^d2 и 3; ^f3 и 4 са нивоом значајности * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.1.2.1. Активност реуматоидног артритиса праћена на основу менопаузе

Просечна дужина трајања болести у пременопаузалној групи је $11,64 \pm 8,38$ година док је у менопаузалној групи та вредност износила $13,23 \pm 7,94$ година. Средња вредност активности болести мерена параметром DAS28 износила је $3,64 \pm 1,42$ код жена у пременопаузи (у ремисији је било 4 (36%) пацијенткиње), док је код жена у менопаузи

вредност DAS28 била $3,79 \pm 0,97$ (у ремисији је било 5 (16%) пацијенткиња). Просечна стабилна доза метотрексата 12 недеља пре укључења износила је $16,82 \pm 2,23$ mg/недељно у пременопаузалној и $18,01 \pm 2,92$ mg/недељно у менопаузалној групи.

Функционални статус пацијената, мерен упитником (HAQ), износио је $1,21 \pm 0,21$ у пременопаузалној групи према $1,27 \pm 0,26$ у менопаузалној групи док је пацијентова свеукупна процена болести износила $64,12 \pm 11,12$ mm у пременопаузалној и $61,72 \pm 13,82$ mm, без статистички значајних разлика. Сви пацијенти са екстрартикуларним променама су били у менопаузалној групи. Параметри функционалног статуса, активности болести и клиничког стања пацијената на основу менопаузе приказани су у табели 10б.

Табела 10б. Параметри за праћење функционалног статуса, активности болести и клиничког стања пацијената са РА на основу менопаузе

Карактеристике болести	РА пременопауза	РА менопауза
Дужина трајања РА (године)	$11,64 \pm 8,38$	$13,23 \pm 7,94$
DAS28	$3,64 \pm 1,42$	$3,79 \pm 0,97$
DAS28-ЦРП	$3,19 \pm 1,61$	$3,23 \pm 0,93$
Функционални статус (HAQ)	$1,21 \pm 0,21$	$1,27 \pm 0,26$
Број болних зглобова	$3,82 \pm 4,62$	$4,87 \pm 4,87$
Број отечених зглобова	$1,73 \pm 2,41$	$1,39 \pm 1,63$
Пацијентова свеукупна процена болести (pVAS) (mm)	$64,12 \pm 11,12$	$61,72 \pm 13,82$
Реума фактор	$81,27 \pm 41,10$	$95,13 \pm 79,13$
Реума фактор позитивни (n, %)	10 (91%)	26 (84%)
Антитела на цитрулисане (АСРА)	$166,09 \pm 104,22$	$175,52 \pm 137,78$
Антитела на цитрулисане (АСРА) позитивни (n, %)	11 (100%)	29 (94%)
Број екстраартикуларних манифестација (n, %)	/	5 (16%)

Вредности су представљене као средња вредност \pm стандардна девијација и учесталост (%). n – број испитаника.

4.1.3. Придружене болести испитаника

Осим присуства РА, испитаници су имали и придружене болести. Детаљна анамнеза и преглед медицинске документације од стране истраживача спроведено је ради укључивања у истраживање пацијената са РА који су адекватно лечени од коморбидитета, прихватљивих према критеријумима укључивање у студију.

Укупно 61 испитаника имало је коморбидитет, 29 у контролној групи и 32 у експерименталној. Најчешћи коморбидитет је артеријска хипертензија а најређи хронични панкреатитис, гастритис, глауком које је имао по један пацијент. Учесталост свих коморбидитета у контролној и експерименталној групи приказана је у табели 11.

Табела 11. Учесталост коморбидитета у контролној и експерименталној групи

Коморбидитети	Контрола (n=48)	РА (n=42)
Хипертензија	18 (37,5%)	18 (42,8%)
Хипертиреозидизам	2 (4,17%)	1 (2,38%)
Хашимото	2 (4,17%)	3 (7,14%)
Хронични панкреатитис	/	1 (2,38%)
Калкулозна жучне кесе	/	2 (4,67%)
Бронхијална астма	/	2 (4,67%)
Улкус	3 (6,25%)	3 (7,14%)
Аритмије	4 (8,33%)	5 (11,90%)
Мигрена	3 (6,25%)	1 (2,38%)
Артроза	3 (6,25%)	2 (4,67%)
Глауком	1 (2,08%)	/

Вредности су представљене као средња вредност \pm стандардна девијација и учесталост (%) у односу на укупан број пацијента у групи. n – број испитаника.

4.1.4. Придружене болести испитаника на основу менопаузе

На основу претходно утврђених и поменутих критеријума за укључивање/искључивање, наведен је укупни број као и врста коморбидитета у контролној и експерименталној групи (табела 11). У табели 12 наведена је врста коморбидитета, број и проценат по праћен на основу менопаузе.

Од укупно 29 испитаника који су имали коморбидитет у контролној групи, 8 је припадало пременопаузалној и 21 менопаузалној. Од укупно 32 пацијента који су имали коморбидитет у експерименталној групи, 3 је припадало пременопаузалној и 29 менопаузалној групи.

Табела 12. Учесталост коморбидитета у контролној и експерименталној групи на основу менопаузе.

Коморбидитети	Контрола пременопауза (n=14)	Контрола менопауза (n=34)	РА пременопауза (n=11)	РА менопауза (n=31)
Хипертензија	2 (14,28%)	16 (47,05%)	1 (9,09%)	17 (54,83%)
Хипертиреозидизам	1 (2,17%)	1 (2,94%)	1 (9,09%)	/
Хашимото	1 (2,17%)	1 (2,94%)	1 (9,09%)	2 (6,45%)
Хронични панкреатитис	/	/	/	1 (3,22%)
Калкулоза жучне кесе	/	/	/	2 (6,45%)
Бронхијална астма	/	/	/	2 (6,45%)
Улкус	1 (2,17%)	2 (5,88%)	/	3 (9,68%)
Аритмије	2 (14,28%)	2 (5,88%)	2 (18,18%)	3 (9,68%)
Мигрена	2 (14,28%)	1 (2,94%)	/	1 (3,22%)
Артроза	1 (2,17%)	2 (5,88%)	/	2 (6,45%)
Глауком	1 (2,17%)	/	/	/

Вредности су представљене као средња вредност \pm стандардна девијација и учесталост (%) у односу на укупан број пацијента у подгрупи. n – број испитаника.

4.2. Лабораторијске анализе

4.2.1. Утицај реуматоидног артритиса на биохемијске параметре

Вредности праћених биохемијских параметара нису се разликовале између контролне групе и пацијената са РА осим вредности неспецифичних параметара инфламације, што је било и очекивано, где је постојала значајна разлика између здравих испитаника и пацијената са РА у вредностима седиментације (13.3 ± 8.8 mm/h према 22.9 ± 13.5 mm/h, $p = 0.0001$) и Ц-реактивног протеина (2.5 ± 2.4 mg/L према 11.5 ± 6.4 mg/L, $p = 0.0001$). Вредности ова два параметра биле су статистички значајно више код пацијената са РА у односу на здраву контролу.

Вредности праћених биохемијских параметара као и статистички значајна разлика између подгрупа приказане су у табели 13.

Табела 13. Биохемијски параметри у контролној и експерименталној групи.

Биохемијски параметри	Контрола	РА
Седиментација (mm/h)	13,33 ± 8,83**	22,95 ± 13,50
Ц-реактивни протеин (mg/L)	2,54 ± 2,40**	11,55 ± 26,42
Глукоза (mmol/L)	5,24 ± 0,51	5,39 ± 0,80
Уреа (mmol/L)	4,98 ± 1,48	5,50 ± 1,47
Креатинин (umol/L)	71,85 ± 12,83	72,64 ± 11,87
Мокраћна киселина (umol/L)	271,27 ± 67,72	278,6 ± 64,00
Укупни билирубин (umol/L)	10,36 ± 3,43	10,53 ± 3,23
Директни билирубин (umol/L)	1,59 ± 0,59	1,79 ± 0,64
Феритин (ug/L)	69,25 ± 57,43	79,02 ± 69,64
Укупни протеини (g/L)	71,85 ± 4,58	71,31 ± 5,01
Албумин (g/L)	43,63 ± 2,26	42,21 ± 2,50
Глобулини (g/L)	28,42 ± 4,62	28,71 ± 4,65
Холестерол (mmol/L)	6,50 ± 1,23	6,06 ± 1,01
Триглицериди (mmol/L)	1,5 ± 0,65	1,49 ± 0,62

ХДЛ (mmol/L)	1,60 ± 0,30	1,49 ± 0,29
ЛДЛ(mmol/L)	4,21 ± 1,12	3,81 ± 0,94
Индекс атеросклерозе	2,76 ± 0,79	2,74 ± 0,91
Однос (Холестерол/ХДЛ)	4,17 ± 0,88	4,19 ± 0,92
АСТ (IU/L)	22,96 ± 4,69	22,21 ± 6,39
АЛТ (IU/L)	19,77 ± 6,63	18,88 ± 12,91
Гама-ГТ (IU/L)	17,19 ± 6,55	21,36 ± 11,91
Алкална фосфатаза (U/L)	71,17 ± 18,2	74 ± 24,04
Лактат-деhidрогеназа (U/L)	365,5 ± 75,2	354,02 ± 80,23
Креатин-киназа (U/L)	104,4 ± 77,13	102,45 ± 65,35
Креатин киназа МБ (U/L)	16,29 ± 32,23	12,40 ± 7,29
Гвожђе (umol/L)	17,06 ± 7,58	15,04 ± 6,64
УИБЦ (umol/L)	44,06 ± 11,44	43,86 ± 11,07
ТИБЦ (umol/L)	61,27 ± 9,41	60,1 ± 8,59
ТСАТ (%)	28,5 ± 12,16	27,88 ± 11,42
Калијум (mmol/L)	4,57 ± 0,34	4,48 ± 0,36
Натријум (mmol/L)	138,73 ± 2,31	139,4 ± 2,35
Хлориди (mmol/L)	103,54 ± 2,34	103,31 ± 2,18
Калцијум (mmol/L)	2,42 ± 0,11	2,39 ± 0,09
Фосфор (mmol/L)	1,06 ± 0,17	1,12 ± 0,17
Магнезијум (mmol/L)	0,95 ± 0,17	0,89 ± 0,10

Вредности су представљене као средња вредност ± стандардна девијација. **ХДЛ** – липопротеини велике густине; **ЛДЛ** – липопротеини мале густине; **АСТ** – аспартат аминокиселин-трансфераза; **АЛТ** – аланин аминокиселин-трансфераза; **Гама-ГТ** – гама-глутамил-трансфераза; **ТИБЦ** – укупни капацитет везивања гвожђа; **УИБЦ** – резервни капацитет везивања гвожђа; **ТСАТ** – проценат сатурације трансферина гвожђем. Ниво значајности * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.2.2. Утицај менопаузе на биохемијске параметре

У табели 14 представљени су биохемијски параметри посматрани на основу менопаузе. Статистички значајна разлика примећена је код неспецифичних параметара инфламације, при чему су вредности ових параметара значајно повишене код пацијената са РА у менопаузи као и пре менопаузе у поређењу са здравим женама у обе подгрупе. Исти тренд је примећен код оба неспецифична параметра инфламације, седиментације и Ц-реактивног протеина, у корист повећања параметра инфламације код пацијената са реуматоидном артритисом, односно значајно изнад горњих граница референтних вредности.

Посматрајући липидни профил, укупни холестерол се значајно разликовао између пременопаузалних контрола и контрола у менопаузи. Разлика је промећена и у групама између контрола у менопаузи и пременопаузалних пацијенткиња као и пацијенткиња у пременопаузи и менопаузи. ХДЛ је значајно нижи код пременопаузалних пацијенткиња у односу на манопаузалне контроле, док вредности ЛДЛ-а показују повишене вредности у менопаузалној групи у односу на пременопаузалне контроле као и ниже вредности овог параметра код пацијенткиња у односу на менопаузалне контроле.

Вредности посматраних параметара као и статистички значајне разлике између подгрупа, приказане су у табели 14.

Табела 14. Биохемијски параметри у контролној и експерименталној групи посматрани у односу на менопаузу

Биохемијски параметри	(1) Контрола пременопауза	(2) Контрола менопауза	(3) РА пременопауза	(4) РА менопауза
Седиментација (mm/h)	11,21 ± 10,33 ^{b**} , c**	14,21 ± 8,13 ^{d*} , e**	25,35 ± 15,06	22,10 ± 13,06
Ц-реактивни протеин (mg/L)	1,84 ± 1,07 ^{b**} , c**	2,83 ± 2,73 ^{d**} , e*	25,28 ± 48,21	6,67 ± 9,22
Глукоза (mmol/L)	5,16 ± 0,35	5,27 ± 0,57	4,95 ± 0,54 ^{f*}	5,54 ± 0,83
Уреа (mmol/L)	4,36 ± 0,98 ^{c**}	5,24 ± 1,58	5,12 ± 1,13	5,64 ± 1,57
Креатинин (umol/L)	72,71 ± 10,55	71,50 ± 13,79	68,45 ± 11,51	74,13 ± 11,82
Мокраћна киселина (umol/L)	245,71 ± 34,75 ^{a*} , c*	281,79 ± 75,27	260,73 ± 54,19	284,94 ± 66,79
Укупни билирубин (umol/L)	9,78 ± 4,15	10,59 ± 3,13	8,55 ± 2,68 ^{f*}	11,13 ± 3,24

Директни билирубин (umol/L)	1,59 ± 0,75	1,59 ± 0,53^{e*}	1,39 ± 0,56^{f*}	1,94 ± 0,61
Феритин (ug/L)	19,64 ± 17,73^{a**, b**, c**}	89,68 ± 55,68^{d*}	65,36 ± 86,00^{e*}	83,87 ± 63,79
Укупни протеини (g/L)	72,29 ± 4,51	71,68 ± 4,67	72,82 ± 5,38	70,77 ± 4,86
Албумин (g/L)	43,21 ± 2,15	43,79 ± 2,3^{d*, e*}	41,82 ± 2,04	42,35 ± 2,67
Глобулини (g/L)	28,43 ± 4,24	28,41 ± 4,83	31,27 ± 5,16^{f*}	27,81 ± 4,17
Холестерол (mmol/L)	5,76 ± 1,03^{a**}	6,80 ± 1,19^{d**}	5,47 ± 0,87^{f*}	6,28 ± 0,98
Триглицериди (mmol/L)	1,39 ± 0,43	1,4 (0,7 – 3,9)	1,4 (0,7 – 3,3)	1,58 ± 0,69
ХДЛ (mmol/L)	1,63 ± 0,33	1,6 (1,2 – 2,5)^{d*}	1,3 (1,1 – 2,0)	1,53 ± 0,30
ЛДЛ (mmol/L)	3,49 ± 0,94^{a**}	4,51 ± 1,06^{d**, e*}	3,50 ± 0,83	3,92 ± 0,96
Индекс атеросклерозе	2,46 ± 0,93	2,89 ± 0,70	2,69 ± 0,67	2,76 ± 0,99
Однос (Холестерол/ХДЛ)	3,75 ± 0,81^{a*}	4,34 ± 0,86	4,03 ± 0,84	4,25 ± 0,95
АСТ (IU/L)	21,64 ± 4,53	23,5 ± 4,72	20,09 ± 5,22	22,97 ± 6,67
АЛТ (IU/L)	18,86 ± 7,95	20,15 ± 6,10^{d*}	16,18 ± 4,49	19,84 ± 14,74
Гама-ГТ (IU/L)	14,14 ± 5,60^{a*, b*, c*}	18,44 ± 6,57	26,45 ± 18,86	19,55 ± 7,90
Алкална фосфатаза (U/L)	60,43 ± 17,71^{a**}	75,59 ± 16,71	77,27 ± 29,14	72,84 ± 22,39
Лактат-дехидрогеназа (U/L)	330,71 ± 51,96^{a*, c*}	379,82 ± 79,15^{d*}	306,18 ± 105,45^{f*}	371 ± 62,89
Креатин-киназа (U/L)	78,86 ± 21,93	114,91 ± 88,85	102,45 ± 90,32	102,55 ± 55,83
Креатин киназа МБ (U/L)	10,00 ± 2,08^{a**, c*}	18,88 ± 38,13	14,64 ± 13,85	11,61 ± 2,50
Гвожђе (umol/L)	17,64 ± 12,34	16,82 ± 4,67 ^{d*}	12,20 ± 5,48	16,05 ± 6,80
УИБЦ (umol/L)	48,43 ± 14,79	42,26 ± 9,42	48,09 ± 11,26	42,35 ± 10,79
ТИБЦ (umol/L)	65,93 ± 8,77^{a*, c*}	59,35 ± 9,10	62,64 ± 10,28	59,19 ± 7,91
ТСАТ (%)	26,57 ± 17,64	29,29 (9,26)	23,73 ± 11,03	29,35 ± 11,37
Калијум (mmol/L)	4,52 ± 0,37	4,59 ± 0,33	4,47 ± 0,38	4,48 ± 0,36
Натријум (mmol/L)	138,00 ± 1,66	139,03 ± 2,49	137,91 ± 2,4	139,94 ± 2,11
Хлориди (mmol/L)	103,79 ± 1,12	103,44 ± 2,70	102,82 ± 1,66	103,48 ± 2,34
Калцијум (mmol/L)	2,36 ± 0,09	2,45 ± 0,11	2,35 ± 0,13	2,40 ± 0,08
Фосфор (mmol/L)	1,05 ± 0,13	1,06 ± 0,19	1,08 ± 0,10	1,13 ± 0,18
Магнезијум (mmol/L)	0,98 ± 0,25	0,94 ± 0,13	0,91 ± 0,11	0,88 ± 0,10

Вредности су представљене као средња вредност ± стандардна девијација. ХДЛ – липопротеини велике густине; ЛДЛ – липопротеини мале густине; АСТ – аспартат аминокиселин-трансфераза; АЛТ – аланин аминокиселин-трансфераза; Гама-ГТ – гама-глутамил-

трансфераза; **ТИБЦ** – укупни капацитет везивања гвожђа; **УИБЦ** – резервни капацитет везивања гвожђа; **ТСАТ** – проценат сатурације трансферина гвожђем. Статистичка значајност између група: ^a1 и 2; ^b1 и 3; ^c1 и 4; ^d2 и 3; ^e2 и 4; ^f3 и 4 са нивоом значајности * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.2.3. Утицај реуматоидног артритиса на хематолошке параметре

4.2.3.1. Крвна слика

Вредности хематолошких параметара праћених у популацији оболелих од РА у поређењу са контролом, биле су значајно повишене за параметар *RDW* (*red cell distribution width*) којим се прати мера варијабилности величине еритроцита и значајно мање за параметар *PCT* (*plateletcrit*) који запремински удео тромбоцита у јединици пуне крви. Код осталих параметара није било статистички значајне разлике између посматраних група.

Вредности хематолошких параметара као и статистички значајна разлика између група приказане су у табели 15а.

Табела 15а. Вредности хематолошких параметара у контролној и експерименталној групи.

Хематолошки параметри	Контрола	РА
Еритроцити ($10^{12}/L$)	4,52 ± 0,35	5,54 ± 7,57
Хемоглобин (g/L)	134,63 ± 14,53	131,04 ± 11,07
Хематокрит (L/L)	0,41 ± 0,04	0,40 ± 0,03
MCV (fL)	90,12 ± 5,68	90,40 ± 6,03
MCH (pg)	29,75 ± 2,34	30,16 ± 1,99
MCHC (g/L)	330,57 ± 7,56	331,88 ± 10,39
RDW	13,98 ± 1,56	15,20 ± 1,71**
Тромбоцити ($10^9/L$)	265,78 ± 64,33	241,80 ± 58,70
MPV (fL)	9,29 ± 0,96	9,02 ± 1,17
PCT	0,24 ± 0,05	0,21 ± 0,05**
PDW	16,51 ± 0,62	16,34 ± 0,81

Вредности су представљене као средња вредност \pm стандардна девијација. **MCV** – просечни волумен еритроцита (*mean cell volume*); **MCH** – просечна количина хемоглобина у еритроциту (*mean hemoglobin concentration*); **MCHC** – просечна концентрација хемоглобина на литар еритроцита (*mean cell hemoglobin concentration*); **RDW** – мера варијабилности величине еритроцита (*red blood cell distribution width*); **MPV** – просечан волумен тромбоцита (*mean platelets volume*); **PCT** – запремински удео тромбоцита у јединици пуне крви (*plateletcrit*); **PDW** – расподела тромбоцита по волумену (*platelet distribution width*). Ниво значајности * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.2.3.2. Леукоцитарна формула

Вредности параметара леукоцитарне формуле између пацијената и контроле, биле су статистички значајно веће у уделу неутрофила и значајно мање у уделу лимфоцита, код пацијената са РА. Код осталих параметара није било статистички значајне разлике између посматраних група.

Вредности праћених параметара леукоцитарне формуле као и статистички значајна разлика између група приказане су у табели 15б.

Табела 15б. Вредности параметара леукоцитарне формуле у контролној и експерименталној групи.

Леукоцитарна формула	Контрола	РА
Леукоцити ($10^9/L$)	$6,51 \pm 1,98$	$7,58 \pm 3,02$
Неутрофили (%)	$56,95 \pm 6,40^{**}$	$61,92 \pm 9,28$
Лимфоцити (%)	$32,71 \pm 5,68^{**}$	$27,87 \pm 7,79$
Моноцити (%)	$7,30 \pm 1,63$	$6,97 \pm 2,65$
Еозинофили (%)	$2,41 \pm 1,50$	$2,59 \pm 1,43$
Базофили (%)	$0,63 \pm 0,22$	$0,65 \pm 0,42$
Неутрофили (#) ($10^9/L$)	$3,77 \pm 1,62^*$	$4,76 \pm 2,69$
Лимфоцити (#) ($10^9/L$)	$2,08 \pm 0,50$	$2,02 \pm 0,81$
Моноцити (#) ($10^9/L$)	$0,47 \pm 0,15$	$0,47 \pm 0,19$
Еозинофили (#) ($10^9/L$)	$0,15 \pm 0,09$	$0,17 \pm 0,1$
Базофили (#) ($10^9/L$)	$0,04 \pm 0,02$	$0,04 \pm 0,03$

Вредности су представљене као средња вредност \pm стандардна девијација. % - удео параметра у укупној запремини; # - апсолутни број ћелија. Ниво значајности $*p < 0,05$; $**p < 0,01$.

4.2.4. Утицај менопаузе на хематолошке параметре

4.2.4.1. Крвна слика

Вредности хематолошких параметара праћених у популацији оболелих од РА у поређењу са контролом а посматраних на основу менопаузе, биле су статистички значајно различите између посматраних подгрупа осим концентрације еритроцита и вредности МСНС – просечне концентрација хемоглобина на литар еритроцита.

Вредности праћених параметара као и статистички значајна разлика између подгрупа приказане су у табели 16а.

Табела 16а. Вредности хематолошких параметара у контролној и експерименталној групи посматране на основу менопаузе.

Параметар	(1) Контрола пременопауза	(2) Контрола менопауза	(3) РА пременопауза	(4) РА менопауза
Еритроцити ($10^{12}/L$)	4,43 ± 0,34	4,55 ± 0,35	4,36 ± 0,32	4,38 ± 0,36
Хемоглобин (g/L)	126,54 ± 19,97 ^{a*}	137,96 ± 10,21 ^{d**, e*}	126,79 ± 11,56	132,55 ± 10,67
Хематокрит (L/L)	0,39 ± 0,05 ^{a*}	0,42 ± 0,03 ^{d**}	0,38 ± 0,04	0,40 ± 0,03
MCV (fL)	86,75 ± 8,28 ^{a*, c*}	91,52 ± 3,48 ^{d*}	87,57 ± 6,89	91,41 ± 5,48
MCH (pg)	28,43 ± 3,48 ^{a*, c*}	30,30 ± 1,41	29,30 ± 2,26	30,46 ± 1,82
МСНС (g/L)	327 ± 12,50	332,04 ± 3,49	331,15 ± 10,98	332,14 ± 10,34
RDW	14,94 ± 2,48 ^{a*}	13,59 ± 0,72 ^{d**, e**}	15,60 ± 1,96	15,06 ± 1,63
Тромбоцити ($10^9/L$)	295,83 ± 81,53 ^{c*}	253,40 ± 52,29	262,03 ± 53,83	234,63 ± 59,50
MPV (fL)	8,93 ± 0,88	9,44 ± 0,96 ^{e*}	9,36 ± 1,53	8,90 ± 1,02
PCT	0,26 ± 0,07 ^{c*}	0,24 ± 0,04	0,23 ± 0,04	0,21 ± 0,05
PDW	16,49 ± 0,68	16,52 ± 0,60 ^{e**}	16,19 ± 1,32	16,40 ± 0,56

Вредности су представљене као средња вредност ± стандардна девијација. **MCV** – просечни волумен еритроцита (*mean cell volume*); **MCH** – просечна количина хемоглобина у еритроциту (*mean hemoglobin concentration*); **МСНС** – просечна концентрација хемоглобина на литар еритроцита (*mean cell hemoglobin concentration*); **RDW** – мера варијабилности величине еритроцита (*red blood cell distribution width*); **MPV** – просечан

волумен тромбоцита (*mean platelets volume*); **PCT** – запремински удео тромбоцита у јединици пуне крви (*plateletcrit*); **PDW** – расподела тромбоцита по волумену (*platelet distribution width*). Статистичка значајност између група: ^a1 и 2; ^b1 и 3; ^c1 и 4; ^d2 и 3; ^e2 и 4; ^f3 и 4 са нивоом значајности * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.2.4.2. Леукоцитарна формула

Вредности параметара леукоцитарне формуле између пацијената и контроле, поматраних на основу менопаузе, биле су статистички значајно веће у уделу неутрофила и значајно мање у уделу лимфоцита, код пацијената са РА. Поред тога, концентрација леукоцита је била највећа код пременопаузалних пацијената и статистички значајно већа у односу на обе контролне подгрупе. Код осталих параметара није било статистички значајне разлике између посматраних група.

Вредности праћених параметара леукоцитарне формуле као и статистички значајна разлика између подгрупа приказане су у табели 166.

Табела 166. Вредности параметара леукоцитарне формуле у контролној и експерименталној групи посматрани у односу на менопаузу.

Леукоцитарна формула	(1) Контрола пременопауза	(2) Контрола менопауза	(3) РА пременопауза	(4) РА менопауза
Леукоцити ($10^9/L$)	$6,19 \pm 1,50^{b*}$	$6,65 \pm 2,15^{d*}$	$9,01 \pm 3,71$	$7,07 \pm 2,62$
Неутрофили (%)	$56,89 \pm 5,44^{b**}$	$56,97 \pm 6,83^{d**}$	$68,41 \pm 10,29^{f**}$	$59,62 \pm 7,84$
Лимфоцити (%)	$32,78 \pm 5,50^{b**}$	$32,68 \pm 5,84^{d**}$	$22,01 \pm 7,03^{f**}$	$29,95 \pm 6,94$
Моноцити (%)	$7,47 \pm 1,63$	$7,23 \pm 1,65$	$6,80 \pm 3,16$	$7,03 \pm 2,49$
Еозинофили (%)	$2,22 \pm 1,16$	$2,49 \pm 1,62$	$2,14 \pm 1,03$	$2,75 \pm 1,53$
Базофили (%)	$0,64 \pm 0,22$	$0,63 \pm 0,23$	$0,64 \pm 0,42$	$0,65 \pm 0,43$
Неутрофили (#) ($10^9/L$)	$3,55 \pm 1,03^{b**}$	$3,87 \pm 1,81^{d**}$	$6,35 \pm 3,74^{f**}$	$4,19 \pm 1,98$
Лимфоцити (#) ($10^9/L$)	$2,01 \pm 0,56$	$2,11 \pm 0,47$	$1,92 \pm 0,83$	$2,05 \pm 0,81$
Моноцити (#) ($10^9/L$)	$0,45 \pm 0,10$	$0,48 \pm 0,17$	$0,54 \pm 0,22$	$0,45 \pm 0,17$
Еозинофили (#) ($10^9/L$)	$0,14 \pm 0,07$	$0,16 \pm 0,10$	$0,16 \pm 0,10$	$0,17 \pm 0,10$
Базофили (#) ($10^9/L$)	$0,04 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,02$	$0,04 \pm 0,03$	$0,04 \pm 0,03$

Вредности су представљене као средња вредност \pm стандардна девијација. % - удео параметра у укупној запремини; # - апсолутни број ћелија. Статистичка значајност између група: ^a1 и 2; ^b1 и 3; ^c1 и 4; ^d2 и 3; ^e2 и 4; ^f3 и 4 са нивоом значајности * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.2.5. Утицај реуматоидног артритиса на хемостатске параметре

Вредности хемостатских параметара праћених у популацији оболелих од РА у поређењу са контролом, биле су значајно више за фибриноген, протромбинско време и ИНР. Вредности АПТТ нису показале статистички значајну разлику између испитиваних група.

Вредности хемостатских параметара као и статистички значајна разлика између група приказане су у табели 17.

Табела 17. Вредности хемостатских параметара у контролној и експерименталној групи.

Параметар	Контрола	РА
АПТТ	28,16 ± 3,17	28,35 (3,12)
Фибриноген	3,26 ± 0,52*	3,55 (0,69)
ПТ	11,15 ± 0,67**	11,89 (1,95)
ИНР	1,01 ± 0,06**	1,08 (0,2)
%	94,42 ± 8,15**	87,71 (18,48)

Вредности су представљене као средња вредност ± стандардна девијација. АПТТ – активирано парцијално тромбoplastинско време; ПТ – протромбинско време; ИНР – интернационални нормализовани однос. Ниво значајности * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.2.6. Утицај менопаузе на хемостатске параметре

Вредности хемостатских параметара између пацијената и контроле, посматраних на основу менопаузе, биле су статистички значајно веће код пацијената са РА у односу на здраве испитанике. Вредности фибриногена, протромбинског времена као и ИНР биле су највеће у популацији предменопаузалних пацијената са РА. Вредности АПТТ нису се значајно разликовале између посматраних подгрупа.

Вредности хемостатски параметара као и статистички значајна разлика између подгрупа приказане су у табели 18.

Табела 18. Вредности хемостатских параметара у контролној и експерименталној групи посматрани у односу на менопаузу.

Параметар	(1) Контрола пременопауза	(2) Контрола менопауза	(3) РА пременопауза	(4) РА менопауза
АПТТ	28,91 ± 3,66	27,86 ± 2,95	28,26 ± 3,89	28,38 ± 2,87
Фибриноген	3,08 ± 0,59 ^{c**}	3,34 ± 0,48 ^{d*}	3,77 ± 0,57	3,47 ± 0,72
РТ	11,39 ± 0,85	11,06 ± 0,57 ^{d*, e**}	12,55 ± 3,55	11,65 ± 0,87
INR	1,03 ± 0,07	1,00 ± 0,0557 ^{d*, e**}	1,13 ± 0,30	1,06 ± 0,15
%	91,07 ± 9,98	95,79 ± 7,49 ^{e**}	87,55 ± 22,37	87,77 ± 17,32

Вредности су представљене као средња вредност ± стандардна девијација. АПТТ – активирано парцијално тромбoplastинско време; РТ – протромбинско време; INR – интернационални нормализовани однос. Статистичка значајност између група: ^a1 и 2; ^b1 и 3; ^c1 и 4; ^d2 и 3; ^e2 и 4; ^f3 и 4 са нивоом значајности * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.2.7. Параметри за одређивање серопозитивности/серонегативности

У циљу праћења серопозитивности/серонегативности, односно присуства/одсуства антитела одређивани су реума фактор и антитела на циклични цитрулисани пептид.

У табели 19 приказане су вредности за наведене параметре у целој групи оболелих од РА као и вредности праћене на основу менопаузе.

Табела 19. Вредности параметара за одређивање серопозитивности/серонегативности у целој РА групи и на основу менопаузе.

Параметар	РА	РА	РА
		пременопауза	менопауза
Реума фактор	91,50 ± 71,43	81,27 ± 41,10	95,13 ± 79,74
Реума фактор (позитивни/цела подгрупа)	36/42 (85,71%)	10/11 (90,90%)	26/31 (72,2%)
анти-ССР антитела	173,05 ± 128,68	166,09 ± 104,22	175,52 ± 137,78
анти-ССР антитела (позитивни/цела подгрупа)	40/42 (95,24%)	11/11 (100%)	29/31 (93,5%)

Вредности су представљене као средња вредност ± стандардна девијација. **анти-ССР антитела** – антитела на циклични цитрулисани пептид.

4.3. Микропартикуле – врста и концентрација микропартикула

4.3.1. Укупна концентрација микропартикула

Вредности укупне концентрације МП значајно су се разликовале између све три испитиване групе.

Укупна концентрације МП била је статистички значајно мања у тритон групи у односу на контролну групу ($p < 0,01$) као и на групу пацијента ($p < 0,01$).

Укупна концентрација МП била је статистички значајно мања у односу на пацијенте оболеле од РА ($p < 0,01$).

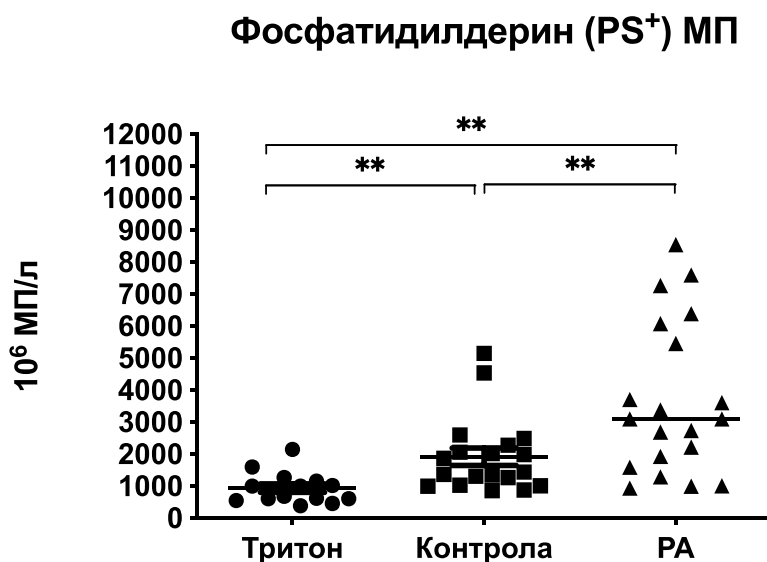


График 4. Укупна концентрација микропартикула у тритон, контролној и екперименталној групи. Ниво значајности * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Табела 20. Укупна концентрација микропартикула у тритон, контролној и екперименталној групи.

	Медијана (минимум-максимум)	Концентрација МП/л (10^6)
Тритон група	835,00 (383,00 – 2146,00)	931,57
Контрола	1430,00 (853,00 – 5145,00)	1915,84
РА	3095,00 (937,00 – 8541,00)	3678,20

Вредности су представљене као медијана (минимум – максимум).

а

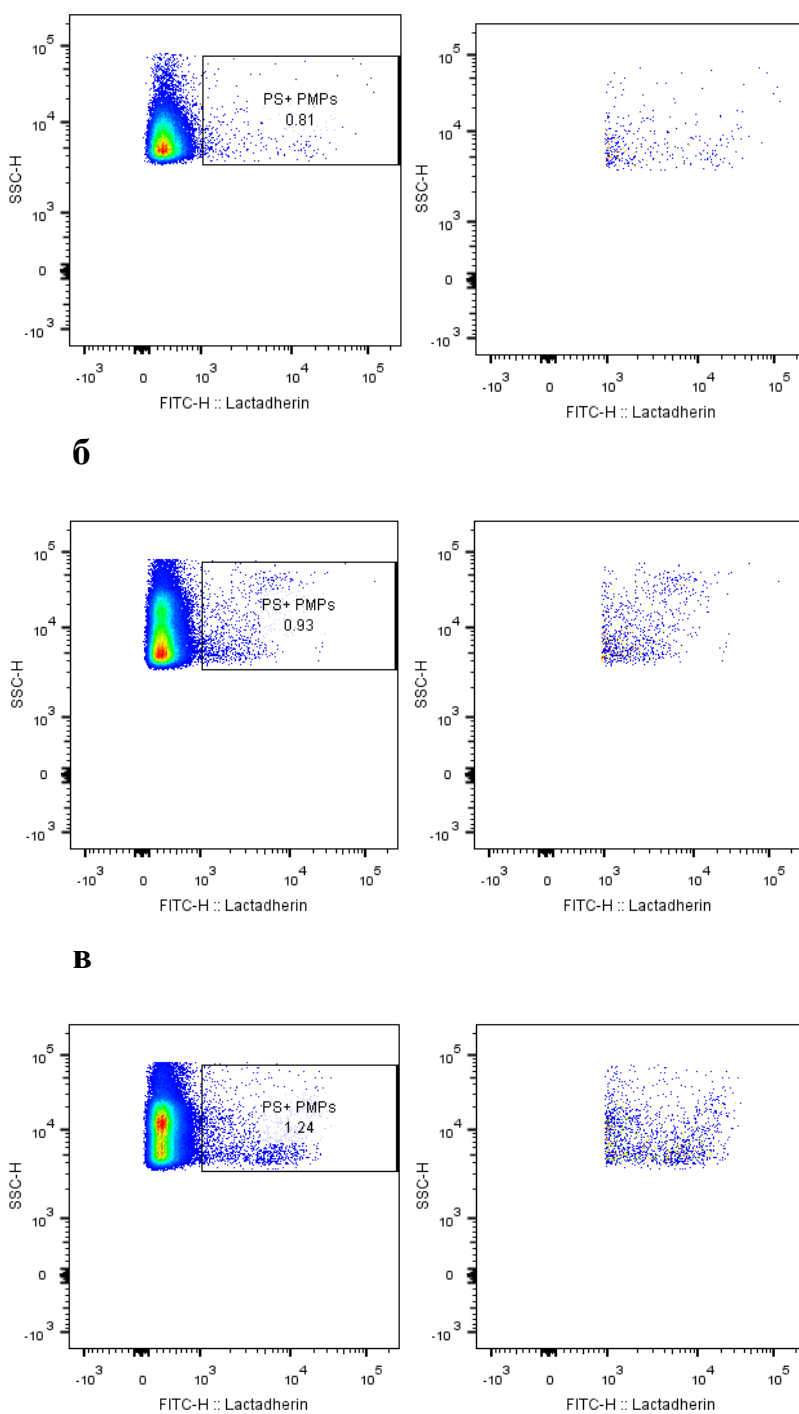


График 5. Репрезентативни узорци који представљају укупну концентрацију микропартикула у узорку: **а** – тритон групи; **б** – контролној групи; **в** – експерименталној групи.

4.3.2. Концентрација различитих врста микропартикула у контролној и експерименталној групи

4.3.2.1. Концентрација микропартикула које потичу од тромбоцита ($CD42^+$)

Вредности концентрације МП су се значајно разликовале између све три испитиване групе (График 6).

Концентрације МП које потичу од тромбоцита била је статистички значајно мања у тритон групи у односу на контролну групу ($p < 0,01$) као и на групу пацијента ($p < 0,01$).

Концентрација МП који потичу од тромбоцита била је статистички значајно мања у односу на пацијенте оболеле од РА ($p < 0,01$).

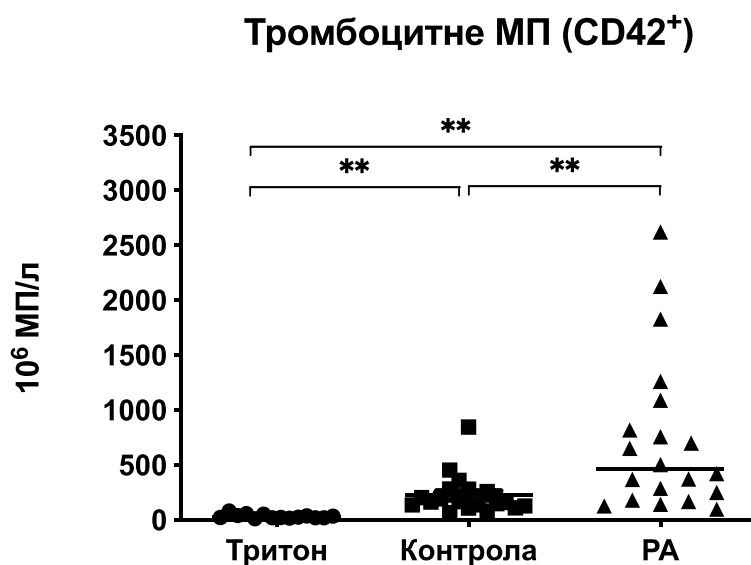


График 6. Концентрација тромбоцитних микропатикула у тритон, контролној и експерименталној групи. Ниво значајности * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Табела 21. Концентрација тромбоцитних микропатикула у тритон, контролној и експерименталној групи.

	Медијана (минимум-максимум)	Концентрација МП/л (10^6)
Тритон група	25,31 (13,13 – 81,88)	34,97
Контрола	163,75 (69,38 – 847,50)	226,97
РА	465,00 (101,88 – 2624,38)	741,13

Вредности су представљене као медијана (минимум – максимум).

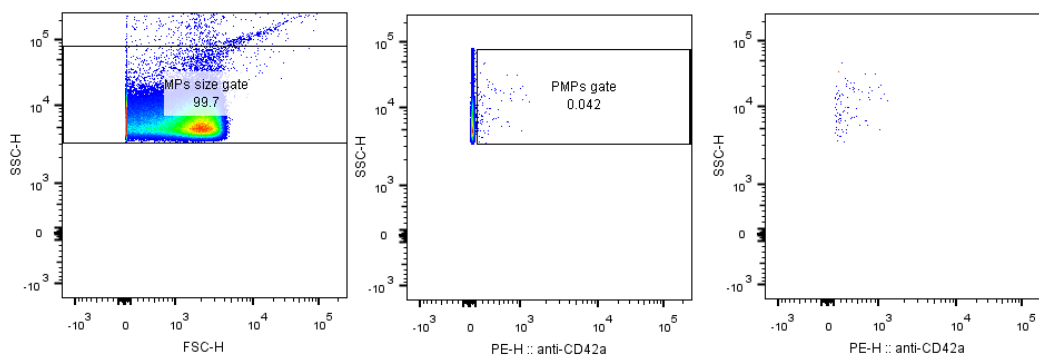
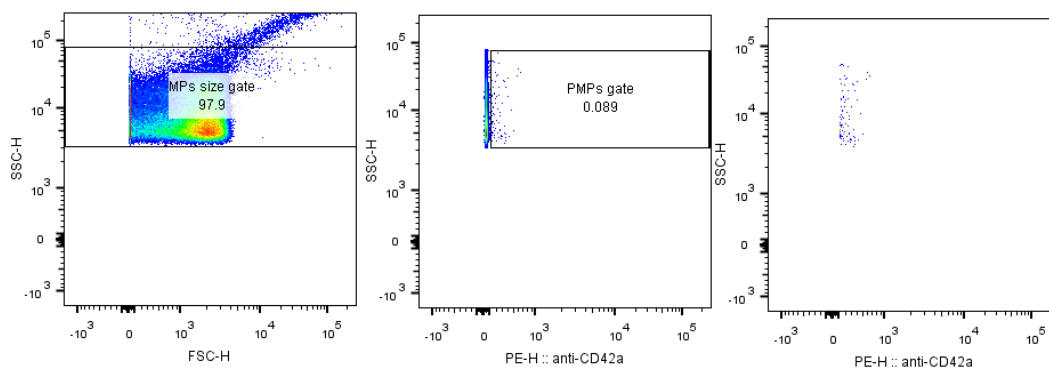
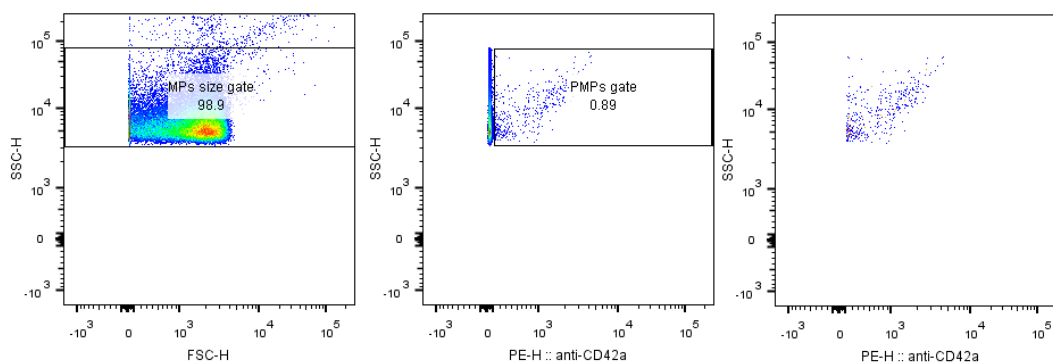
а**б****в**

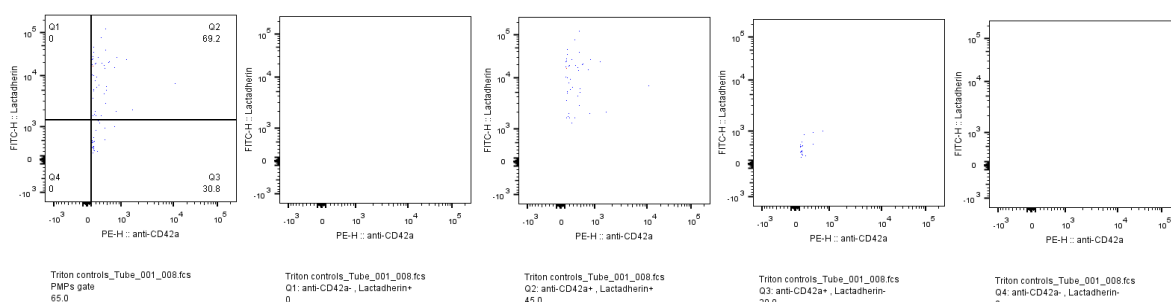
График 7. Репрезентативни узорци који представљају концентрацију микропартикула који потичу од тромбоцита ($CD42^+$) **а** – тритон групи; **б** – контролној групи; **в** – експерименталној групи.

4.3.2.2. Микрочестице које потичу од тромбоцита ($CD42^+$) на основу присуства/одсуства фосфатидилсерина PS^+/PS^-

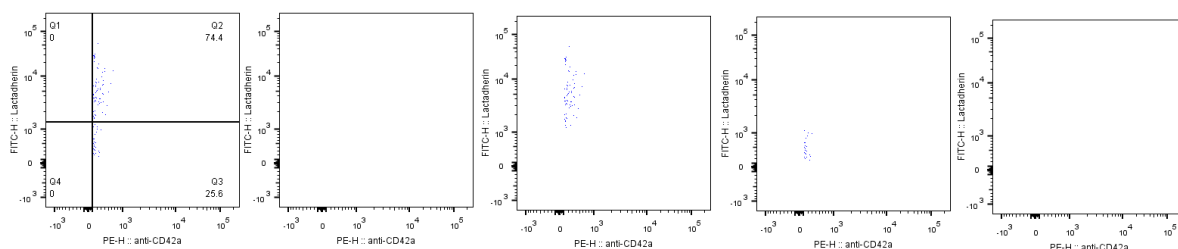
Табела 22. Удео микрочестица на основу експримирања/неекспримирања различитих антигена на својој површини

	Q1: $CD42^+ PS^+$	Q2: $CD42^+ PS^-$	Q3: $CD42^- PS^+$	Q4: $CD42^- PS^-$
CD42 Контрола	/	63.23 ± 22.21	36.77 ± 22.21	/
CD42 PA	/	54.35 ± 28.02	45.65 ± 28.02	/

а



б



в

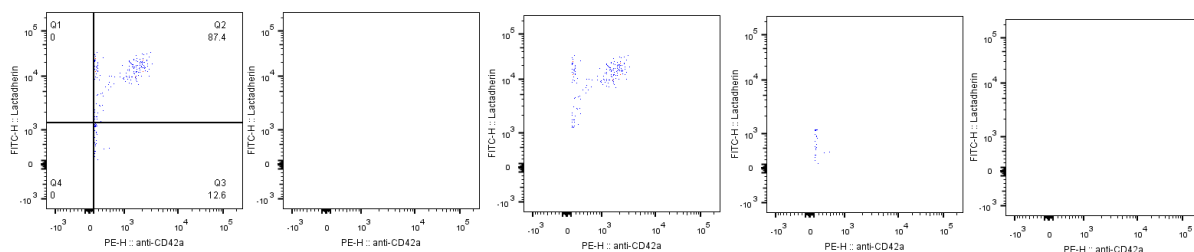


График 8. Репрезентативни узорци који представљају концентрацију микрочестица које потичу од тромбоцита ($CD42^+$) **а** – тритон групи; **б** – контролној групи; **в** – експерименталној групи.

4.3.2.3. Концентрација микропарткуле које потичу од моноцита ($CD14^+$)

Вредности концентрације МП су се значајно разликовале између тритон групе и пацијената са РА. Највећа концентрација МП које потичу од моноцита била је у групи пацијената оболелих од РА.

Концентрације МП које потичу од моноцита била је статистички значајно мања у тритон групи у односу на пацијенте са РА ($p < 0,01$)

Између осталих група није показана статистички значајна разлика.

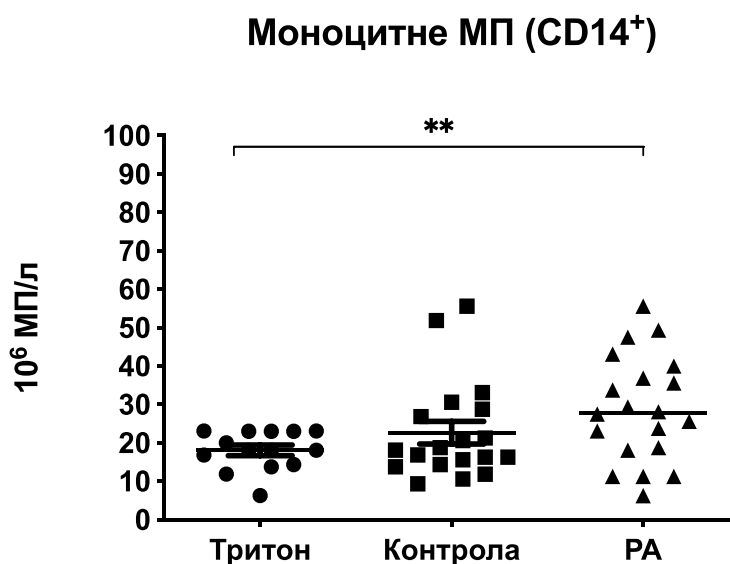


График 9. Концентрација моноцитних микропарткула у тритон, контролној и експерименталној групи. Ниво значајности * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Табела 23. Концентрација моноцитних микропарткула у тритон, контролној и експерименталној групи.

	Медијана (минимум-максимум)	Концентрација МП/л (10^6)
Тритон група	18,13 (6,25 – 23,13)	18,05
Контрола	18,13 (9,38 – 55,63)	22,67
РА	27,81 (6,25 – 55,63)	28,81

Вредности су представљене као медијана (минимум – максимум).

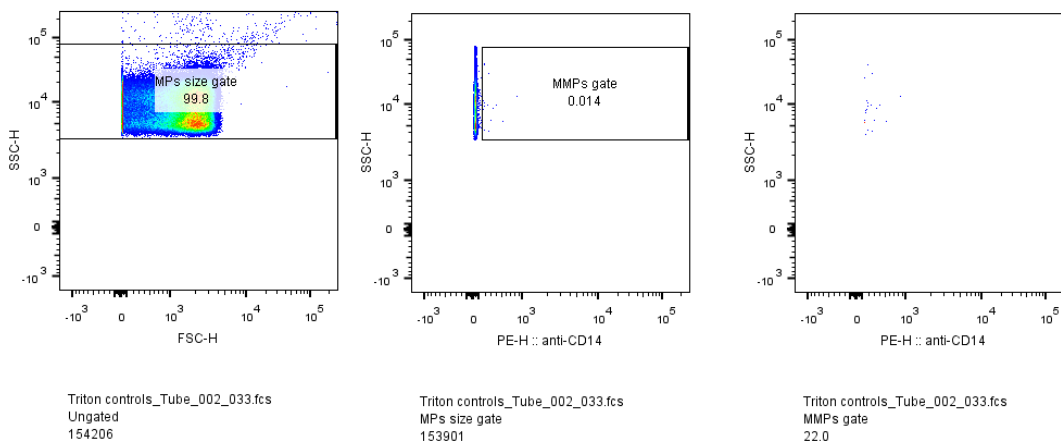
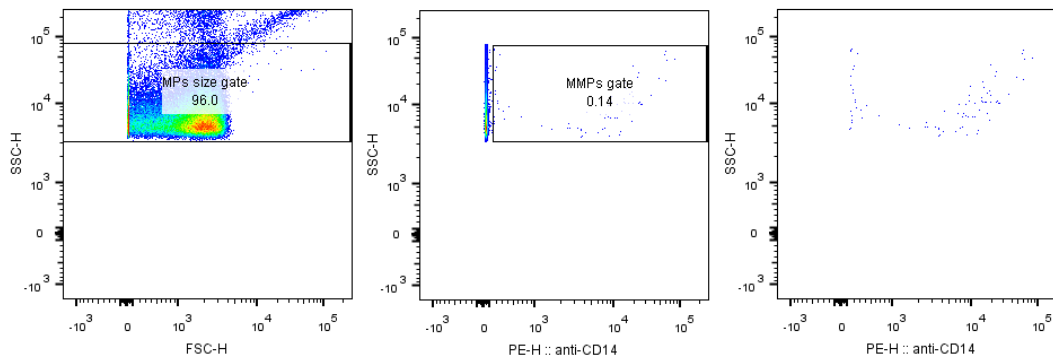
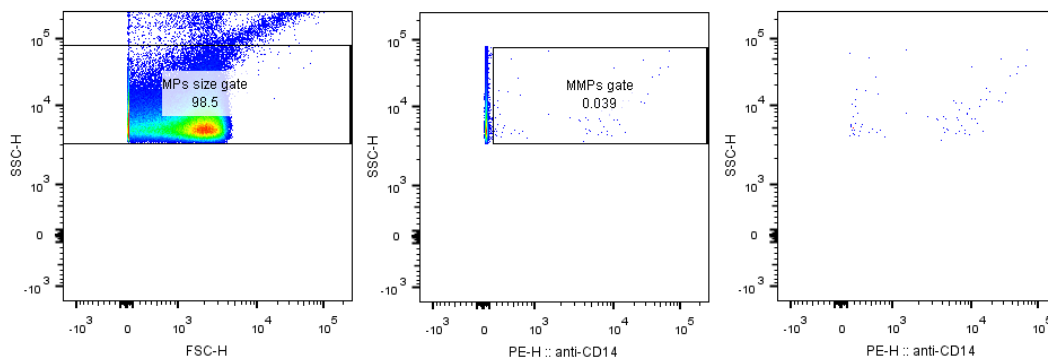
а**б****в**

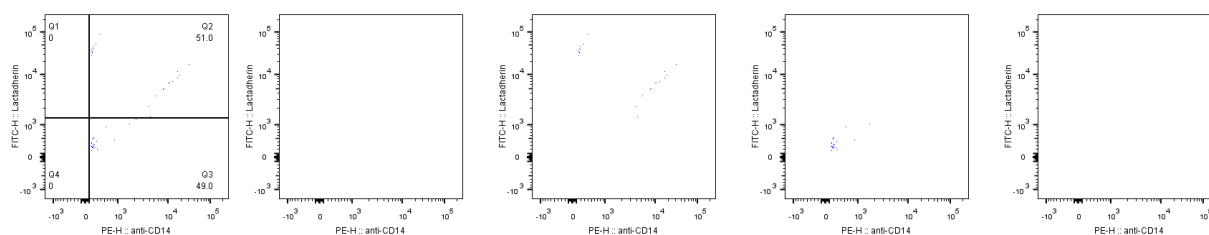
График 10. Репрезентативни узорци који представљају концентрацију микропартикула који потичу од моноцита ($CD14^+$) **а** – тритон групи; **б** – контролној групи; **в** – експерименталној групи.

4.3.2.4. Микрочестице које потичу од моноцита ($CD14^+$) на основу присуства/одсуства фосфатидилсерина PS^+/PS^-

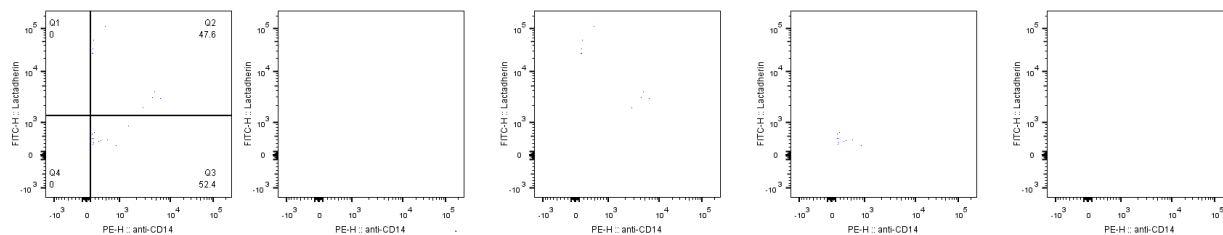
Табела 24. Удео микрочестица на основу експримирања/неекспримирања различитих антигена на својој површини

	Q1: \square \square anti-CD42a- Lactadherin+	Q2: \square anti-CD42a+ Lactadherin+	Q3: \square anti-CD42a+ Lactadherin-	Q4: \square anti-CD42a- Lactadherin-
CD14 Контрола	/	38.50 ± 23.41	61.50 ± 23.41	/
CD14 PA	/	37.45 ± 20.45	62.55 ± 20.45	/

а



б



в

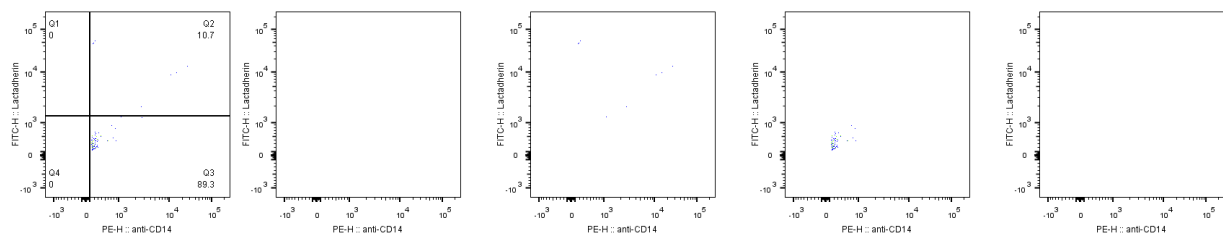


График 11. Репрезентативни узорци који представљају концентрацију микрочестица који потичу од моноцита ($CD14^+$) **а** – тритон групи; **б** – контролној групи; **в** – експерименталној групи.

4.3.2.5. Концентрација микропартикуле које потичу од леукоцита ($CD45^+$)

Вредности концентрације МП које потичу од леукоцита значајно су се разликовале између тритон групе и пацијената са РА. Највећа концентрација МП које потичу од леукоцита била је у групи пацијената оболелих од РА.

Концентрације МП које потичу од леукоцита била је статистички значајно мања у тритон групи у односу на пацијенте са РА ($p < 0,01$)

Између осталих група није показана статистички значајна разлика.

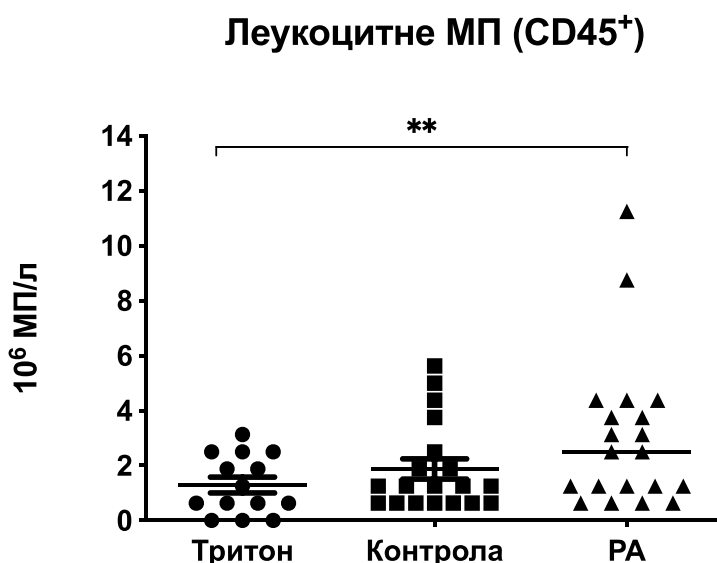


График 12. Концентрација леукоцитних микропартикула у тритон, контролној и експерименталној групи. Ниво значајности * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Табела 25. Концентрација леукоцитних микропартикула у тритон, контролној и експерименталној групи.

	Медијана (минимум-максимум)	Концентрација МП/л (10^6)
Тритон група	0,94 (0,00 – 3,13)	1,30
Контрола	1,25 (0,63 – 5,63)	1,88
РА	2,5 (0,63 – 11,25)	3,03

Вредности су представљене као медијана (минимум – максимум).

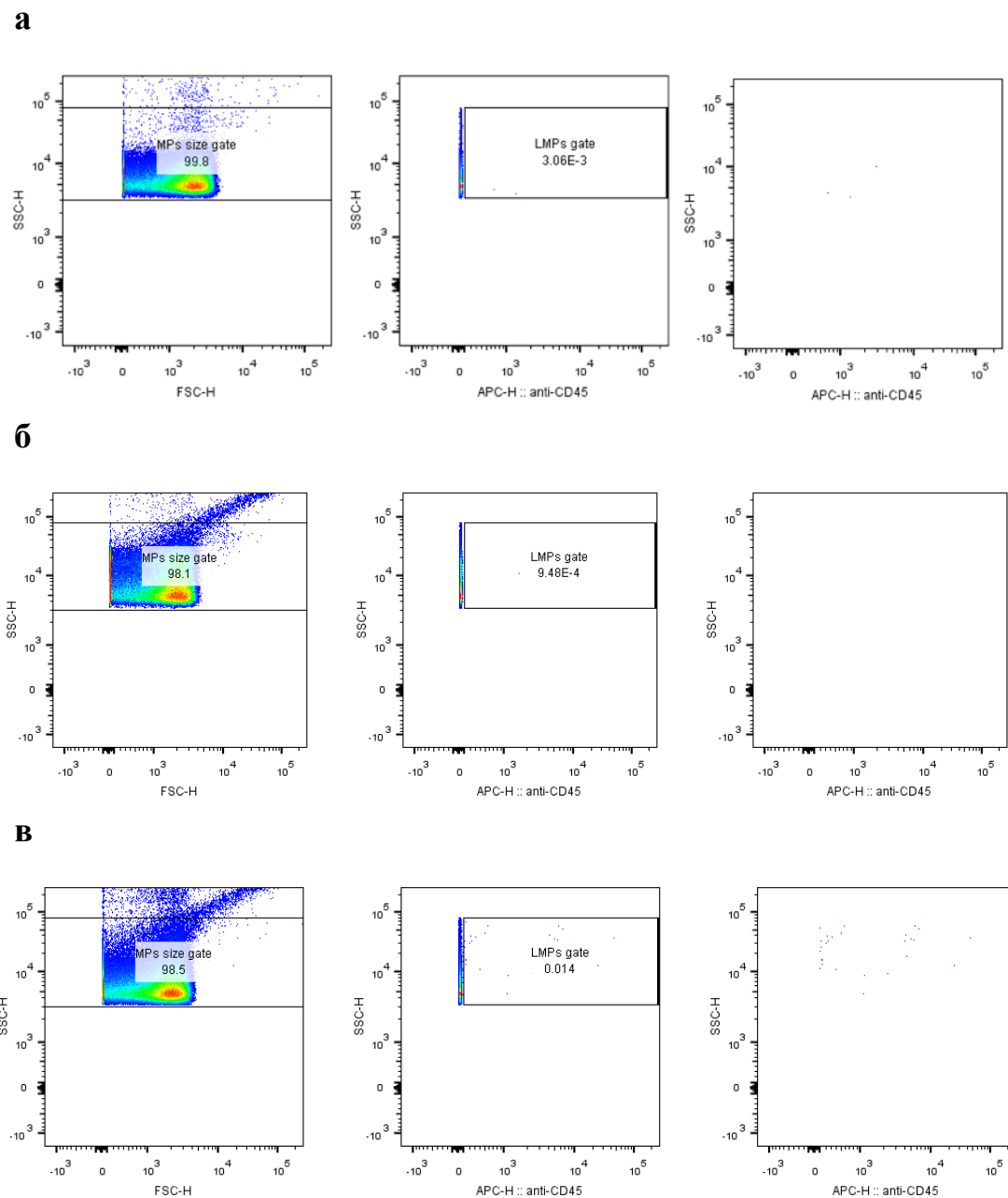


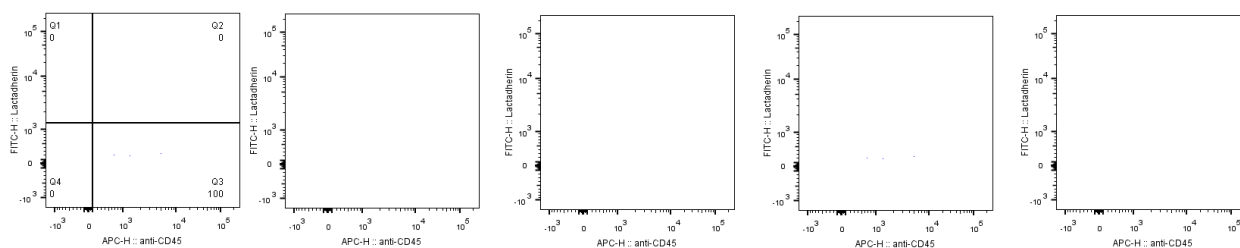
График 13. Репрезентативни узорци који представљају концентрацију микропартикула који потичу од леукоцита ($CD45^+$) **а** – тритон групи; **б** – контролној групи; **в** – експерименталној групи.

4.3.2.6. Микропартикуле које потичу од леукоцита ($CD45^+$) на основу присуства/одсуства фосфатидилсерина PS^+/PS^-

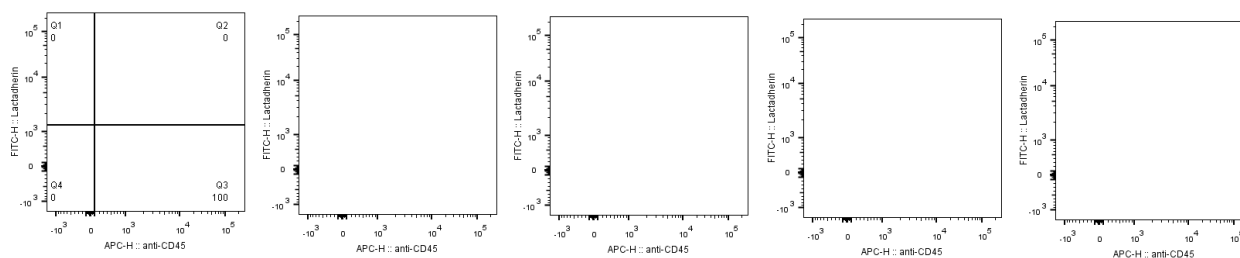
Табела 26. Удео микропартикула на основу експримирања/неекспримирања различитих антигена на својој површини

	Q1: \square \square anti-CD42a- \square Lactadherin+ \square	Q2: \square anti-CD42a+ \square Lactadherin+ \square	Q3: \square anti-CD42a+ \square Lactadherin- \square	Q4: \square anti-CD42a- \square Lactadherin- \square
CD45 Контрола	/	18.50 ± 34.17	81.50 ± 34.17	/
CD45 PA	/	14.65 ± 26.33	85.35 ± 26.33	/

а



б



в

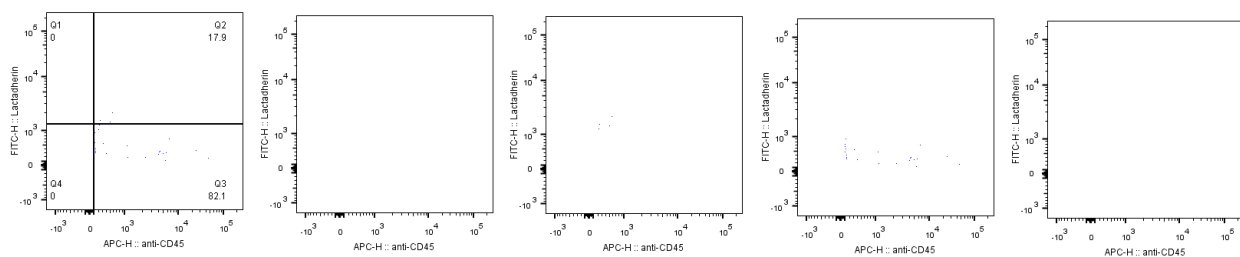


График 14. Репрезентативни узорци који представљају концентрацију микропартикула који потичу од леукоцита ($CD45^+$) **а** – тритон групи; **б** – контролној групи; **в** – експерименталној групи.

4.3.2.7. Концентрација микропартикуле које потичу од ткивног фактора (CD142⁺)

Вредности концентрације МП које потичу од ткивног фактора значајно су се разликовале између тритон групе и пацијената са РА. Највећа концентрација МП које потичу од ткивног фактора била је у групи пацијената оболелих од РА.

Концентрације МП које потичу од ткивног фактора била је статистички значајно мања у тритон групи у односу на пацијенте са РА ($p < 0,05$).

Између осталих група није показана статистички значајна разлика.

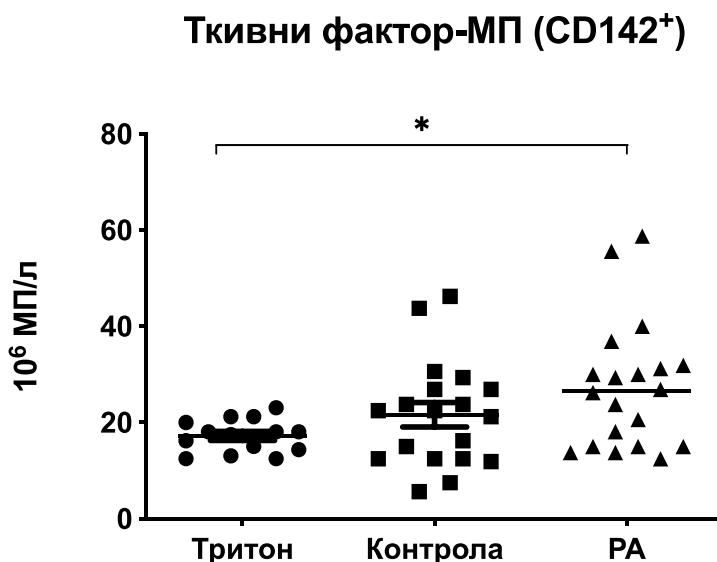


График 15. Концентрација микропатикула који потичу од ткивног фактора у тритон, контролној и експерименталној групи. Ниво значајности * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Табела 27. Концентрација микропатикула који потичу од ткивног фактора у тритон, контролној и експерименталној групи.

	Медијана (минимум-максимум)	Концентрација МП/л (10^6)
Тритон група	17,81 (12,5 – 23,13)	17,23
Контрола	22,50 (5,63 – 46,25)	21,64
РА	26,56 (12,5 – 58,75)	27,22

Вредности су представљене као медијана (минимум – максимум).

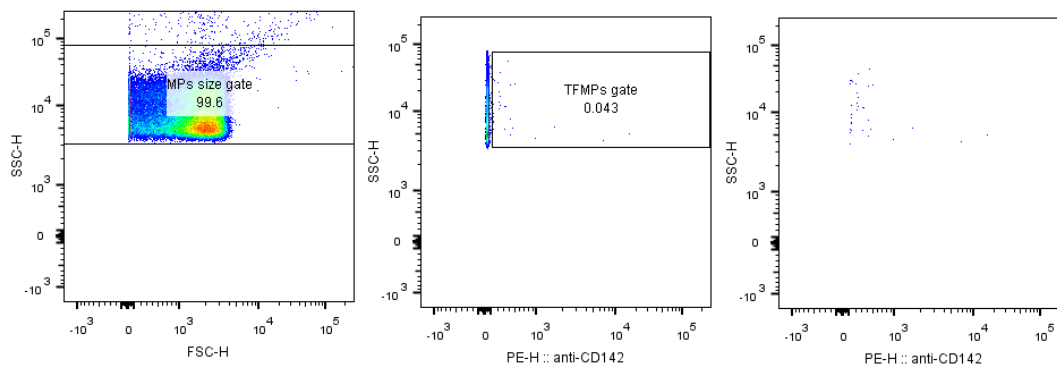
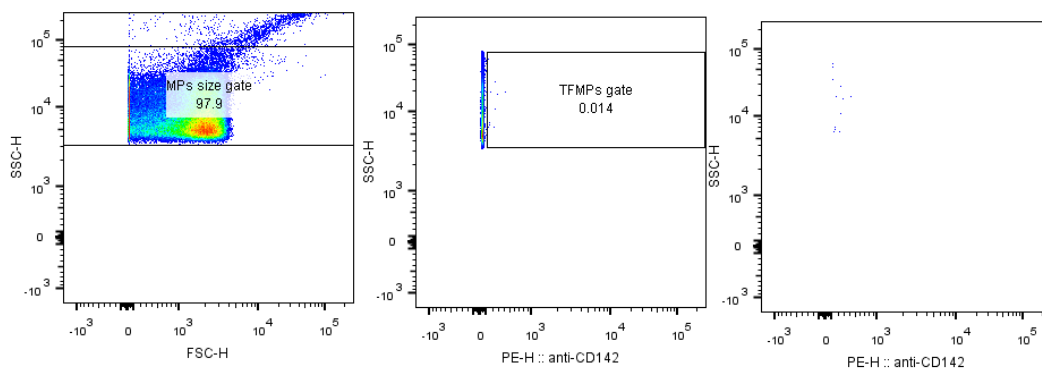
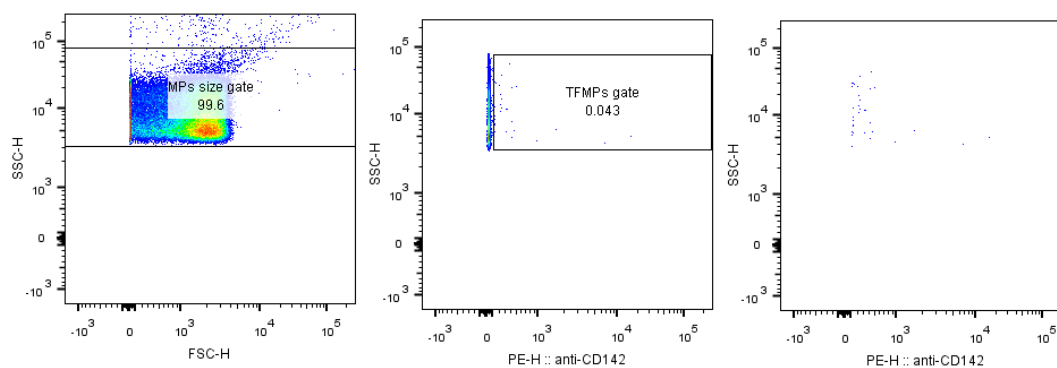
а**б****в**

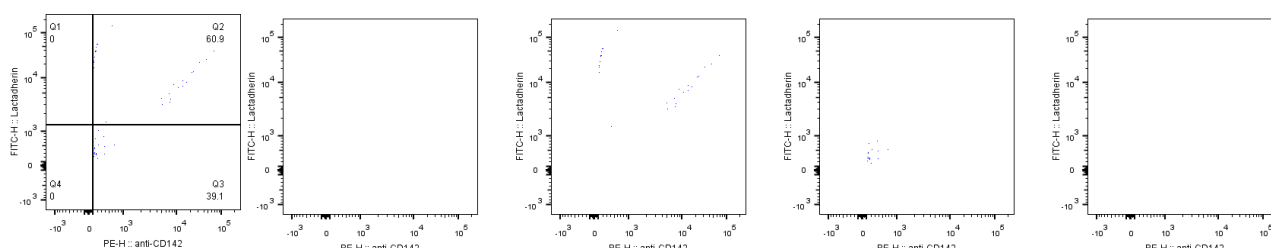
График 16. Репрезентативни узорци који представљају концентрацију микропартикула који потичу од ткивног фактора (CD142⁺) **а** – тритон групи; **б** – контролној групи; **в** – експерименталној групи.

4.3.2.8. Микропартикуле које потичу од ткивног фактора ($CD142^+$) на основу присуства/одсуства фосфатидилсерина PS^+/PS^-

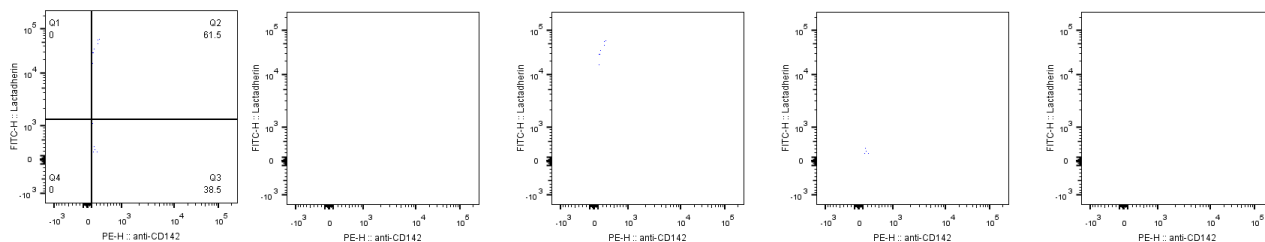
Табела 28. Удео микропартикула на основу експримирања/неекспримирања различитих антигена на својој површини

	Q1:	Q2:	Q3:	Q4:
	anti-CD42a- Lactadherin+	anti-CD42a+ Lactadherin+	anti-CD42a+ Lactadherin-	anti-CD42a- Lactadherin-
CD6142 Контрола	/	41.46 ± 23.00	58.54 ± 23.00	/
CD142 PA	/	39.13 ± 27.57	60.87 ± 27.57	/

а



б



в

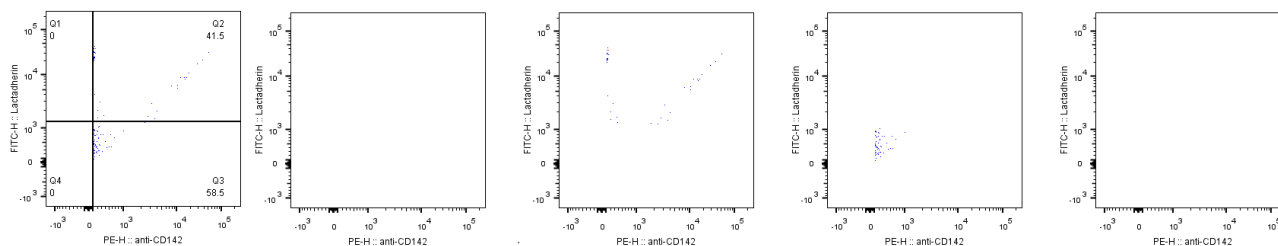


График 17. Репрезентативни узорци који представљају концентрацију микропартикула који потичу од ткивног фактора ($CD142^+$) **а** – тритон групи; **б** – контролној групи; **в** – експерименталној групи.

4.3.2.9. Концентрација микропартикуле које потичу од ендотела ($CD144^+$)

Вредности концентрације МП које потичу од ендотела значајно су се разликовале између тритон групе и пацијената са РА као и између тритон и контролне групе. Највећа концентрација МП које потичу од ендотела била је у групи пацијената оболелих од РА.

Концентрације МП које потичу од ендотела била је статистички значајно мања у тритон групи у односу на контролну групу ($p < 0,01$) као и у односу на пацијенте са РА ($p < 0,01$).

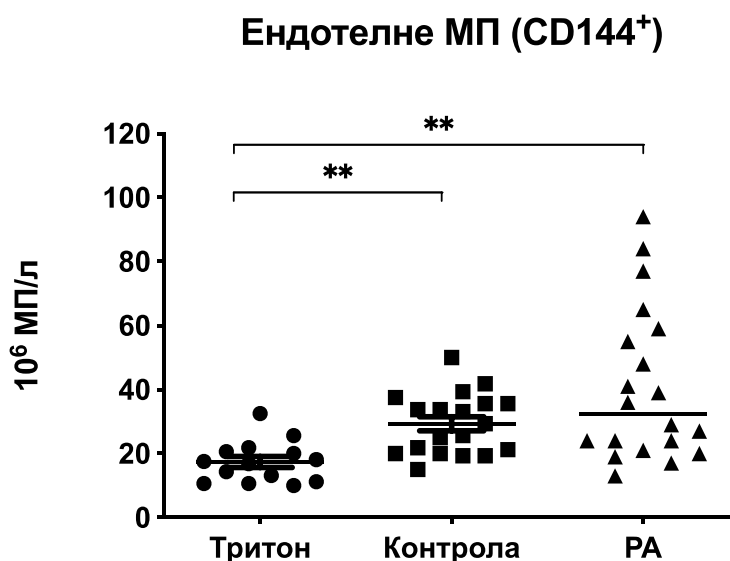


График 18. Концентрација микропартикула које потичу од ендотела у у тритон, контролној и експерименталној групи. Ниво значајности * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Табела 29. Концентрација микропартикула који потичу од ендотела у тритон, контролној и експерименталној групи.

	Медијана (минимум-максимум)	Концентрација МП/л (10^6)
Тритон група	17,19 (10,00 – 32,50)	17,40
Контрола	29,38 (15,00 – 41,88)	28,85
РА	32,81 (12,50 – 93,75)	40,81

Вредности су представљене као медијана (минимум – максимум)

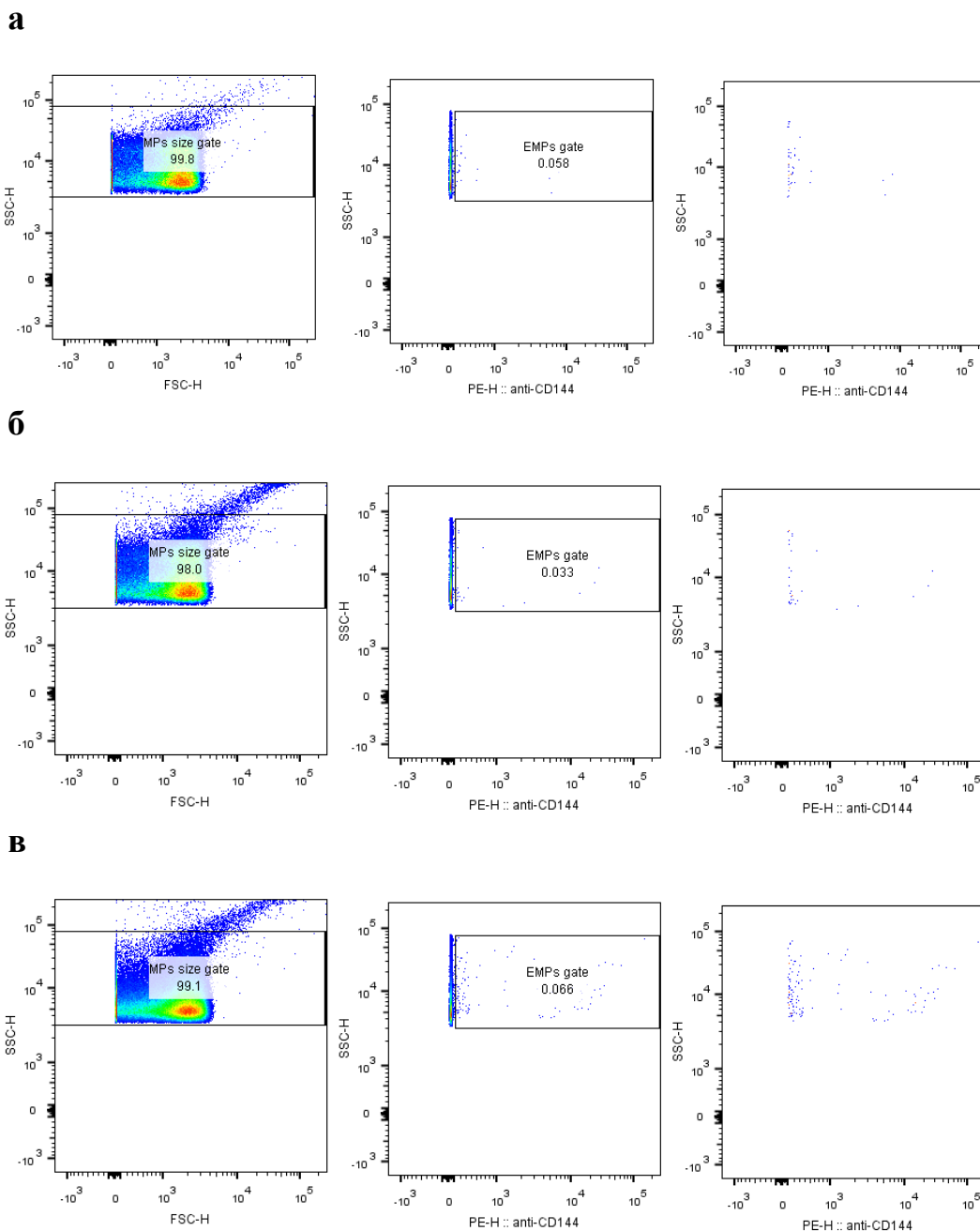


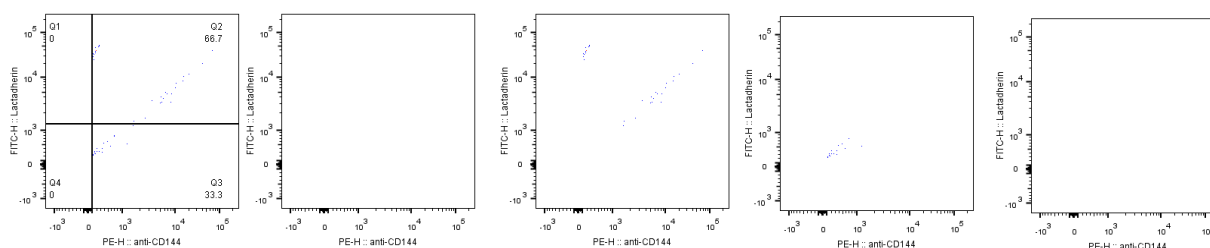
График 19. Репрезентативни узорци који представљају концентрацију микропартикула који потичу од моноцита ($CD144^+$) **а** – тритон групи; **б** – контролној групи; **в** – експерименталној групи.

4.3.2.10. Микропартикуле које потичу од ендотела ($CD144^+$) на основу присуства/одсуства фосфатидилсерина PS^+/PS^-

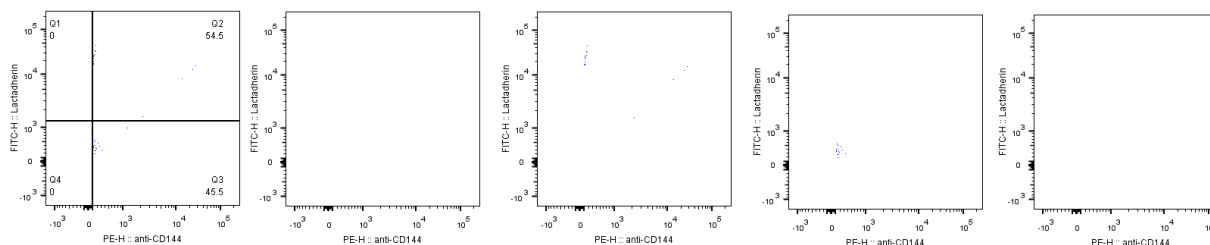
Табела 30. Удео микропартикула на основу експримирања/неекспримирања различитих антигена на својој површини

	Q1: \square \square anti-CD42a- \square Lactadherin+ \square	Q2: \square anti-CD42a+ \square Lactadherin+ \square	Q3: \square anti-CD42a+ \square Lactadherin- \square	Q4: \square anti-CD42a- \square Lactadherin- \square
CD144 Контрола	/	37.63 ± 22.00	62.37 ± 22.00	/
CD144 PA	/	48.31 ± 25.51	51.69 ± 25.51	/

а



б



в

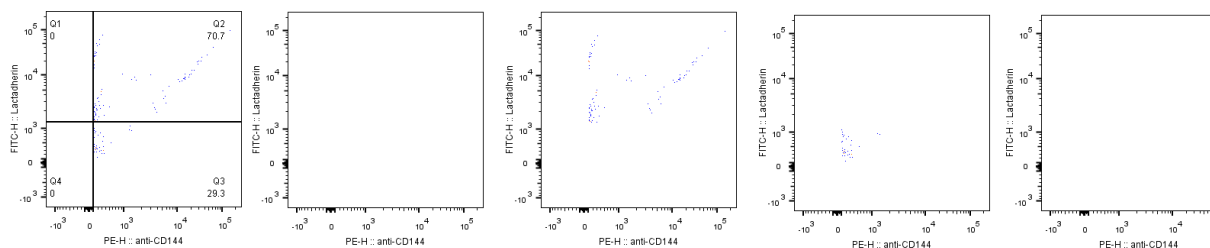


График 20. Репрезентативни узорци који представљају концентрацију микропартикула који потичу од ендотела ($CD144^+$) **а** – тритон групи; **б** – контролној групи; **в** – експерименталној групи.

4.3.2.11. П-селектин ($CD62P^+$) у контролној и експерименталној групи

Вредности П-селектина значајно су се разликовале између тритон групе и пацијената са РА као и између контролне групе и пацијента са РА. Највећа концентрација П-селектина била је у групи пацијената оболелих од РА.

Концентрација П-селектина била је статистички значајно мања у тритон групи у односу на РА групу ($p < 0,01$). Поред тога, концентрација П-селектина била је статистички значајно мања у контролној групи у односу на пацијенте са РА ($p < 0,05$).

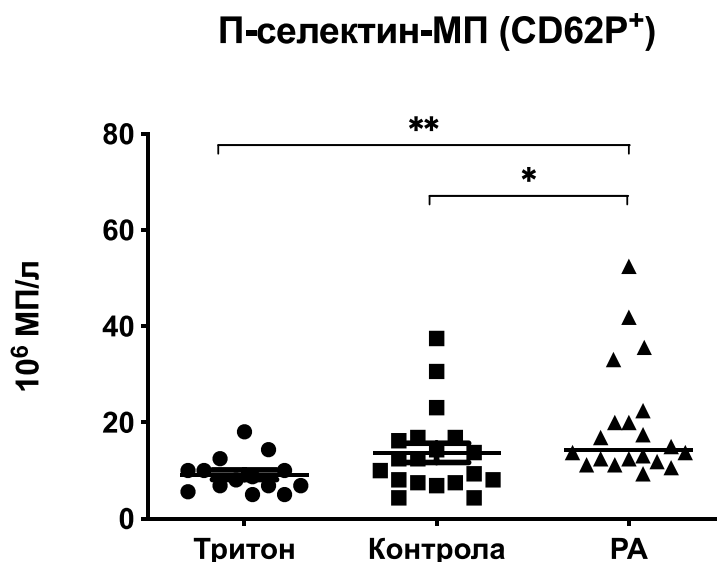


График 21. Концентрација П-селектина у тритон, контролној и експерименталној групи. Ниво значајности * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Табела 31. Концентрација П-селектина у тритон, контролној и експерименталној групи.

	Медијана (минимум-максимум)	Концентрација МП/л (10^6)
Тритон група	8,44 (5,00 – 18,13)	9,15
Контрола	12,50 (4,38 – 37,50)	13,72
РА	14,37 (9,38 – 52,50)	19,75

Вредности су представљене као медијана (минимум – максимум).

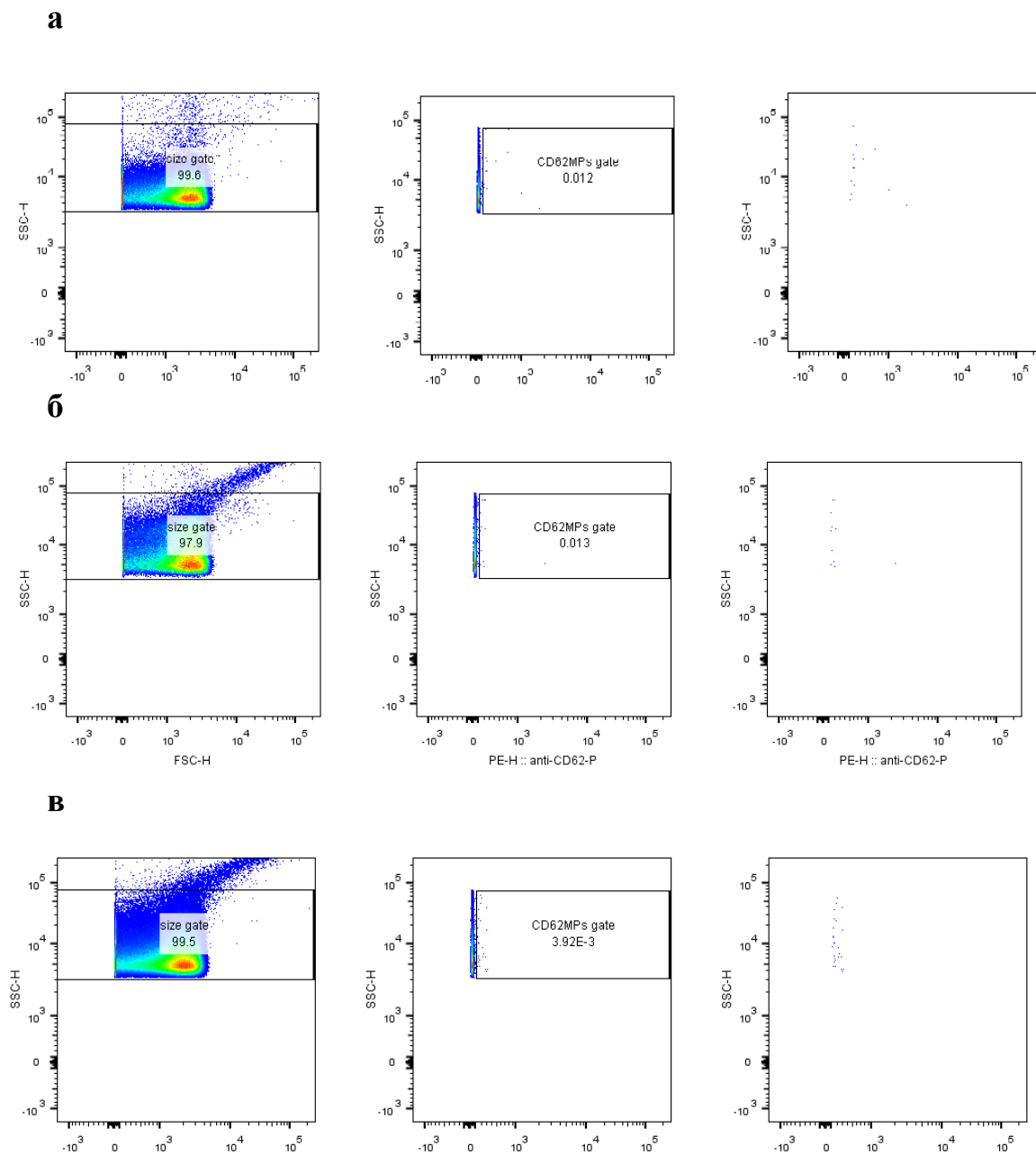


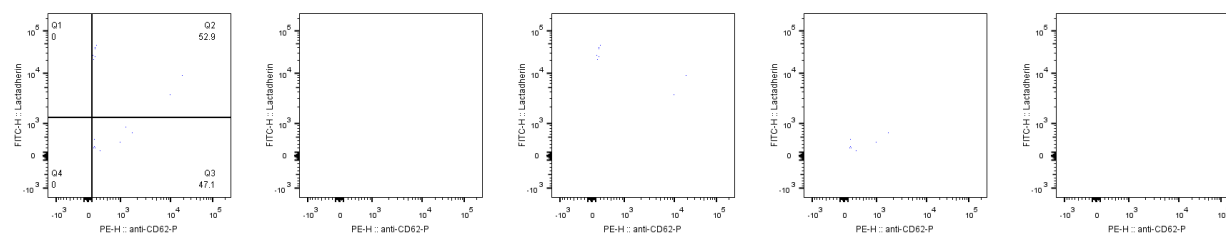
График 22. Репрезентативни узорци који представљају концентрацију микропартикула који потичу од П-селектина ($CD62P^+$) **а** – тритон групи; **б** – контролној групи; **в** – експерименталној групи.

4.3.2.12. Микропартикуле које потичу од П-селектина ($CD62P^+$) на основу присуства/одсуства фосфатидилсерина PS^+/PS^-

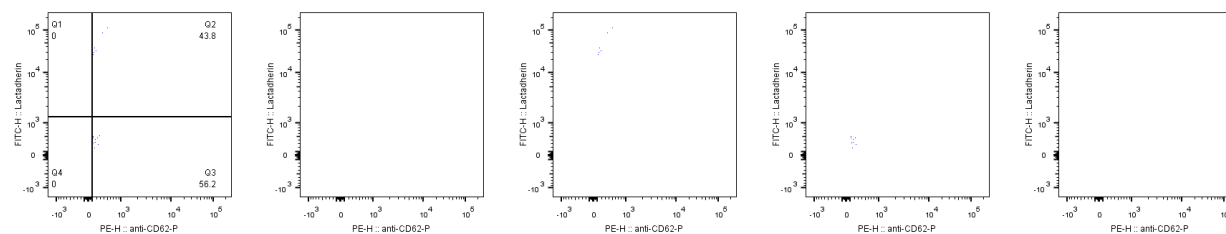
Табела 32. Удео микропартикула на основу експримирања/неекспримирања различитих антигена на својој површини

	Q1: \square anti-CD42a- Lactadherin+	Q2: \square anti-CD42a+ Lactadherin+	Q3: \square anti-CD42a+ Lactadherin-	Q4: \square anti-CD42a- Lactadherin-
CD62P Контрола	/	79.00 ± 21.27	21.00 ± 21.27	/
CD62P PA	/	76.60 ± 24.21	23.40 ± 24.21	/

а



б



в

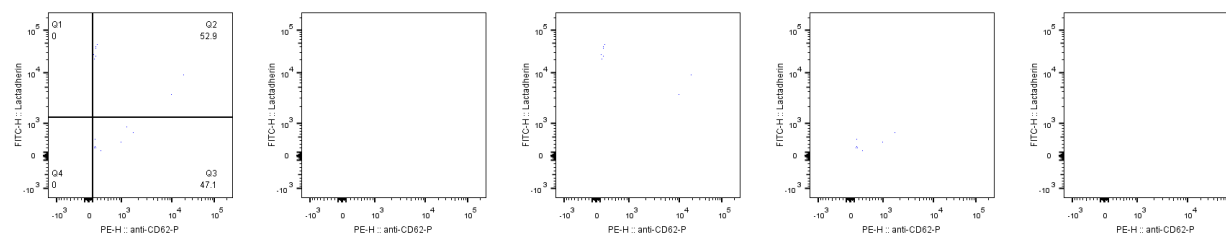


График 23. Репрезентативни узорци који представљају концентрацију микропартикула који потичу од П-селектина ($CD62P^+$) **а** – тритон групи; **б** – контролној групи; **в** – експерименталној групи.

4.3.2.13. Е-селектин ($CD62E^+$) у контролној и експерименталној групи

Вредности Е-селектина значајно су се разликовале између тритон групе и пацијената са РА. Највећа концентрација Е-селектина била је у групи пацијената оболелих од РА.

Концентрација Е-селектина била је статистички значајно мања у тритон групи у односу на РА групу ($p < 0,01$).

Између осталих група није показана статистички значајна разлика.

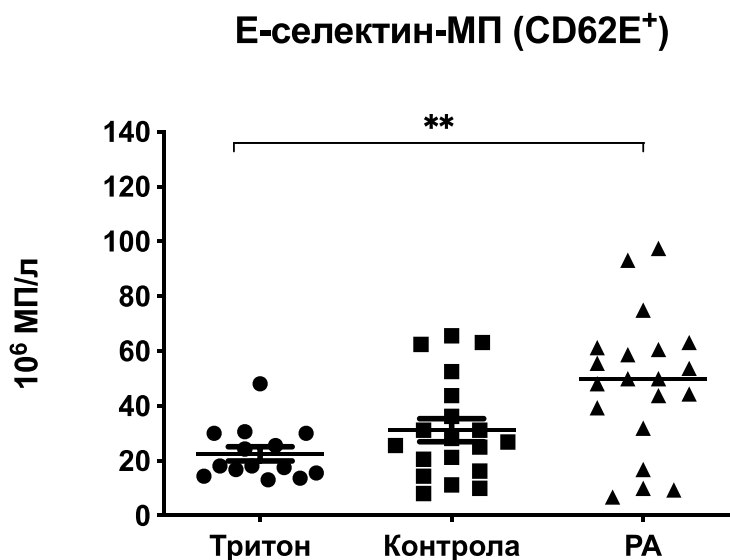


График 24. Концентрација Е-селектина у тритон, контролној и експерименталној групи. Ниво значајности * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Табела 33. Концентрација Е-селектина у тритон, контролној и експерименталној групи.

	Медијана (минимум-максимум)	Концентрација МП/л (10^6)
Тритон група	18,13 (13,13 – 48,13)	22,59
Контрола	26,88 (8,13 – 131,25)	36,51
РА	50,00 (6,90 – 97,50)	48,48

Вредности су представљене као медијана (минимум – максимум).

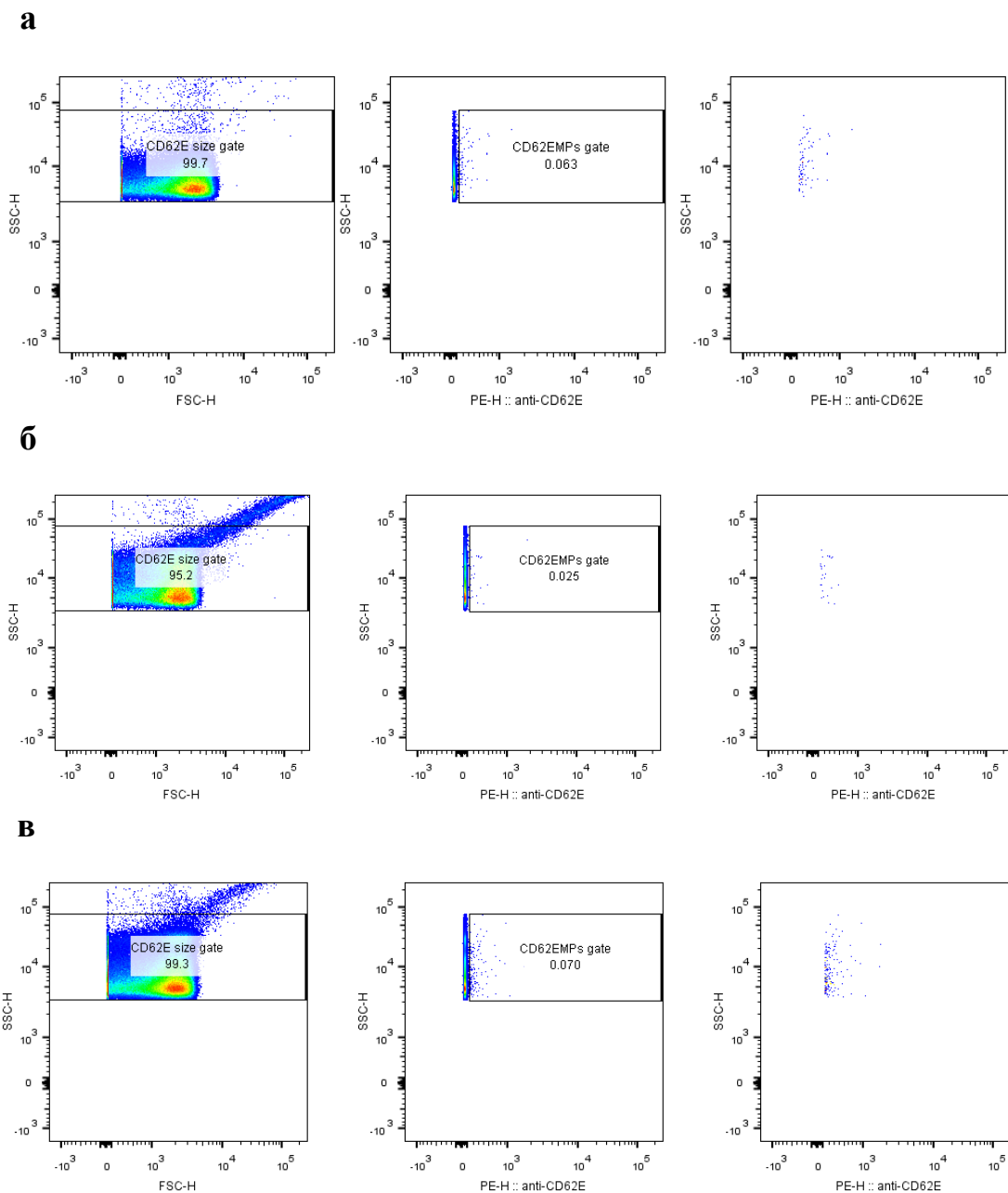


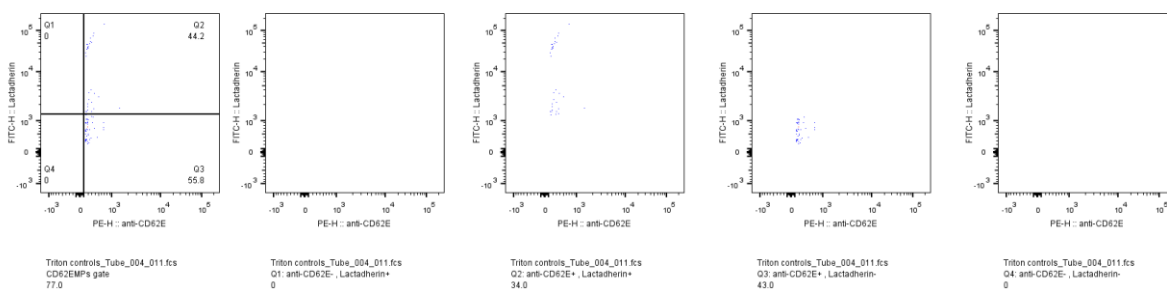
График 25. Репрезентативни узорци који представљају концентрацију микропартикула који потичу од Е-селектина ($CD62E^+$) **а** – тритон групи; **б** – контролној групи; **в** – експерименталној групи.

4.3.2.14. Микропартикуле које потичу од Е-селектина (CD62E⁺) на основу присуства/одсуства фосфатидилсерина PS⁺/PS⁻

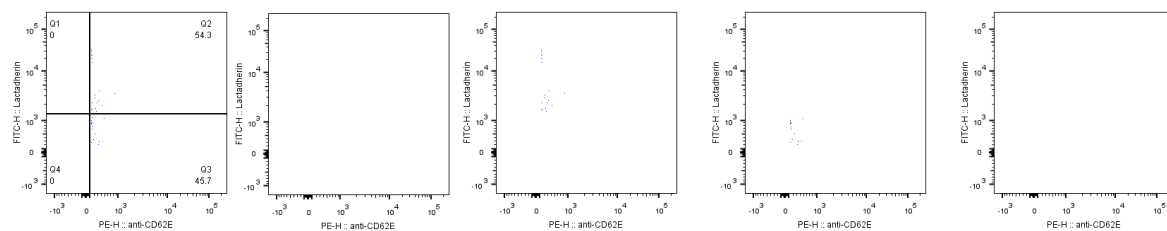
Табела 34. Удео микропартикула на основу експримирања/неекспримирања различитих антигена на својој површини

	Q1: anti-CD42a- Lactadherin+	Q2: anti-CD42a+ Lactadherin+	Q3: anti-CD42a+ Lactadherin-	Q4: anti-CD42a- Lactadherin-
CD62E Контрола	/	49.80 ± 23.00	50.20 ± 23.00	/
CD62E PA	/	48.75 ± 21.46	51.25 ± 21.46	/

а



б



в

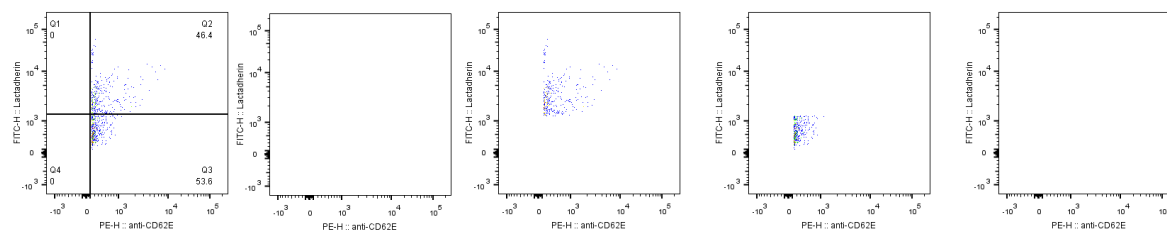


График 26. Репрезентативни узорци који представљају концентрацију микропартикула који потичу од Е-селектина (CD62E⁺) **а** – тритон групи; **б** – контролној групи; **в** – експерименталној групи.

4.4. Глобалне методе хемостазе

У нашој студији праћене су вредности тромбина, мерене ендогеним тромбин потенцијалом као и вредности фибрина праћене укупним хемостатским потенцијалом, укупним коагулационим потенцијлом и укупним фибринолитичким потенцијалом. Све вредности су посматране унутар група здравих испитаника и пацијената са РА као и на основу менопаузе. На овај начин праћен је коагулација и фибринолиза у овим популацијама као и промене настале на самом угрушку формираном у овим групама и подгрупама.

4.4.1. Утицај реуматоидног артритиса на стварање тромбина праћено ендогеним тромбин потенцијалом

Вредности параметара којима је праћено стварање тромбина (генерисани тромбин праћен као површина испод криве, време до почетка стварања тромбина, максимална концентрација тромбина, време када је постигнута максимална концентрација тромбина), нису показале статистички значајну разлику између здравих испитаника и пацијената са РА.

Вредности параметара који прате настанак тромбина приказане су у табели 35.

Табела 35. Вредности параметара који прате настанак тромбина у контролној и експерименталној групи. Ендогени тромбин потенцијал.

Параметар	Контрола	РА
ETP AUC (%)	97,39±8,22	97,24±9,84
C_{max} (%)	107,76±9,17	104,46±10,74
t_{lag} (sec)	21,89±2,15	21,96±3,83
t_{max} (sec)	66,19±11,72	66,63±13,63

Вредности су представљене као средња вредност ± стандардна девијација. **ETP AUC** – мерење укупног ендогено генерисаног тромбина представљено као површина испод криве; **t_{lag}** – време до почетка стварања тромбина; **C_{max}** – максимална концентрација тромбина; **t_{max}** – време када је постигнута максимална концентрација тромбина. Ниво значајности * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.4.2. Утицај менопаузе на настанак тромбина праћено ендогеним тромбин потенцијалом

Нивои ендогеног тромбин потенцијала, мереног као површина испод криве и максимална концентрација тромбина, били су значајано виши само у групи здравих контрола у менопаузи ($p < 0,05$) у односу на здраве контроле у менопаузи. Остали параметри којима је праћена синтеза тромбина (време до почетка стварања тромбина и време када је постигнута максимална концентрација тромбина), нису показале статистички значајне разлике у испитиваним подгрупама.

Вредности параметара који прате настанак тромбина као и статистички значајна разлика између подгрупа приказане су у табели 36.

Табела 36. Вредности параметара који прате настанак тромбина у контролној и експерименталној групи посматрани у односу на менопаузу. Ендогени тромбин потенцијал.

Параметар	(1) Контрола пременопауза	(2) Контрола менопауза	(3) РА пременопауза	(4) РА менопауза
<i>ETP AUC (%)</i>	93,06±7,96 ^{a*}	99,09±7,78	97,88±7,90	97,05±10,47
<i>C_{max} (%)</i>	102,44±6,31 ^{a*}	109,85±9,34	105,86±8,77	104,04±11,04
<i>t_{lag} (sec)</i>	21,53±1,79	22,04±2,28	23,36±5,68	21,51±3,01
<i>t_{max} (sec)</i>	67,42±10,50	65,69±12,30	63,91±8,66	67,51±14,90

Вредности су представљене као средња вредност ± стандардна девијација. *ETP AUC* – мерење укупног ендогено генерисаног тромбина представљено као површина испод криве; *t_{lag}* – време до почетка стварања тромбина; *C_{max}* – максимална концентрација тромбина; *t_{max}* – време када је постигнута максимална концентрација тромбина. Статистичка значајност између група: ^a1 и 2; ^b1 и 3; ^c1 и 4; ^d2 и 3; ^e2 и 4; ^f3 и 4 са нивоом значајности * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.4.3. Утицај реуматоидног артритиса на настанак фибрина праћено укупним хемостатским потенцијалом

Вредности параметара којима је праћено стварање фибрина (укупни хемостатски потенцијал, укупни коагулациони потенцијал, укупни фибринолитички потенцијал), нису показале статистички значајну разлику између здравих испитаника и пацијената са РА.

Вредности параметара који прате настанак фибрина приказане су у табели 37.

Табела 37. Вредности параметара који прате настанак фибрина у контролној и експерименталној групи. Укупни хемостатски потенцијал.

Параметар	Контрола	РА
ОСР (Abs-sum)	362,90±43,35	359,25±61,27
ОНР (Abs-sum)	144,71±37,73	147,70±42,17
ОФР (%)	60,12±8,17	59,24±6,59

Вредности су представљене као средња вредност ± стандардна девијација. ОСР – укупни коагулациони потенцијал; ОНР – укупни хемостатски потенцијал; ОФР – укупни фибринолитички потенцијал.

4.4.4. Утицај менопаузе на настанак фибрина праћено укупним хемостатским потенцијалом

Вредности *ОНР (sum-Abs)* су биле статистички ниже ($p < 0,01$; $p < 0,05$; $p < 0,05$, редом), док је *ОФР (%)* био значајно статистички већи ($p < 0,01$; $p < 0,01$; $p < 0,01$, редом) у пременопаузалној контролној групи у поређењу са контролама у менопаузи и пацијентима пре менопаузе, као и у менопаузи. *ОСР (sum-Abs)* је био значајно нижи у подгрупи 1 (здраве контроле пре менопаузе) у поређењу са контролама у менопаузи ($p < 0,01$).

Вредности параметара који прате настанак фибрина као и статистички значајна разлика између подгрупа приказане су у табели 38.

Табела 38. Вредности параметара који прате настанак фибрина у контролној и експерименталној групи посматрани у односу на менопаузу. Укупни хемостатски потенцијал.

Параметар	(1) Контрола пременопауза	(2) Контрола менопауза	(3) РА пременопауза	(4) РА менопауза
ОНР (Abs-sum)	116,23±36,42 ^{a**,b*,c*}	155,93±32,33	151,52±44,73	146,43±42,00
ОСР (Abs-sum)	338,96±42,11 ^{a*}	372,05±40,78	362,73±68,75	358,09±59,81
ОФР (%)	66,72±6,59 ^{a**,b**,c**}	57,60±7,31	58,62±6,06	60,1(38,1 –70,0)

Вредности су представљене као средња вредност ± стандардна девијација. **ОСР** – укупни коагулациони потенцијал; **ОНР** – укупни хемостатски потенцијал; **ОФР** – укупни фибринолитички потенцијал. Статистичка значајност између група: ^a 1 и 2; ^b 1 и 3; ^c 1 и 4; ^d 2 и 3; ^e 2 и 4; ^f 3 и 4 са нивоом значајности * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.4.5. Типичне криве агрегације фибрина и фибринолизе

Типичне криве агрегације фибрина за *ОСР* и *ОНР* код испитаника у свим испитиваним подгрупама, представљени су на Графикма 27 и 28, показујући повећану агрегацију фибрина (График 27) и продужену фибринолизу (График 28) код пацијента и контрола у менопаузи у поређењу са контролама пре менопаузе.

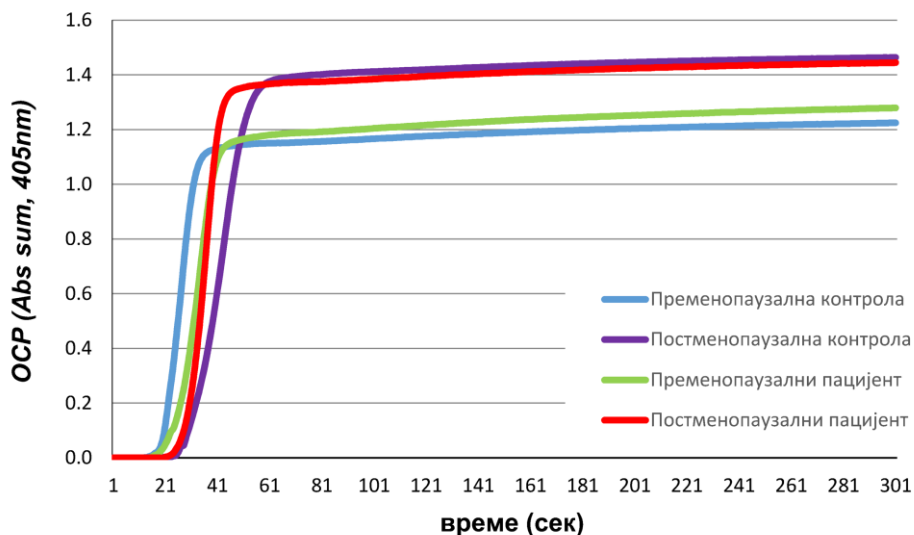


График 27. Репрезентативне криве агрегације фибрина. Укупни коагулациони потенцијал код контрола и пацијената са РА.

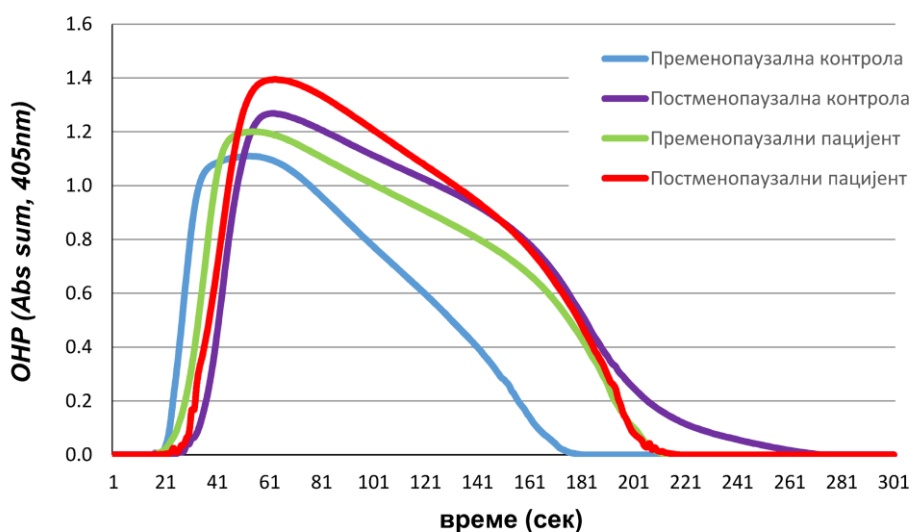


График 28. Репрезентативне криве фибринолизе. Укупни фибринолитички потенцијал код контрола и пацијената са РА.

4.4.6. Утицај реуматоидног артритиса на време лизирања угрушка (*CLT- Clot Lysis Time*)

Вредности параметара којима је праћено време лизирања угрушка, нису показале статистички значајну разлику између здравих испитаника и пацијената са РА као ни разлику са и без додавања инхибитора карбоксипептидазе.

Вредности параметара који прате време лизирања угрушка приказане су у табели 39.

Табела 39. Вредности параметара који прате време лизирања угрушка у контролној и експерименталној групи.

Параметар	Контрола	РА
<i>CLT</i> (сек)	23,61±4,82	24,14±3,72
<i>CLT PTCl</i> (сек)	18,23±3,13	17,42±3,23
ΔCLT	5,40±2,71	6,71±3,64

Вредности су представљене као средња вредност \pm стандардна девијација. *CLT* – време лизирања угрушка; *PTCl* – инхибитор карбоксипептидазе; ΔCLT – разлика између времена лизирања угрушка са и без *PTCl*. Ниво значајности * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.4.7. Утицај менопаузе на време лизирања угрушка (*CLT- Clot Lysis Time*)

Време лизирања угрушка, мерено као *CLT*, било је краће у пременопаузалним контролама у поређењу са контролама у менопаузи ($p < 0,01$) и пацијентима ($p < 0,01$ и $p < 0,01$, редом, за обе подгрупе).

Након додавања *PTCl*, инхибитора карбоксипептидазе, *CLT* је остало значајно другачије између подгрупа 1 и 2 ($p < 0,05$). Разлика између времена лизе угрушка пре и након додатка *PTCl*, праћено као параметар ΔCLT , указују на активност *TAFI* у испитиваним узорцима. У поређењу са пременопаузалним контролама, вредност ΔCLT била је већа код контрола у менопаузи ($p < 0,05$) и у обе подгрупе пацијената са РА ($p < 0,05$ и $p < 0,01$, редом), указујући на већу *TAFI* активност (инхибитора фибринолизе) у овим узорцима.

Вредности параметара који прате време лизирања угрушка као и статистички значајна разлика између подгрупа приказане су у табели 40.

Табела 40. Вредности параметара који прате време лизирања угрушка у контролној и експерименталној групи посматрани у односу на менопаузу.

Параметар	(1) Контрола пременопауза	(2) Контрола менопауза	(3) РА пременопауза	(4) РА менопауза
<i>CLT</i> (сек)	20,23±3,72 ^{a*, b*, c*}	24,9 (19,0-34,3)	24,84±3,21	23,5 (19,8-36,7)
<i>CLT PTCl</i> (сек)	16,66±2,96 ^{a*}	18,82±2,91 ^{e*}	18,13±3,78	17,14±3,05
<i>ΔCLT</i>	4,30±1,98 ^{a*, b*, c**}	5,89±2,86	6,13±3,33	6,91±3,70

Вредности су представљене као средња вредност ± стандардна девијација. *CLT* – време лизирања угрушка; *PTCl* – инхибитор карбоксипептидазе; *ΔCLT* – разлика између времена лизирања угрушка са и без *PTCl*. Статистичка значајност између група: ^a1 и 2; ^b1 и 3; ^c1 и 4; ^d2 и 3; ^e2 и 4; ^f3 и 4 са нивоом значајности * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.4.8. Турбидиметрија – анализа параметара фибринског угрушка и његове структуре

Вредностима параметара турбидиметрије, добијених на основу криве агрегације фибрина детаљније описују фазу коагулације. Параметри формирања фибринског угрушка указују на краће време до почетка коагулације у контролној групи ($p < 0,05$) и до краћег времена постизања максималне концентрације фибрина ($p < 0,05$) у односу на пацијете са РА. Вредности нагиба криве агрегације биле су веће у контролној групи у односу на пацијенте ($p < 0,05$). Код осталих праћених параметара није постојала статистички значајна разлика између посматраних група.

Вредности параметара турбидиметрије као и статистичке значајности приказане су у табели 41.

Табела 41. Вредности параметара турбидиметрије у контролној и експерименталној групи.

Параметри	Контрола	РА
lag_time (сек)	282,25 (55,25)*	331,71 (98,06)
Max_Abs	1,69 (0,20)	1,75 (0,20)
Lag_Abs_Avrg	0,47 (0,19)	0,52 (0,25)
Max_Abs_Lag_Abs	1,23 (0,16)	1,18 (0,26)
Slope	78,50 (29,20)*	64,50 (24,10)
Max_Abs_time (сек)	508,75 (120,86)*	595,14 (196,07)
Slope_time (сек)	226,50 (69,65)	263,43 (112,63)

Вредности су представљене као средња вредност \pm стандардна девијација. **lag_time** – време у којем је формирано довољно протофибрила за детекцију; **Max_Abs** – максимална апсорбанца; **Lag_Abs_Avrg** – просечна вредност апсорбанце од почетка стварања криве коагулације до lag time; **Max_Abs_Lag_Abs** – апсорбанца добијена одузимањем вредности MaxAbs и Lag Abs Avrg; **Slope** – најстрмији део криве агрегације фибрина; **Max_Abs_time** – време када се постиже максимална апсорбанца; **Slope_time** – време које се добија одузимањем Max Abs time и lag time. Ниво значајности * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.4.9. Утицај менопаузе на параметре турбидиметрије

Параметри формирања фибриноског угрушка указују на значајно краће *lag-time* (време за које је потребно да настане довољна количина фибринских нити и да отпочне коагулације) ($p < 0,05$) и ниже вредности максималне апсорбанце (*Max Abs*) код контрола пре менопаузе у поређењу са контролама у менопаузи ($p < 0,01$) као и пре- ($p < 0,05$) и пост-менопаузалним пацијенткињама ($p < 0,05$). Нагиб формирања фибрина се не разликује између подгрупа у контролној групи и експерименталној групи али су вредности овог параметра биле значајно више у контролној менопаузалној групи у поређењу са експерименталним подгрупама ($p < 0,05$). Време постизања максималне концентрације било је значајно мање у подгрупи 1 у односу на подгрупе 3 ($p < 0,05$) и 4 ($p < 0,05$).

Вредности које прате параметре турбидиметрије као и статистички значајна разлика између подгрупа приказане су у табели 42.

Табела 42. Вредности које прате параметре турбидиметрије у контролној и експерименталној групи посматрани у односу на менопаузу.

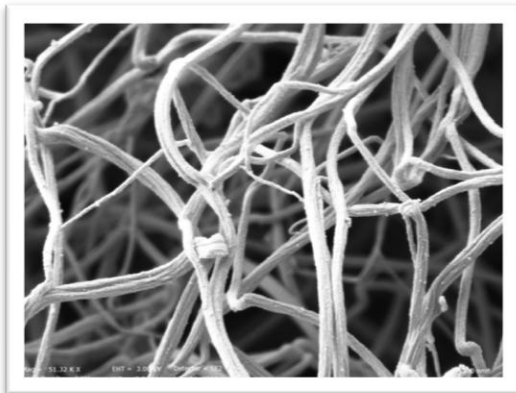
Параметар	(1) Контрола пременопауза	(2) Контрола менопауза	(3) РА пременопауза	(4) РА менопауза
lag_time (сек)	262,29 (60,25) ^{a*, b*, c*}	290,47 (51,83)	330,55 (96,20)	332,13 (100,27)
Max_Abs	1,59 (0,16) ^{a**, b*, c*}	1,73 (0,20)	1,77 (0,16)	1,75 (0,22)
Lag_Abs_Avrg	0,49 (0,20)	0,46 (0,18)	0,49 (0,21)	0,53 (0,218)
Max_Abs_Lag_Abs	1,17 (0,17)	1,26 (0,15)	1,19 (0,23)	1,18 (0,27)
Slope	76,43 (24,83)	79,35 (31,13) ^{d*, e*}	61,82 (27,88)	65,45 (23,04)
Max_Abs_time	480,00 (127,08) ^{b*, c*}	520,59 (118,09)	620,73 (139,77)	586,06 (181,81)
Slope_time (сек)	217,71 (73,50)	230,12 (68,81)	290,18 (151,20)	253,94 (96,75)

Вредности су представљене као средња вредност \pm стандардна девијација. *lag_time* – време у којем је формирано довољно протофибрила за детекцију; *Max_Abs* – максимална апсорбанца; *Lag_Abs_Avrg* – просечна вредност апсорбанце од почетка стварања криве коагулације до *lag time*; *Max_Abs_Lag_Abs* – апсорбанца добијена одузимањем вредности *MaxAbs* и *Lag Abs Avrg*; *Slope* – најстрмији део криве агрегације фибрина; *Max_Abs_time* – време када се постиже максимална апсорбанца; *Slope_time* – време које се добија одузимањем *Max Abs time* и *lag time*. Статистичка значајност између група: ^a1 и 2; ^b1 и 3; ^c1 и 4; ^d2 и 3; ^e2 и 4; ^f3 и 4 са нивоом значајности * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.5. Електронска микроскопија

Контрола пременопауза

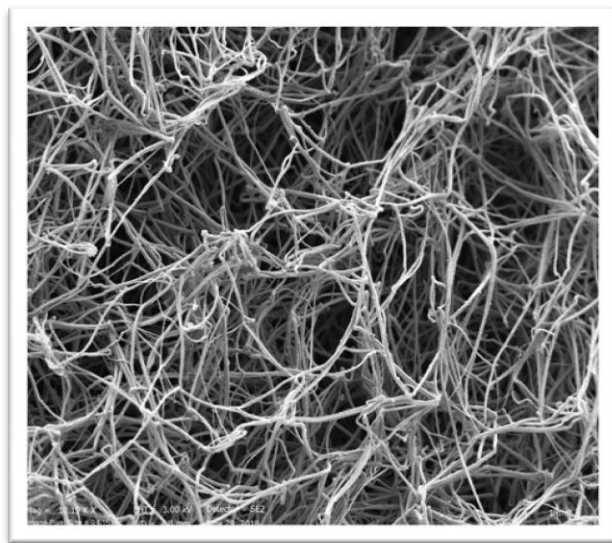
а



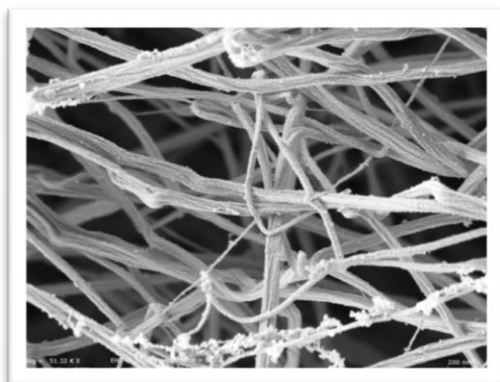
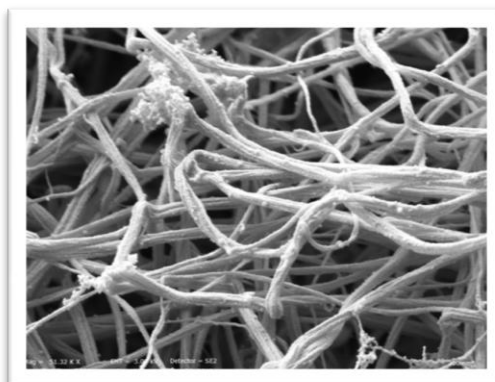
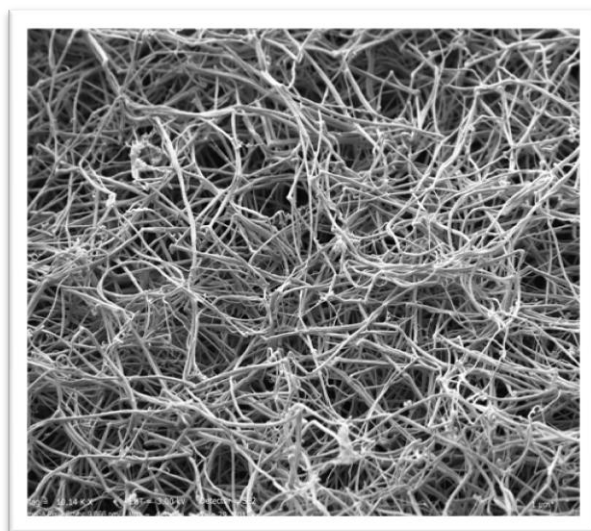
б



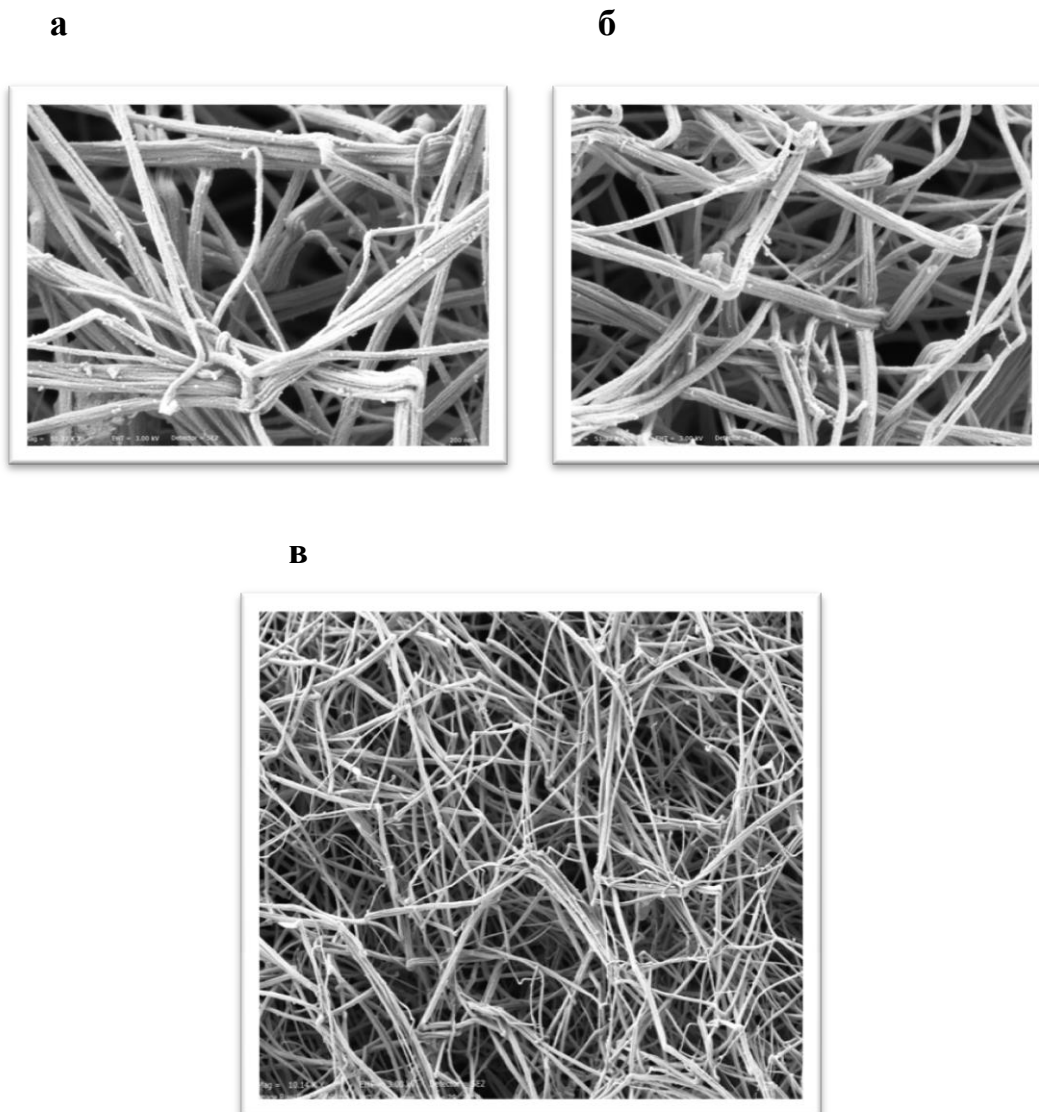
в



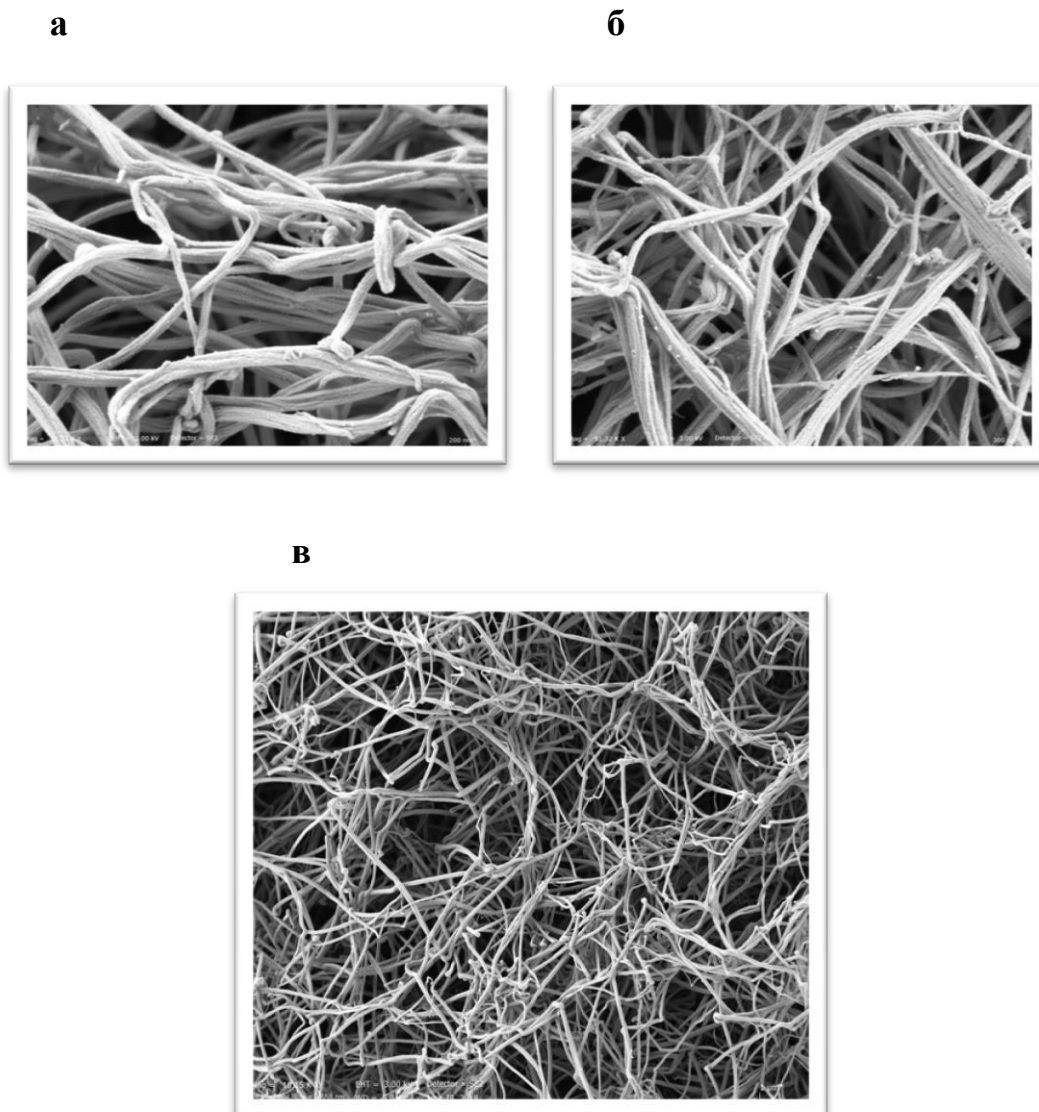
Слика 5. Електронска микроскопија репрезентативног фибринског угрушака у контролној пременопаузалној групи. а – увећење 200 nm; б – увећење 200 nm; в – увећење 1 μ m.

*Контрола менопауза***а****б****в**

Слика 6. Електронска микроскопија репрезентативног фибринског угрушака у контролној менопаузалној групи. а – увећење 200 nm; б – увећење 200 nm; в – увећење 1 μm.

Пацијенткиња у пременопаузи

Слика 7. Електронска микроскопија репрезентативног фибриноског угрушака у пременопаузалној групи пацијенткиња са реуматоидним артритисом. а – увећење 200 nm; б – увећење 200 nm; в – увећење 1 μm.

Пацијенткиња у менопаузи

Слика 8. Електронска микроскопија репрезентативног фибриноског угрушака у менопаузалној групи пацијенткиња са реуматоидним артритисом. а – увећење 200 nm; б – увећење 200 nm; увећење 1 μm.

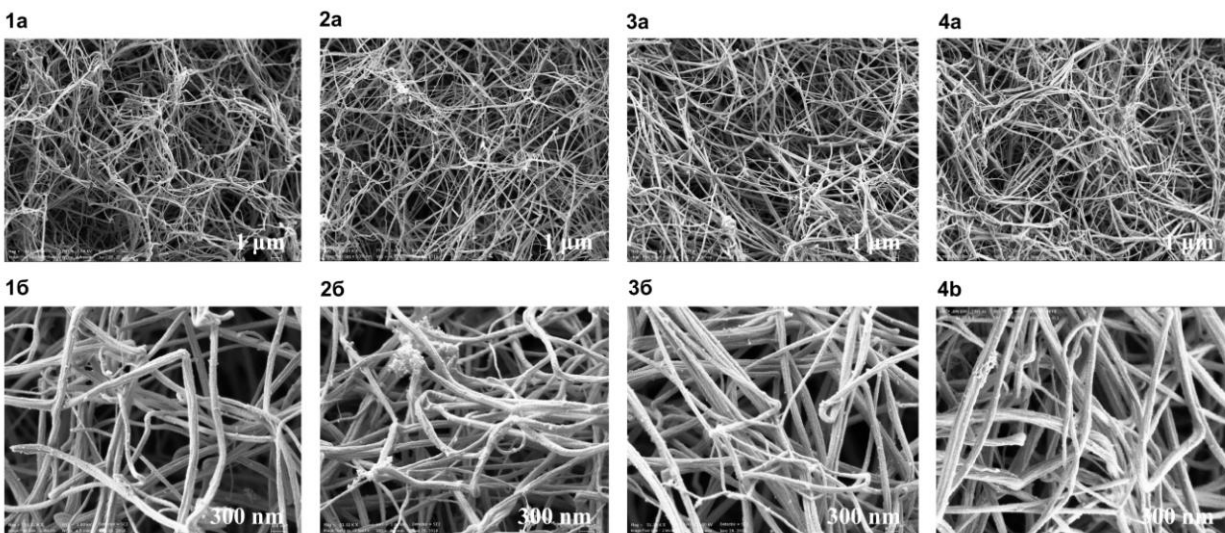
Резултати електронске микроскопије указују на веће поре код пременопаузалних контрола са мањом густином, такозвана “looser” структура, која је више осетљива на фибринолизу (Слика 9; 1а-б). Постменопаузалне контроле (Слика 9; 2а-б) и обе групе пацијената са РА, пременопаузална (Слика 9; 3а-б) и постменопаузална (Слика 9; 4а-б), имале су гушћу структуру фибринског угрушка са мањим порамма. Код ових угрушака, фибринске нити су густо упаковане и мање склоне фибринолизи.

Дебљина влакана у контролној и експерименталној групи приказана је у табели 43.

Табела 43. Дебљина влакана у контролној и експерименталној групи посматрани у односу на менопаузу.

Параметар	(1) Контрола пременопауза	(2) Контрола менопауза	(3) РА пременопауз а	(4) РА менопауза
Дебљина влакана (nm)	148,2 ± 5,9	132,6 ± 18,2	120,6 ± 12,9	127,1 ± 8,1

Вредности су представљене као средња вредност ± стандардна девијација.



Слика 9. Електронска микроскопија репрезентативних фибринских угрушака код испитаника у студији, упоредни график. 1 – пременопаузална контрола; 2 – менопаузална контрола; 3 – пременопаузални пацијент са РА; 4 – менопаузални пацијент са РА. Увећење 1μm: 1-4а и 300 nm: 1-4б.

4.6. Редокс статус

4.6.1. Параметри оксидационог стреса

Вредности параметара оксидационог стреса (H_2O_2 , O_2^- , NO_2^- , TBARS), код здравих жена и пацијената са РА, приказане су у табели 44, док су вредности наведених параметара праћени на основу менопаузе, приказане су у табели 45.

Табела 44. Вредности параметара оксидационог стреса у контролној и експерименталној групи.

Параметар	Контрола	РА
H_2O_2 (nmol/min/g wt)	0,82 ± 0,33**	1,05 ± 0,41
O_2^- (nmol/min/g wt)	26,92 ± 5,68	23,05 ± 5,64
NO_2^- (nmol/min/g wt)	4,98 ± 0,9**	3,83 ± 0,52
TBARS ($\mu\text{mol/min/g wt}$)	0,94 ± 0,13**	1,04 ± 0,11

Вредности су представљене као средња вредност ± стандардна девијација. Статистичка значајност између група: ^a1 и 2; ^b1 и 3; ^c1 и 4; ^d2 и 3; ^e2 и 4; ^f3 и 4 са нивоом значајности * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Табела 45. Вредности параметара оксидационог стреса у контролној и експерименталној групи на основу менопаузе.

Параметар	(1) Контрола	(2) Контрола	(3) РА	(4) РА
	пременопауза	менопауза	пременопауза	менопауза
H_2O_2 (nmol/min/g wt)	0,82 ± 0,33) ^{b**, c**}	0,83 ± 0,33) ^{d**, e**}	1,13 ± 0,44	1,02 ± 0,40
O_2^- (nmol/min/g wt)	26,05 ± 2,87	27,28 ± 3,95	22,40 ± 1,80	23,28 ± 1,81
NO_2^- (nmol/min/g wt)	4,55 ± 1,09) ^{b**, c**}	5,15 ± 0,76) ^{e**}	3,72 ± 0,46	3,86 ± 0,55
TBARS ($\mu\text{mol/min/g wt}$)	0,91 ± 0,08) ^{a*, b*, c*}	0,95 ± 0,14) ^{d**, e**}	1,03 ± 0,11	1,05 ± 0,11

Вредности су представљене као средња вредност ± стандардна девијација. Статистичка значајност између група: ^a1 и 2; ^b1 и 3; ^c1 и 4; ^d2 и 3; ^e2 и 4; ^f3 и 4 са нивоом значајности * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.6.1.1. Водоник-пероксид (H_2O_2)

Вредности водоник пероксида биле су ниже код здравих контрола у односу на пацијенте са РА са статистички значајном разликом ($p < 0,01$) (График 29).

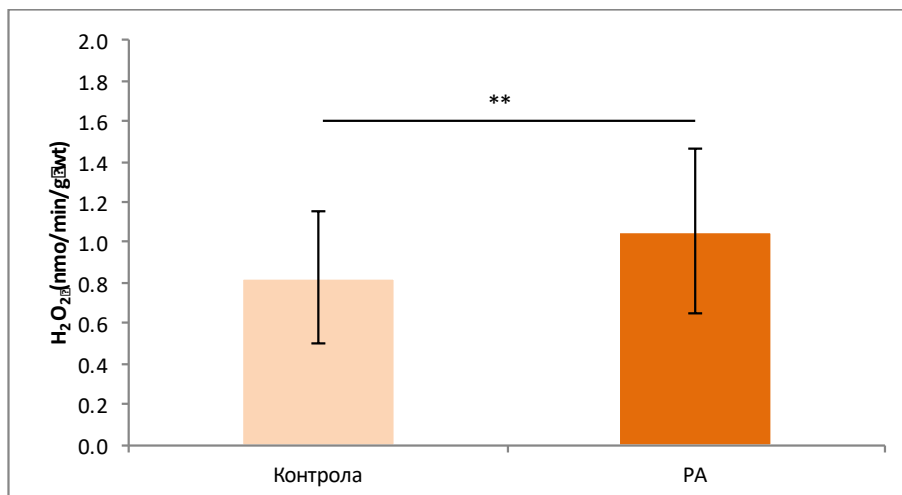


График 29. Вредности-водоник пероксида у контролној и експерименталној групи.

Вредности овог параметра праћене на основу менопаузе, показале су значајне разлике између посматраних подгрупа. Здраве жене у пременопаузи имале су статистички значајно мање вредности од пацијенткиња у пременопаузи ($p < 0,01$) и у менопаузи ($p < 0,01$). Вредности водоник пероксида биле су значајно мање у контролној групи у менопаузи у односу на пременопаузалне ($p < 0,01$) и пацијенткиње у менопаузи ($p < 0,01$) (График 30).

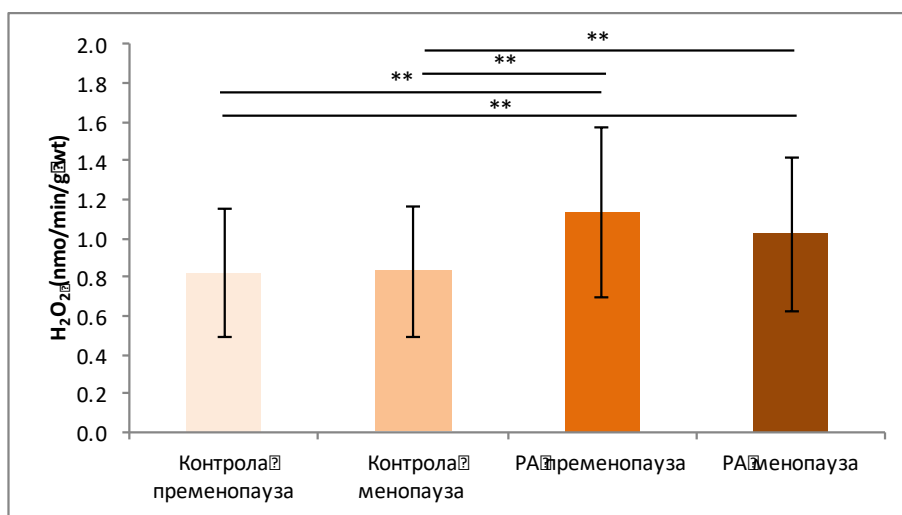


График 30. Вредности водоник-пероксида у контролној и експерименталној групи на основу менопаузе

4.6.1.2. Супероксид анјон радикал (O_2^-)

Вредности супероксид анјон радикала се нису статистички значајно разликовале између посматраних група (График 31).

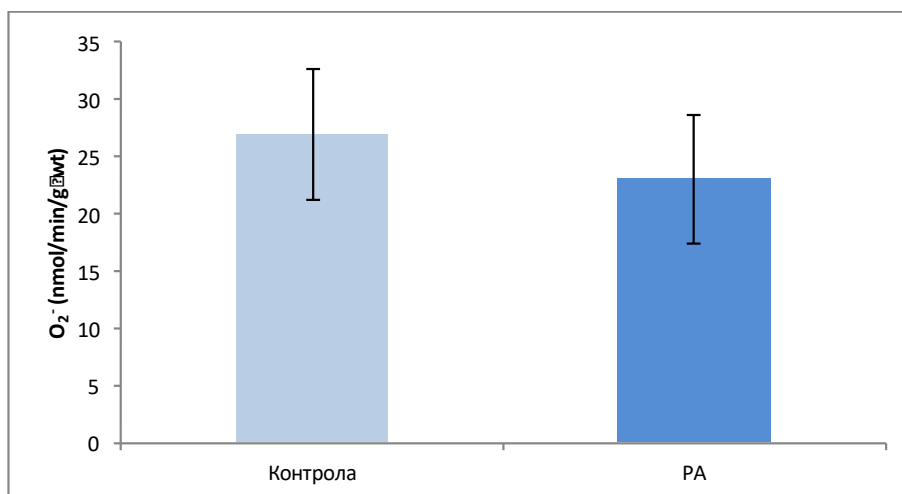


График 31. Вредности супероксид анјон радикала у контролној и експерименталној групи.

Вредности супероксид анјон радикала се нису статистички значајно разликовале између посматраних подгрупа (График 32).

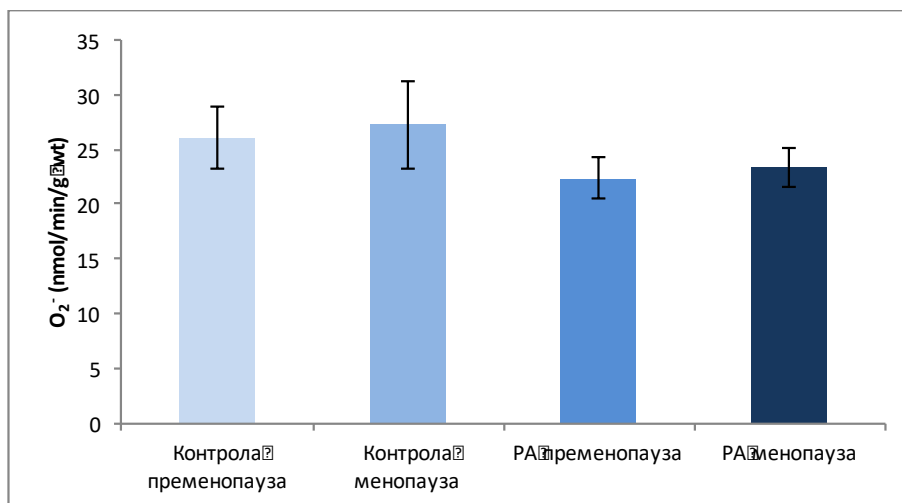


График 32. Вредности супероксид анјон радикала у контролној и експерименталној групи на основу менопаузе

4.6.1.3. Нитрити (NO_2^-)

Вредности нитрита су биле значајно повишене у групи здравих испитаника и поређењу са пацијентима ($p < 0,01$) (График 33).

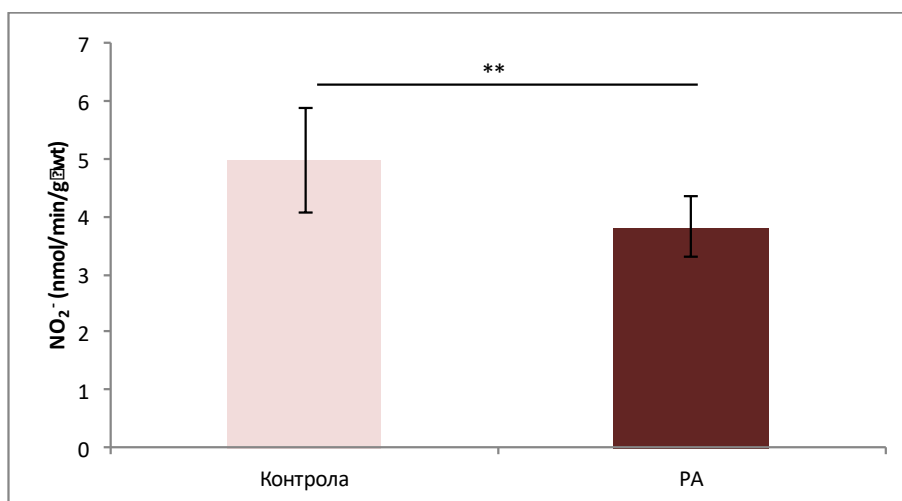


График 33. Вредности нитрита у контролној и експерименталној групи.

Вредности овог параметра праћене на основу менопаузе, показале су значајне разлике између посматраних подгрупа. Здраве жене у пременопаузи имале су статистички значајно више вредности од пацијенткиња у пременопаузи ($p < 0,01$) и у менопаузи ($p < 0,01$). Вредности нитрита биле су значајно више у контролној групи у менопаузи у односу на пацијенткиње у менопаузи ($p < 0,01$) (График 34).

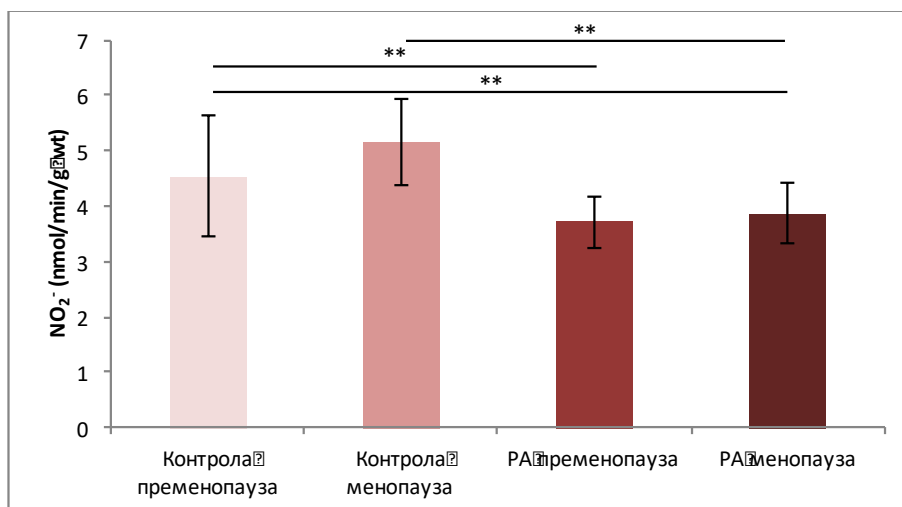


График 34. Вредности нитрита у контролној и експерименталној групи на основу менопаузе

4.6.1.4. Индекс липидне пероксидације (TBARS)

Вредности индекса липидне пероксидације биле су ниже код здравих испитаника у поређењу са пацијентима ($p < 0,01$) (График 35).

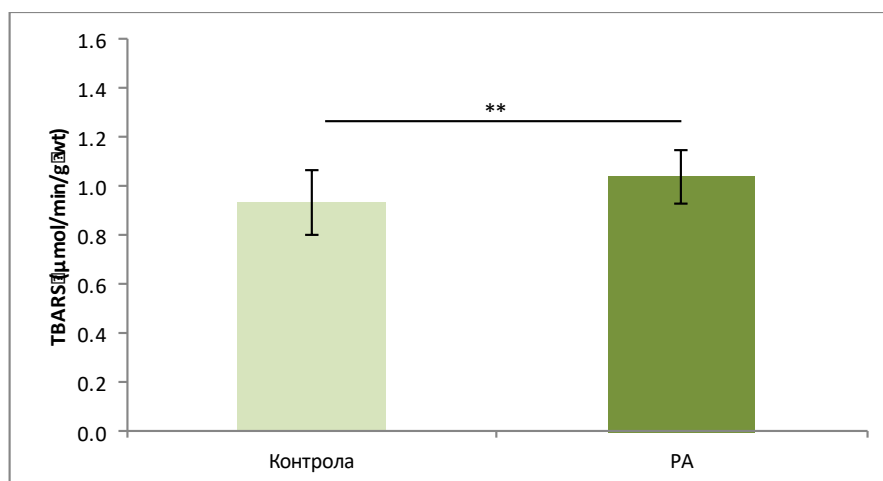


График 35. Вредности индекса липидне пероксидације у контролној и експерименталној групи.

Вредности овог параметра праћене на основу менопаузе, показале су значајне разлике између посматраних подгрупа. Здраве жене у пренопаузи имале су статистички значајно мање вредности од пацијенткиња у пренопаузи ($p < 0,05$) и у менопаузи ($p < 0,05$). Вредности индекса липидне пероксидације биле су значајно мање у контролној групи у менопаузи у односу на пренопаузалне ($p < 0,01$) и пацијенткиње у менопаузи

($p < 0,01$). Поред тога, показана је статистичка значајност између контролних група ($p < 0,05$) (График 36).

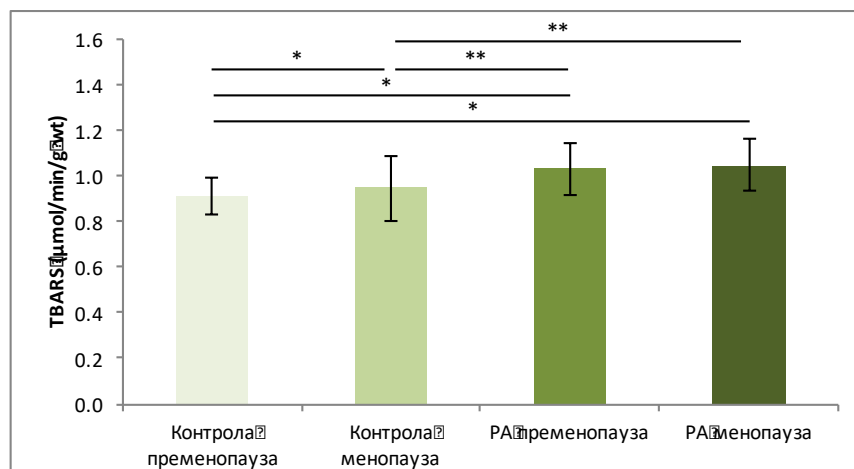


График 36. Вредности индекса липидне пероксидације у контролној и експерименталној групи на основу менопаузе

4.6.2. Параметри антиоксидационе заштите

Активност параметара антиоксидационе заштите (SOD, CAT, GSH), код здравих жена и пацијената са РА, приказана је у табели 46, док је активност наведених параметара праћена на основу менопаузе, приказана су у табели 47.

Табела 46. Активност параметара антиоксидационе заштите у контролној и експерименталној групи.

Параметар	Контрола	РА
CAT (U/gHbx10 ³)	3,39 ± 0,58*	3,10 ± 0,51
SOD (U/gHbx10 ³)	23,57 ± 5,27*	13,95 ± 5,80
GSH (nmol/ml RBCs)	75071,02 ± 8616,41	69814,68 ± 8503,38

Вредности су представљене као средња вредност ± стандардна девијација. Статистичка значајност између група: ^a1 и 2; ^b1 и 3; ^c1 и 4; ^d2 и 3; ^e2 и 4; ^f3 и 4 са нивоом значајности * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Табела 47. Активност параметара антиоксидационе заштите у контролној и експерименталној групи на основу менопаузе.

Параметар	(1) Контрола пременопауза	(2) Контрола менопауза	(3) РА пременопауза	(4) РА менопауза
CAT (U/gHbx10³)	2,96 ± 0,85	3,49 ± 0,76	3,73 ± 0,70	2,87 ± 0,74
SOD (U/gHbx10³)	21,51 ± 6,85 ^{c**}	24,42 ± 6,73 ^{d*, e**}	16,28 ± 6,31	13,13 ± 6,87
GSH (nmol/ml RBCs)	73871,92 ± 7281,67	75164,88 ± 9510,46	70699,51 ± 7548,23	69500,72 ± 8912,88

Вредности су представљене као средња вредност ± стандардна девијација.

*Статистичка значајност између група: ^a1 и 2; ^b1 и 3; ^c1 и 4; ^d2 и 3; ^e2 и 4; ^f3 и 4 са нивоом значајности * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.*

4.6.2.1. Каталаза (CAT)

Активност каталазе је статистички значајно била већа у контролној групи у поређењу са пацијентима ($p < 0,05$) (График 37).

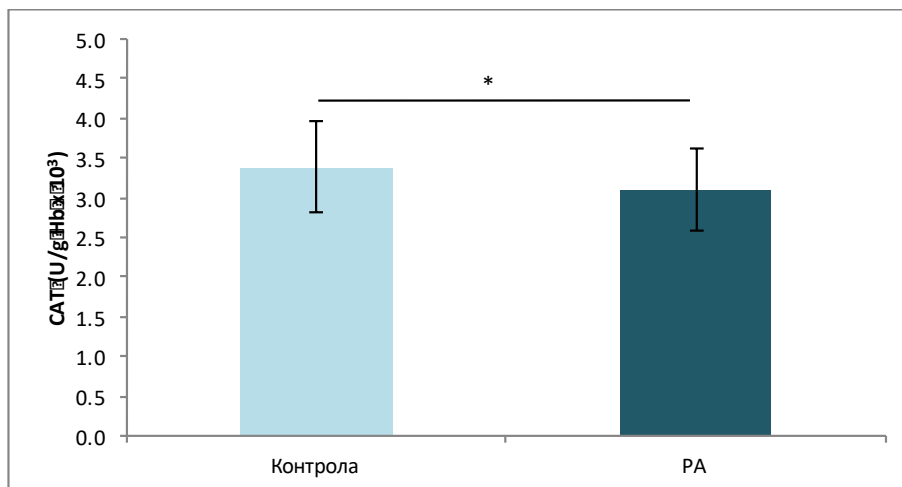


График 37. Активност каталазе у контролној и експерименталној групи.

Активност каталазе се није статистички значајно разликовала између посматраних подгрупа (График 38).

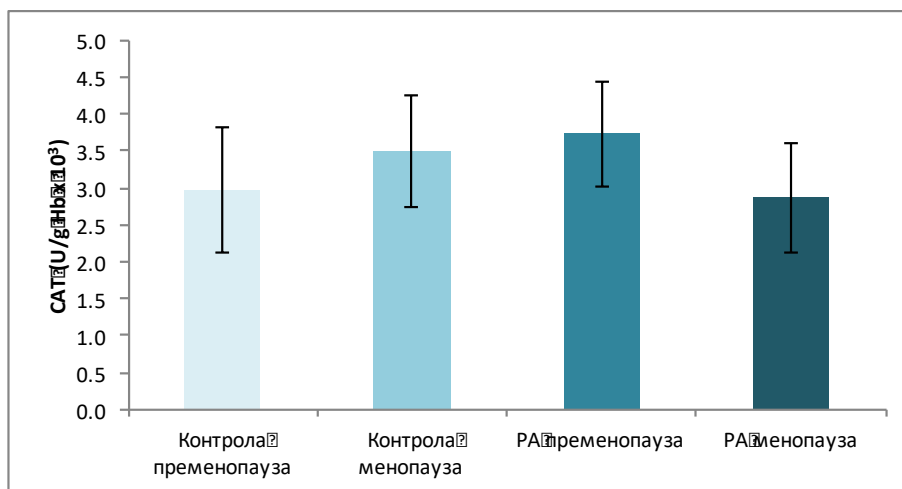


График 38. Вредности активности каталазе у контролној и експерименталној групи на основу менопаузе

4.6.2.2. Супероксид-дисмутаза (SOD)

Статистички значајно већа активност супероксид-дисмутазе примећена је код здравих жена у поређењу са пацијенткињама са РА ($p < 0,05$) (График 39).

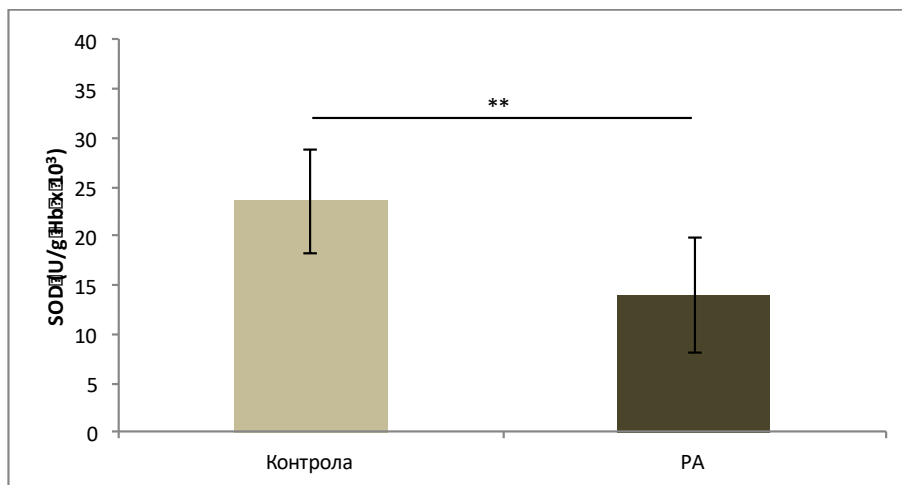


График 39. Активност супероксид-дисмутазе у контролној и експерименталној групи.

Активност овог параметра праћена на основу менопаузе, показала је значајне разлике између посматраних подгрупа. Здраве жене у пременопаузи имале су статистички значајно више вредности од пацијенткиња у менопаузи ($p < 0,01$). Активност супероксид-дисмутазе била је значајно већа у контролној групи у менопаузи у односу на пременопаузалне ($p < 0,05$) и пацијенткиње у менопаузи ($p < 0,01$) (График 40).

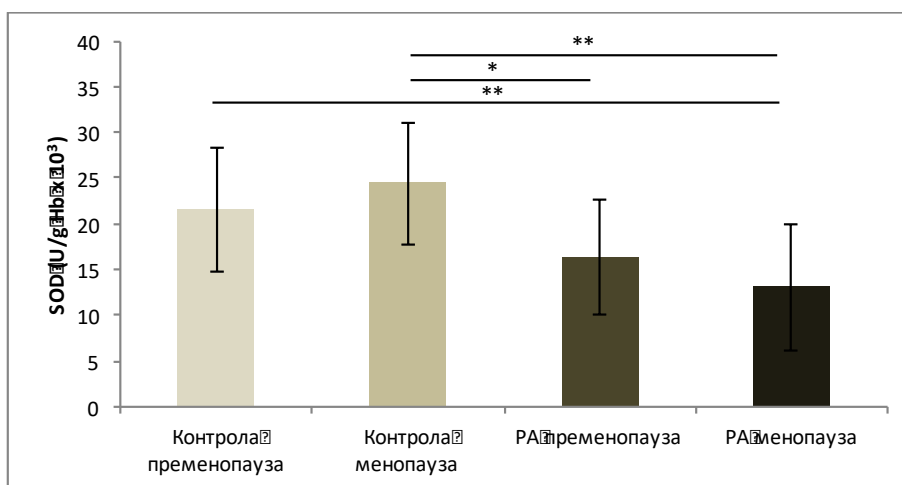


График 40. Вредности супероксид-дисмутазе у контролној и експерименталној групи на основу менопаузе

4.6.2.3. Редуковани глутатион (GSH)

Вредности редукованог глутатиона нису се значајно разликовале између здравих жена у поређењу са пацијенткињама са РА (График 41).

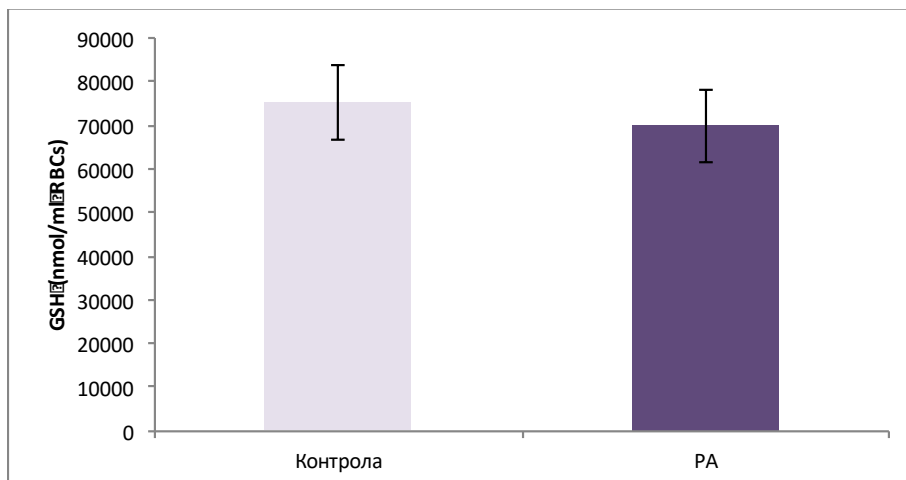


График 41. Вредност редукованог глутатиона у контролној и експерименталној групи.

Вредност редукованог глутатиона се није статистички значајно разликовала између посматраних подгрупа (График 42).

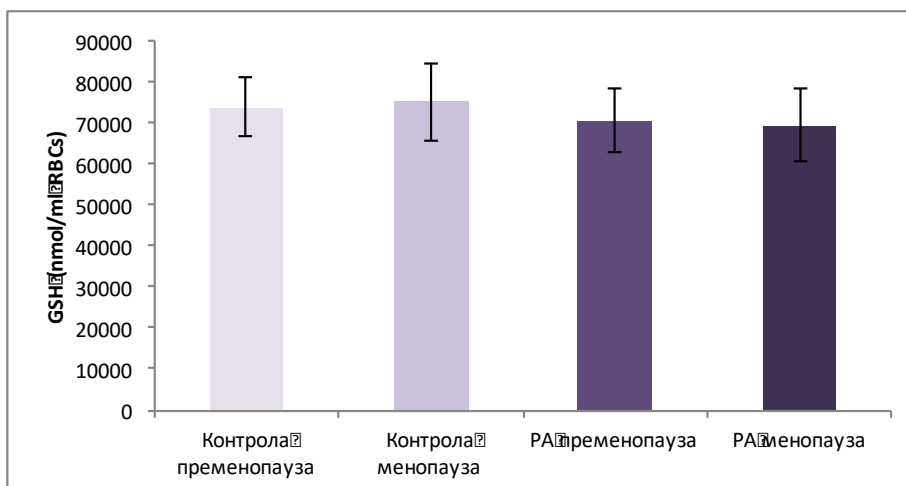


График 42. Вредности редукованог глутатиона у контролној и експерименталној групи на основу менопаузе

4.7. Корелација

Нивои укупног коагулационог потенцијала (*OCP*) и укупног хемостатског потенцијала (*OHP*) су у корелацији ($r = 0.54$; $p = 0.001$ и $r = 0.44$; $p = 0.003$, редом) са активношћу болести код пацијената са РА, мерено параметром *DAS28* (График 43). Значајна корелације је такође примећена у вредностима неспецифичних параметара запаљења, Ц-реактивног протеина ($r = 0.45$; $p = 0.003$ за *OCP* и $r = 0.46$; $p = 0.002$ за *OHP*) и седиментације ($r = 0.65$; $p = 0.0001$ за *OCP* и $r = 0.65$; $p = 0.0001$ за *OHP*).

Параметри синтезе тромбина нису били у корелацији са трајањем и активношћу болести код испитиваних пацијента са РА.

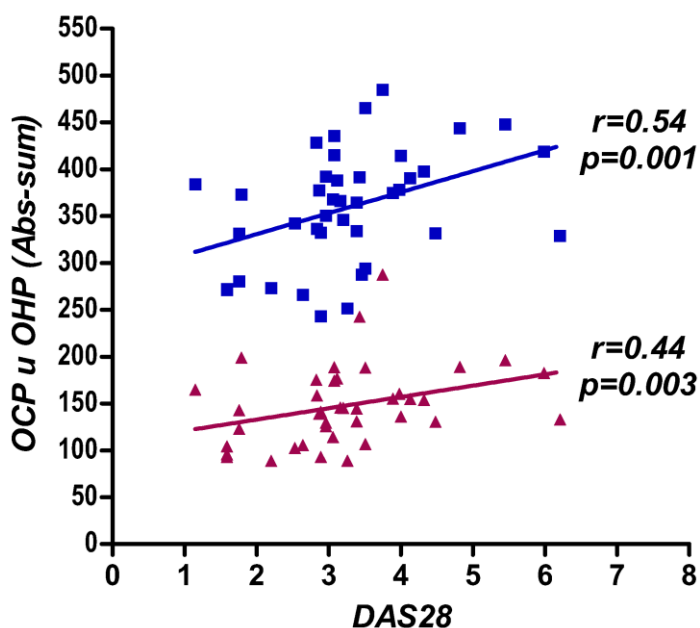


График 43. Корелација између укупног коагулационог потенцијала (*OCP*) и и укупног хемостатског потенцијала (*OHP*) и активности болести код пацијената са РА

Укупни фибринолитички потенцијал (*OFP*) је у негативној корелацији са ΔCLT ($r = -0.47$, $p = 0.002$) код пацијената са РА, показујући да је поремећена фибринолиза повезана са повећаном *TAFI* активношћу (График 44).

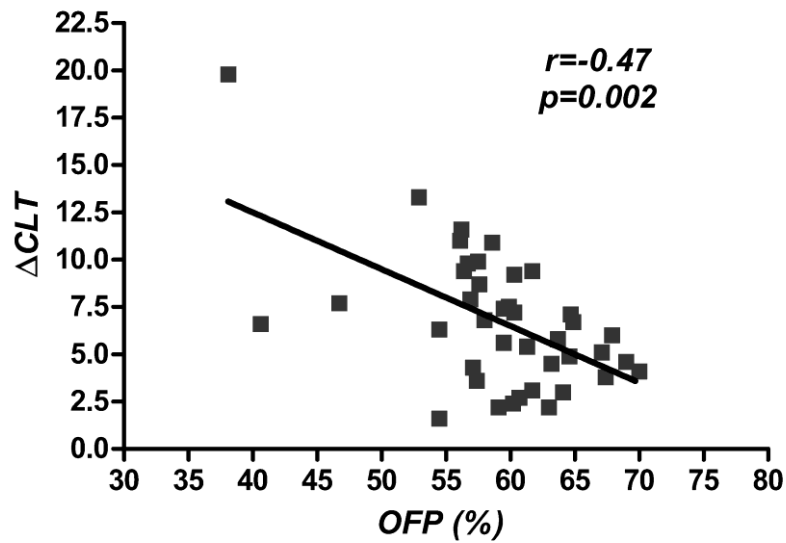


График 44. Корелација између укупног фибринолитичког потенцијала (*OFP*) и ΔCLT код пацијената са РА.

Табела 48. Корелације између активности реуматоидног артритиса и глобалних метода хемостазе

Параметар	Седиментација		ЦРП		DAS28		Фибриноген	
<i>OCP</i>	+0,629	p<0,01	+0,402	p<0,05	+0,497	p<0,01	+0,776	p<0,01
<i>OHP</i>	+0,603	p<0,01	+0,458	p<0,01	+0,401	p<0,05	+0,762	p<0,01
<i>OFP</i>	-0,332	p<0,05	-0,300	НЗ	-0,120	НЗ	-0,465	p<0,01
<i>FG MaxAbs</i>	+0,463	p<0,01	+0,348	p<0,05	+0,152	НЗ	+0,351	p<0,05
<i>FG Slope</i>	+0,150	НЗ	+0,319	p<0,05	+0,413	p<0,01	+0,275	НЗ
<i>FG Slope time</i>	+0,056	НЗ	-0,160	НЗ	-0,259	НЗ	+0,124	НЗ
<i>CLT без PTCl</i>	+0,321	p<0,05	0,236	НЗ	+0,053	НЗ	+0,434	p<0,01
<i>CLT са PTCl</i>	+0,394	p<0,01	0,205	НЗ	+0,184	НЗ	+0,473	p<0,01

Вредности су представљене као Пирсонов или Спирманов коефицијент корелације. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Јака позитивна корелација (0,50-1,00); позитивна умерена комуникација (0,30-0,49); позитивна слаба корелација (0,10-0,29). **DAS28** – Disease Activity Score-28; **OCP** – укупни коагулациони потенцијал; **OHP** – укупни хемостатски потенцијал; **OFP** – укупни фибринолитички потенцијал; **Max_Abs** – максимална апсорбанца; **Slope** – најстрмији део криве агрегације фибрина; **Slope time** – време које се добија одузимањем *Max Abs time* и *lag tim*; **CLT** – време лизирања угрушка; **PTCl** – инхибитор карбоксипептидазе; **ΔCLT** – разлика између времена лизирања угрушка са и без **PTCl**. Знак (+) означава позитивну корелацију; знак (-) означава негативну корелацију. Други параметри глобалних метода хемостазе нису показали корелацију, подаци нису представљени. **НЗ** – нема значајности.

Табела 49. Корелације између активности реуматоидног артритиса и глобалних метода хемостазе у односу на менопаузу

Параметар	Седиментација		ЦРП		DAS28		Фибриноген	
Пременопаузалне жене са РА								
<i>OCP</i>	+0,905	p<0,01	+0,842	p<0,01	+0,827	p<0,01	+0,926	p<0,01
<i>OHP</i>	+0,709	p<0,05	+0,571	H3	+0,643	p<0,05	+0,801	p<0,01
<i>ETP Cmax</i>	+0,582	H3	+0,350	H3	+0,631	H3	+0,567	H3
<i>FG Slope</i>	+0,460	H3	+0,674	p<0,05	+0,683	p<0,05	+0,423	H3
Постменопаузалне жене са РА								
<i>FG Slope time</i>	-0,193	H3	-0,548	H3	-0,607	p<0,05	-0,210	H3
<i>OCP</i>	+0,493	p<0,01	+0,222	H3	+0,332	H3	+0,749	p<0,01
<i>OHP</i>	+0,531	p<0,01	+0,330	H3	+0,276	H3	+0,756	p<0,01
<i>OFP</i>	+0,188	H3	-0,234	H3	+0,014	H3	-0,402	p<0,05
<i>FG MaxAbs</i>	+0,450	p<0,05	+0,312	H3	+0,316	H3	+0,400	p<0,05
<i>CLT са PTCl</i>	+0,368	p<0,05	+0,163	H3	+0,177	H3	+0,497	p<0,01

Вредности су представљене као Пирсонов или Спирманов коефицијент корелације.

*p<0,05; **p<0,01. Јака позитивна корелација (0,50-1,00); позитивна умерена комуникација (0,30-0,49); позитивна слаба корелација (0,10-0,29). **DAS28** – Disease Activity Score-28; **OCP** – укупни коагулациони потенцијал; **OHP** – укупни хемостатски потенцијал; **OFP** – укупни фибринолитички потенцијал; **Max_Abs** – максимална апсорбанца; **Slope** – најстрмији део криве агрегације фибрина; **Slope_time** – време које се добија одузимањем Max Abs time и lag tim; **CLT** – време лизирања угрушка; **PTCl** – инхибитор карбоксипептидазе; **ΔCLT** – разлика између времена лизирања угрушка са и без **PTCl**. Знак (+) означава позитивну корелацију; знак (-) означава негативну корелацију. Други параметри глобалних метода хемостазе нису показали корелацију, подаци нису представљени. **H3** – нема значајности.

Табела 50. Корелације између симптома реуматоидног артритиса и глобалних метода хемостазе

Параметар	ББЗ		БОЗ	
<i>OCP</i>	+0,409	p<0,01	+0,194	НЗ
<i>OHP</i>	+0,270	НЗ	+0,221	НЗ
<i>OFP</i>	-0,010	НЗ	-0,072	НЗ
<i>FG MaxAbs</i>	+0,059	НЗ	+0,068	НЗ
<i>FG Slope</i>	+0,342	p<0,05	+0,345	p<0,05
<i>FG Slope time</i>	-0,302	НЗ	-0,345	p<0,05
<i>CLT без PTCl</i>	-0,093	НЗ	-0,031	НЗ
<i>CLT са PTCl</i>	-0,045	НЗ	0,130	НЗ

Вредности су представљене као Пирсонов или Спирманов коефицијент корелације. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Јака позитивна корелација (0,50-1,00); позитивна умерена комуникација (0,30-0,49); позитивна слаба корелација (0,10-0,29). **ББЗ** – број болних зглобова; **БОЗ** – број отечених зглобова; **OCP** – укупни коагулациони потенцијал; **OHP** – укупни хемостатски потенцијал; **OFP** – укупни фибринолитички потенцијал; **Max_Abs** – максимална апсорбанца; **Slope** – најстрмији део криве агрегације фибрина; **Slope_time** – време које се добија одузимањем *Max Abs time* и *lag tim*; **CLT** – време лизирања угрушка; **PTCl** – инхибитор карбоксипептидазе; Δ **CLT** – разлика између времена лизирања угрушка са и без **PTCl**. Знак (+) означава позитивну корелацију; знак (-) означава негативну корелацију. Други параметри глобалних метода хемостазе нису показали корелацију, подаци нису представљени. **НЗ** – нема значајности.

Табела 51. Корелације између симптома реуматоидног артритиса и глобалних метода хемостазе у односу на менопаузу

Параметар	ББЗ		БОЗ	
Пременопаузалне жене са РА				
<i>OCP</i>	+0,753	p<0,05	+0,658	p<0,05
<i>OHP</i>	+0,383	НЗ	+0,452	НЗ
<i>ETP Cmax</i>	+0,587	НЗ	+0,720	p<0,05
<i>FG Slope</i>	+0,780	p<0,01	+0,753	p<0,01
<i>FG Slope time</i>	-0,728	p<0,05	-0,625	p<0,05
Пременопаузалне жене са РА				
<i>OCP</i>	+0,247	НЗ	+0,031	НЗ
<i>OHP</i>	+0,087	НЗ	+0,069	НЗ
<i>OFP</i>	+0,012	НЗ	+0,272	НЗ
<i>FG MaxAbs</i>	-0,003	НЗ	-0,034	НЗ
<i>CLT са PTCl</i>	-0,145	НЗ	+0,197	НЗ

Вредности су представљене као Пирсонов или Спирманов коефицијент корелације. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Јака позитивна корелација (0,50-1,00); позитивна умерена комуникација (0,30-0,49); позитивна слаба корелација (0,10-0,29). **ББЗ** – број болних зглобова; **БОЗ** – број отечених зглобова; **OCP** – укупни коагулациони потенцијал; **OHP** – укупни хемостатски потенцијал; **OFP** – укупни фибринолитички потенцијал; **Max_Abs** – максимална апсорбанца; **Slope** – најстрмији део криве агрегације фибрина; **Slope_time** – време које се добија одузимањем *Max Abs time* и *lag tim*; **CLT** – време лизирања угрушка; **PTCl** – инхибитор карбоксипептидазе; Δ **CLT** – разлика између времена лизирања угрушка са и без **PTCl**. Знак (+) означава позитивну корелацију; знак (-) означава негативну корелацију. Други параметри глобалних метода хемостазе нису показали корелацију, подаци нису представљени. **НЗ** – нема значајности.

V
ДИСКУСИЈА

5. ДИСКУСИЈА

Основни циљ овог истраживања је било праћење концентрације микропартикула, параметара хемостазе као и могуће промене редокс статуса код жена са дијагностикованим реуматоидном артритису. У оквиру истраживања праћен је велики број параметара хемостазе, хематолошких, биохемијских параметара као и различите врсте микропартикула које могу бити присутне у популацији оболелих од РА.

Сврха истраживања се односила проналажење начина за праћење активности реуматоидног артритиса, хемостатских промена до којих долази услед хроничне инфламације као и измене редокс статуса у популацији жена.

С обзиром на доказе о постојању повезаности између процеса коагулације и инфламације, улози тромбоцита у различитим инфламационим и тромботичким стањима, често преко микропартикула које потичу од тромбоцита, улози оксидационог стреса у РА, циљ је био и да се испита могућа повезаност праћеним метода у РА.

Резултати нашег истраживања показали су повећање укупне концентracије микропартикула, концентрација микропартикула које потичу од тромбоцита и П-селектина, код пацијената са РА у односу на здраве испитанике. Глобалне методе хемостазе указују да коагулација може бити снажно погођена дуготрајном инфламацијом код пацијената са РА, и менопаузом код здравих жена. Резултати електронске микроскопије показали су да пацијенти са реуматоидним артритисом као и здраве контроле у менопаузи имају гушћу структуру фибринског угрушка са мањим порамма, који је мање осетљив на фибринолизу. Праћењем редокс статуса код ових пацијената, показано је повећање про-оксидационих и смањење активности антиоксидациони параметри што указују на постојање оксидационог стреса код ових пацијената. Сви неспецифични параметри инфламације били су повишени код пацијената са РА.

5.1. Утицај реуматоидног артритиса на микропартикуле

У првом делу студије испитивали смо концентрацију и врсту МП код здравих контрола и пацијената оболелих од РА. Микропартикуле представљају хетерогену популацију ћелија које се углавном ослобађају са површине плазма мембране након активације ћелије или апоптозе. Иако је настанак микропартикула физиолошки одговор на активацију ћелија или апоптозу, драматично повећање циркулишућих МП детектовано је у различитим стањима повезаним са тромбозом, у поређењу са вредностима МП код здравих испитаника (134). Повишене вредности микропартикула у плазми, забележене су у метаболичким, кардиоваскуларним, инфективним, неопластичним и аутоимуним болестима (55) као и у прееклампсији (135). Од аутоимуних болести, повишене вредности микропартикула пронађене су РА (69, 136), системској склерози (137, 138), Кроновој болести (139), системском еритемском лупусу (140, 141), васкулитису (142, 143) и миозитису (144).

Резултати нашег истраживања показали су повећану укупну концентрацију МП код пацијената оболелих од РА у односу на здраве испитанике, затим микропартикула које потичу од тромбоцита као и микропартикула које потичу од П-селектина.

Укупна концентрација микропартикула праћена је као концентрација свих ћелија позитивних на фосфатидилсерин, димензија између 0,1-1 μ m. У нашем истраживању, показана је већа концентрација укупних микропартикула код пацијената са РА у односу на здраве контроле. Микропартикуле имају структуру која је заснована на фосфолипидима, услед чињенице да потичу са мембрана ћелија и поред тога експримирају функционалне рецепторе. С обзиром да на својој површини експримирају прокоагулантни фосфатидилсерин, за који се везују фактори коагулације VIII и V стереоселективним реакцијама, имају значајну улогу у хемостази, тромбози и инфламацији (145, 146). Стимулација ћелија доводи до "расипања" фосфатидилсерина, и настанка МП богатих фосфатидилсерином. Фосфатидилсерин који је обично присутан на унутрашњој страни ћелијске мембране, у тренутку када ћелија подлеже апоптози, није више ограничен на цитосолни део мембране већ постаје изложен на површини ћелије. Фосфатидилсерин експримиран на микропартикулама представља адекватну клиничку платформу за активацију фактора коагулације доводећи до прокоагулантне активности (55, 147).

Претходна истраживања указују на повећану концентрацију укупних микропартикула у популацији оболелих од РА у односу на здраве испитанике (55).

Као што је раније поменуто, тромбоцити имају значајну улогу у инфламацији и имуномодулацији. Претходна студија указују на улогу тромбоцита у артритису који у основи има инфламацију као и у аутоимуним болестима, што указује на постојање ”комуникације” између коагулације и инфламације (73). Након активације, тромбоцити са своје мембране ослобађају микропартикуле које садрже цитоскелетне протеине, мембранске рецепторе и сигналне молекуле (148). Тако настале микропартикуле могу да интерагују са леукоцитима и да доведу до запаљења у зглобовима или системске инфламације. Међутим, као што је раније наведено, све ћелије могу активацијом са своје мембране ослободити микропартикуле које имају исте особине као и ћелије од којих потичу. С обзиром на инфламацију која је присутна у РА, циљ нашег истраживања био је да испитамо присуство и врсте микропартикула у крви пацијената оболелих од РА.

Knijff-Dutmer и сарадници су показали да је ниво микропартикула које потичу од тромбоцита значајно већи од нивоа ових ћелија код здравих испитаника при чему је њихова концентрација у корелацији са активношћу болести (69). *Xie* и сарадници су пратили концентрацију микропартикула које потичу од тромбоцита у крви и синовијалној течности као и микропартикуле које потичу од П-селектина и микропартикуле које потичу од трансмембранског протеина из породице фактора некрозе тумора (CD154), који у највећем проценту потиче са активираних тромбоцита. Концентрација микропартикула које потичу од тромбоцита била је значајно већа у крви пацијената са РА у односу на здраве контроле као и у односу на синовијалну течност пацијената са РА. Микропартикуле које на својој површини експримирају антигене који потичу од П-селектина, биле су значајно више присутне у крви пацијената са РА у односу на здраве контроле као и у односу на синовијалну течност пацијената са РА. Исти тренд је примећен и код микропартикула које су позитивне на присуство CD154 антигена. Резултати ове студије били су у корелацији са активношћу болести мереном параметром DAS28 али не и са седиментацијом, Ц-реактивним протеином, реума фактором нити са антителима на циклични цитрулисани пептид (149). *Sellam* и сарадници су такође пронашли повећану концентрацију МП које потичу од тромбоцита (55). Овакви резултати могу да указују на

улогу МП које потичу од тромбоцита у системској инфламацији и имуномодулацији у РА као и да могу бити потенцијални биомаркер за праћење РА.

Концентрација МП које потичу од П-селектина у крви била је значајно већа у популацији пацијената оболелих од РА у односу на здраве испитанике. Повишене вредности П-селектина у плазми у односу на здраве испитанике показана је у истраживању које су спровели *Ertenli* и сарадници. Пацијенти са тромбоцитозом и РА имали су значајно више вредности П-селектина у односу на пацијенте са нормалним вредностима тромбоцита и здраве контроле (150). *Pamuk* и сарадници такође су указали на повећану експресију CD62P (151). Показна је и позитивна корелација између концентрације П-селектина у плазми и јутарне укочености и броја тромбоцита (150).

Експресија на површини ћелија, као и секреција П-селектина, индукована је активацијом тромбоцита. Иако још увек није у потпуности познато да ли је П-селектин у плазми пацијената са РА експримиран на микропартикулама или је присутан као слободни протеин (152). Представља важан адхезиони рецептор који је медијатор у адхезији тромбоцита и ендотелних ћелија за моноците и гранулоците који последично покрећу експресију ткивног фактора и интерлеукина-8 *in vitro* (153). Повећана експресија П-селектина код пацијената у нашој студији, може да укаже на његову улогу у активацији коагулације, с обзиром на повишене вредности параметара глобалне хемостазе у овој групи. Поред тога, П-селектин је као што је претходно поменуто, повезан са активацијом тромбоцита, а активација тромбоцита доводи до повећања концентрације микропартикула које потичу од тромбоцита при чему ове микропартикуле могу имати важну улогу у инфламаторном процесу у РА. Битно је знати да концентрација микропартикула које потичу од тромбоцита не може бити повећања само под утицајем јаког стреса, агрегационих агенаса као и комплемента C5b-9 (69). Улога микропартикула које потичу од тромбоцита у инфламацији подржана је и чињеницом да могу да активирају неутрофиле (154).

Концентрација микропартикула које потичу од леукоцита у нашем истраживању, није биле повишене у односу на вредности код здравих испитаника. Резултати истраживања *Sellam* и сарадника су у корелацији са нашим истраживањем. У својој студији нису пронашли повишену концентрацију микропартикула које потичу од леукоцита (55). Један од разлога за непостојање разлике између концентрације МП које потичу од

леукоцита јесте може бити агрегација цуркулишућих леукоцита и тромбоцита, која доводи до настанка комплекса леукоцита и тромбоцита и смањење концентрације праћена вредности МП (155).

Концентрација Е-селектина није се значајно разликовала код пацијената оболелих од РА у односу на здраве испитанике. Ендотелна дисфункција, убрзана атеросклероза и повећан кардиоваскуларни морбидитет и морталитет код пацијената са РА показани су у великом броју студија (156). Системска инфламација у РА је праћена активацијом васкуларног ендотела (157). Ово између осталог доводи до ослобађања ендотелних адхезионих молекула, интерцелуларног адхезионог молекула (*ICAM-1*), васкуларног адхезионог молекула (*VCAM-1*) као и Е-селектина са површине ендотелних ћелија. Усклед повећане експресије ендотелних ћелија, леукоцити су регрутовани до артеријског субендотела, што је важно како за убрзано атеросклерози, тако и за ендотелну дисфункцију (158). *Hjeltnes* и сарадници су показали да примена метотрексата или комбинација метотрексата и инхибитора фактора некрозе тумора, може да доведе до смањена Е-селектина, при чему је доза метотрексата била иста као и у нашој студији, 15-25 mg недељно (156). Са друге стране, ранија истраживања указују на повећану концентрацију Е-селектина код пацијената са кратким трајањем болести, просечна дужина трајања болести је годину дана, и код пацијената код којих је вредност $DAS28 > 5,1$ (159). У нашој студији трајање болести било је знатно дуже, просечна дужина болести била је $12,81 \pm 8,00$ година, при чему је активност болести мерена $DAS28$ износила $3,75 \pm 1,09$.

Повећана концентрација микропартикула које потичу од ткивног фактора и које су позитивне на присуство фосфатидилсерина, није забележена у нашем истраживању. Различити подаци су доступни када је у питању ова врста микропартикула. CD142 може бити присутан на микропартикулама и захтева посебну пажњу с обзиром на чињеницу да ткивни фактор има веома важну улогу у коагулацији (160). Раније су се моноцити сматрали јединим типом ћелије која може да доведе до синтезе ТФ *de novo* (161). У нашој студији није показана повећана концентрација МП које потичу од моноцита, нити се вредност моноцита добијена леукоцитарном формулом разликује између здравих испитаника и пацијената са РА. Касније је показана повезаност ткивног фактора и неутрофила а као и његово присуство на тромбоцитима (161). Резултати студије коју су спровели *Osterud* и сарадници, није показала повећану активност ТФ при чему један од

могућих разлога мале активности ових микропартикула може бити недостатак фосфатидилсерина који је повезан са антигеном ТФ на мембрани микропартикула. Поред тога, замравање и одмрзавање немају утицај на активност ТФ (162). Такође, постоје студије које указују да повећана активност ТФ код здравих особа није пронађена у крви, али да је код тих особа формирана хемостатска "коверта" око крвних судова. ТФ се иначе и великим концентрацијама налази на местима на којима је ризик од озбиљних последица и крварења већи, односно спреман је да активира коагулацију када је интегритет крвог суда нарушен (163).

У прилог постојања инфламације, повишене вредности Ц-реактивног протеина, седиментације и фибриногена биле су присутне у групи особа оболелих од РА у односу на здраву контролу. Чак и код пацијената код којих се сматра да је болест контролисана, према скоровима који се прате, показана је да је повећање концентрације Ц-реактивног протеина пропорционално повезано са високим или веома високим ризиком за будуће кардиоваскуларне догађаје (164). Говорећи у прилог инфламацији у РА, активност фосфолипазе А₂ је значајно повишена код у синовијалној течности и серуму пацијената са РА. Преодминантно настаје од активираних тромбоцита и катализује синтезу арахидонске киселине које се конвертује до простагландина деловањем циклооксигеназе 2, који су есенцијални за развој инфламације (69). Пероксидацијом арахидонске настаје малондиалдехид, посебно токсичан алдехид који доводи до настанка оксидационог стреса (104). Резултати наше студије показали су повећање вредности индекса липидне пероксидације код пацијената са РА, што може бити последица инфламације.

5.2. Утицај реуматоидног артритиса на хемостазу

У другом делу студије испитивали смо поремећај хемостазе код пацијената са РА помоћу два глобална хемостатска есеја као и структуру фибринског угрушка код ових пацијената. Сви резултати су поређени са резултатима добијеним анализом узорака здравих жена исте старости као и унутар група према менопаузи. Пременопаузалне здраве жене имале су смањену концентрацију тромбина и фибрина, "looser" структуру фибринског угрушка као и појачану фибринолизу у поређењу са постменопаузалним здравим контролама. Разлике између пре- и пост-менопаузалних пацијената са РА престале су да постоје. Овакав резултат може да укаже на то да инфламаторни терет код жена са РА активира хемостазу код пременопаузалних жена и затвара "gap" односно разлику између пре- и постменопаузалних РА пацијената у погледу активације хемостазе.

Највеће предност нашег истраживања је опсежно испитивање хемостатских параметара у хомогеној групи пацијената са РА у поређењу са стриктно одговарајућим здравим испитаницима. Ово је од велике важности с обзиром на чињеницу да је кардиоваскуларни профил измењен код жена у менопаузи (165). Поред тога, ниво фактора коагулације расте, док се ниво антикоагуланаса смањује у менопаузи код здравих жена (166). Када говоримо о РА, ризик за почетак болести је повезан са менопаузом у ранијој доби (36) и постменопаузални период је повезан са већом активношћу болести и бржом прогресијом инвалидитета (167, 168).

Према нашим сазнањима, ово је прва студија у којој су две хемостатске методе, *ETP* и *ONP*, спроведене код пацијената са реуматоидним артритисом, поређене са контролном групом и праћене на основу менопаузе. Поред тога, праћено је време лизе угрушка, његова структура као и турбидиметријски параметри који прате особине фибринског угрушка код пацијента и здравих испитаника. Између испитиваних група, здравих жена и пацијенткиња са РА није постојала разлика између описаних параметара. Узрок оваквих резултата може бити чињеница да су пацијенти са РА била на стандардном протоколу лечења које укључује примену ниских доза кортикостероида и метотрексата. Показано је да је терапија метотрексатом удружена са смањеним ризиком за настанак кардиоваскуларних болести (169), док за утицај ниских доза глукокортикоида на ризик за настанак ових обољења, још увек не може да се изведе прецизан закључак (170). У

погледу ефекта на појединачне параметре коагулације, нису објављени свеобухватни подаци о ефекту лекова у терапији РА као што су антиреуматски лекови који модификују болест (*DMARDs-Disease-Modifying Antirheumatic Drugs*) укључујући и инхибиторе фактора некрозе тумора. Неколико студија спороведених на пацијентима са РА на терапији инфликсимабом, показале су смањену експресију проинфламаторних цитокина заједно са смањеним вредностима фибриногена и Д-димера као и нормализованим нивоима ткивног активатора плазминогена (*t-PA-tissue-type plasminogen activator*) и инхибитора активатора плазминогена 1 (*PAI-1*) код ових пацијента током периода праћења терапије (171, 172). Ова открића подржавају чињеницу да се експресија хемостатских маркера мења током активације имуног система и да ће се вероватно нормализовати као одговор на терапију.

Само неколико студија је пратило хемостатски баланс глобалним хемостатским есејима. *Undas* и сарадници су истраживали капацитет генерисања тромбина при чему су указали на одложену и повећану концентрацију тромбина код пацијената са РА, углавном захваљујући повећаним вредностима фактора коагулације VIII код ових пацијента (173). Супротно од овога, резултати истраживања *Kern* и сарадника показали су раније и убрзано формирање смањене количине тромбина у хомогеној групи пацијента са РА у поређењу са здравим контролама (174). Поред тога, наши подаци показују нижи ниво генерисаног тромбина као и максималну концентрацију тромбина у пременопаузалним контролама у поређењу са постменопаузалним контролама и пацијентима. Унутар групе пацијената са РА, није примећена корелација између испитиваних параметара генерисања тромбина и активности болести, трајања болести или неспецифичних параметара запаљења као што су Ц-реактивни протеин и седиментација. Овакав резултат може бити последица имunosупресивне терапије и модулирања хемостатског одговора у испитиваног групи пацијената. Посматрајући све заједно, примећене промене у генерисању тромбина су важне и могу се сматрати значајним аспектом птокоагулантног стања у реуматоидном артритису.

Претходно је примећено да аутоимуне болести мењају хемостатски баланс у корист повећања прокоагулационих и смањења антикоагулационих фактора (100). Инфламација у РА може повећати ризик за настанак кардиоваскуларних болести код пацијената са РА (16). Хиперкоагулационо стање је примећено у неким физиолошким стањима као што је

нормална трудноћа као и у патолошким стањима као што је прееклампсија (175), дијабетес (176), мождани удар (177, 178) и коронарна болест срца (175). Поред тога, хиперкоагулација је пронађена у многим аутоимуниим болестима које у патогенези имају инфламацију (100), рекурентни венски тромбоемболизам (179) као и плућни емболизам (180).

Запаљење остаје важан ентитет у патогенези РА који доводи до поремећаја коагулације путем повећане инциденце тромбозе, поремећаја опоравка ендотелних механизма, атеросклерозе и повећеног кардиоваскуларног ризика (181). Као што је поменуто раније, реуматoidни артритис као аутоимуна запаљенска болест, повећава хиперкоагулационо стање. Ово значи да не само да запаљење индукује тромбозу већ и фактори коагулације утичу на повећање тромбозе (182).

Није постојала разлика између испитиваних група у погледу присуства традиционалних и осталих кардиоваскуларних фактора ризика: пушење, хипертензија, дијабетес, индекс телесне масе, хиперлипидемија и присустви претходних кардиоваскуларних догађаја. Пацијенти са РА имали су веће вредности неспецифичних маркера запаљења, као што су Ц-реактивни протеин, седиментација и фибриноген. Ови резултати су у сагласности са претходним истраживањем (174).

Синтеза тромбина је есенцијална са формирање фибрина при чему су мале количине тромбина потребне за почетак згрушавања. Промењена синтеза тромбина, повећана или смањена, такође може да доведе до хемостатске неравнотеже и измењеног тромботичког потенцијала (174). У нашој студији смо приметили разлике у коагулационом стању у односу на менопаузу и саму болест. Између пре- и постменопаузалних контрола, вредности оба есеја, *ОНР* и *ЕТР*, биле су више код здравих жена у менопаузи. Ови резултати могу да указују на менопаузом измењену коагулацију. Претходни подаци указују да је менопауза у корелацији са повећаним кардиоваскуларним ризиком услед чињенице да хормонске промене у менопаузи, као што су смањен ниво естрогена, имају велики утицај. Преваленца кардиоваскуларних болести код жена пре менопаузе је нижа у поређењу са женама у менопаузи. Поред тога, у менопаузи је примећен експоненцијални пораст кардиоваскуларних болести, који доводи до изједначења кардиоваскуларног ризика до седамдесете године, код жена и мушкараца (183). Са овим подацима корелира чињеница да супституција хормонима води ка смањењу

ризика од развоја кардиоваскуларних болести (184). Супротно од овога, код пацијената са РА није примећена никаква статистички значајна разлика у параметрима глобалне хемостазе, између пременопаузалних жена и жена у менопаузи. Поред тога, пременопаузалне контроле су имале значајно ниже вредности *ETP* и *OHP* параметара у поређењу са осталим групама. Ови резултати указују да и менопауза и РА имају велики утицај на коагулацију. Оба ентитета имају прокоагулациони ефекат, без синергистичког утицаја.

Активност болести мерена параметром *DAS28* је у корелацији са трајањем болести, вредностима *OCP* и *OHP*, указујући на перзистентно хиперкоагулационо стање у целој РА групи. Овакав закључак може да се изведе услед чињенице да високе вредности *OHP* и *OCP* са смањеним *OFFP* вредностима, указују на поремећену коагулацију и хиперкоагулационо стање (122). Пацијенти са већом активношћу болести, мерену параметром *DAS28*, имали су веће вредности *OHP* праћене смањењем *OFFP* параметра што може да указује на смањене вредности фибринолитичких фактора код пацијената са РА. Ови резултати су у корелацији са претходним студијама које су показале да РА, као аутоимуна инфламаторна болест, може довести до хиперкоагулационог стања, праћеног повећаним ризиком за кардиоваскуларне болести, као што су венски тромбоемболизам, мождани удар и акутни инфаркт миокарда као и убрзана атеросклероза са повећаним морталитетом (42) при чему традиционални фактори ризика за кардиоваскуларне болести могу делимично допринети кардиоваскуларним болестима у РА (43).

Најважнија веза између коагулације и фибринолизе, која дозвољава синхронизацију ова два система, је инхибитор фибринолизе (*TAFI*) (94). У нашој студији, пратили смо утицај *PTCI*, инхибитора *TAFI*, како бисмо испитали утицај РА на фибринолизу. Фибринолиза је физиолошки процес разградње тромба који обезбеђује важан баланс у хемостазу. Поремећаји фибринолитичких путева су повезани или са развојем тромба (ослабљеном фибринолизи) или, у мањој мери, крварењем (прекомерном фибринолизом). Ослабљена фибринолиза је забележена код пацијената са аутоимуним болестима и може допринети развоју хиперкоагулабилности и повећаном ризику за настанак тромбозе (185). Недостатак инхибитора фибринолизе, *PTCI*, довео је до продужене фибринолизе у менопаузалној контролној групи и обе РА групе. Додавање *PTCI* довело је до истог тренда са најкраћим временом лизе у пременопаузалним

контролама. Дуже време лизе код пацијента са РА забележено је у претходној студији при чему није праћена разлика на основу менопаузе (186). У нашој студији и менопауза и болест је утицала на ослабљену фибринолизу.

Поред неведеног, ови резултати су у корелацији са резултатима електронске микроскопије који указују да су све испитиване подгрупе имале гушћу структуру фибринског угрушка са мањим порама у односу на здраве жене које нису биле у менопаузи. У овој групи, пременопаузалној контроли, примећене су веће поре са мањом густином, која је више осетљива на фибринолизу (187). Ови резултати су потврђени вредностима ΔCLT (разлика између вредности времена лизе угрушка са *PTCI* и без *PTCI*), које је показало продужену фибринолизу у свим подгрупама, у поређењу са пременопаузалним контролама. Поред концентрације тромбина и фибриногена, могуће је да постоје други основни механизми од значаја за развој фибринске мреже у реуматоидном артритису, на коју такође може утицати и менопауза. Продужено време лизе угрушка, заједно са повећаним *OCP* и *OHP* и смањеним *OFP*, удружено је са хиперкоагулабилним стањем (188).

Супротно од наших резултата, *Kwasny-Krochin* и сарадници су пронашли да пацијенти са РА имају краћу *lag* фазу која указује на брже формирање фибринског угрушка за разлику од нашег истраживања где су пацијенти имали дужу *lag* фазу у односу на контролу. Бржа стопа полимеризације фибрина, представљена као *lag* фаза, предвиђена је параметром *PAI-1* у реуматоидном артритису (189). Међутим, ми нисмо мерили вредности *PAI-1* код пацијената у нашем истраживању, како бисмо видели повезаност овог параметра и *lag* времена, што може бити предмет даљих истраживања. Са друге стране, овакав резултат може бити услед разлике у полу, годинама, трајању и активности болести између наших пацијената и пацијената у наведеној студији. Поред тога, исти тренд виших максималних вредности апсорбанце је примећен у претходном истраживању (190)

Резултати нашег истраживања указују на неповољно измењену фибринску мрежу и морфологију влакана фибринског угрушка код пацијената са РА као и код здравих контрола у менопаузи. Употребом електронске микроскопије, показали смо да пацијенти са РА као и здраве контроле у менопаузи имају гушћу структуру фибринског угрушка са мањим порама. Исти резултати су примећени у претходној студији, где су поре мањих

величина нађене код пацијената са реуматоидним артритисом у поређењу са контролном групом (186). Наши резултати такође корелирају са студијом *Pretorius* и сарадници у којој су истраживачи пронашли да пацијенти са РА у поређењу са здравим контролама граде експанзивну фибринску мрежу (190) при чему компактни фибрински угрушци, односно гушћа фибринска мрежа представља поремећену коагулацију манифестовану као резистенција на фибринолизу (191). Угрушци са гушћом и мање пермеабилном структуром и са тањим и гушће упакованим фибринским нитима, лизирају много спорије у односу на угрушке са порознијом структуром (192). Претходне студије показале су да се компактнији угрушци формирају код особа са кардиоваскуларним болестима или другим стањима удруженим са повећаним кардиоваскуларним ризиком (193, 194). Са друге стране, угрушци са гушћом структуром су пронађени код здравих испитаника у менопаузи у поређењу са здравим женама у менопаузи. Објашњење оваквог резултата лежи у чињеници да је менопауза удружена са формирањем гушћих фибринских угрушака (195).

Вредности испитиваних параметара есеја укупног хемостатског потенцијала (*ОСР* и *ОНР*) су у корелацији са активношћу болести код пацијената са РА. Есеј је заснован на агрегацији фибрина и фибринолизи, указујући на укупну количину насталог фибрина у испитиваним узорцима, уз његову осетљивост на фибринолизу. Формирање фибрина је финални продукт процеса коагулације али такође и веома важан у раној имунопатогенези РА у синовијама. Наиме, фибрин је најраспрострањенији антиген у синовијалном компартману који се може подвргнути цитрулинацији и да се понаша као аутоантиген. Поред тога, стварање стабилне фибринске мреже је неопходно за контролу запаљенског процеса, с обзиром да се фибрински угрушак понаша као миграциони матрикс за различите типове ћелија, као што су макрофаги (196).

Формирање гушће структуре угрушка је повезана са повећаним ризиком за кардиоваскуларне болести и венски тромбоемболизам с обзиром да су овакви угрушци мање склони фибринолизи (194). Такође, менопауза може бити повезана са формирањем протромботичких фибринских угрушака (195). *Kwasny-Krochin* и сарадници су показали мању пермеабилност и гушћу структуру фибрина код пацијената са РА у поређењу са контролним узорцима (186). Према томе, ми смо пронашли неповољно измењену морфологију фибрина у реуматоидном артритису са компактном структуром, састављеном од тањих влакана и мањих унутрашњих пора, посебно када се пореди са

пременопаузалним здравим контролама. Ови угрушци теже лизирају, што може да се рефлектује кроз смањен укупни фибринолитички потенцијал – *OFP* и продужено време лизирања угрушка – *CLT* у испитиваним узорцима пацијената са РА. Додатно објашњење за смањену фибринолизу може бити повећана активност инхибитора фибринолизе (*TAFI*) која је показана у нашој студији. *TAFI* – карбоксипептидаза Б је ензим који је укључен у комуникацију између коагулације и фибринолизе, али такође има важну улогу у запаљенском процесу као инхибитор комплемента. На мишијем моделу аутоимуног артритиса, *TAFI* испољава антиинфламаторни ефекат одвајањем финалног продукта каскаде комплемента C5a (96). Према томе, активација *TAFI* услед повећане синтезе тромбина у РА са једне стране инхибира фибринолизу док са друге може да смањи инфламаторни терет у овој болести.

5.3. Утицај реуматоидног артритиса на редокс статус жена

У трећем делу студије, испитивали смо ефекте реуматоидног артритиса на редокс статус жена односно баланс између прооксидационих и антиоксидационих параметара у наведеној популацији.

Познато је да проинфламаторни медијатори као што су цитокини и простагландини имају значајну улогу у патогенези РА. Међутим, постоји снажан доказ да оксидациони стрес има додатни утицај кроз повећану продукцију реактивних кисеоничних врста на местима инфламације. Оксидациони стрес настаје или током повећаног стварања оксиданата или смањене елиминације од стране антиоксидационог система заштите. Међутим, остаје непознаница како менопауза код здравих жена и жена са реуматодним артритисом утиче на оксидациони статус.

Како је објашњено у уводном делу, оксидациони стрес представља неравнотежу која настаје услед повећане производње реактивних врста или услед њихове неадекватне равнотеже од стране антиоксидационог система.

Одређивањем прооксидационих параметара (супероксид анјон радикала, водоник пероксида, азот монооксида у форми нитрита као и маркера оксидационог оштећења, мереног као TBARS) пратили смо да ли долази до повећања вредности ових параметара, односно настанка самог оксидационог стреса. Са друге стране, праћењем маркера антиоксидационе заштите, пратили смо утицај саме болести на овај систем, да ли долази до губитка толеранције система заштите услед хроничне инфламације.

Претходне студије су показале да је ниво NO значајно виши код пацијента са РА у поређењу са здравим контролама (107, 197). NO је реактивна азотна врста коју у највећим проценту стварају макрофаги и представља важну компоненту у повећаним вредностима оксидационог стреса током инфламације и аутоимуности. Интересанто, у нашој студији, значајно повишене вредности нитрита примећене су код здравих контрола у поређењу са пацијентима који имају РА (График 33). Нека од могућих објашњења оваквих резултата је у чињеници да нитрити могу да реагују са супероксид анјон радикалом, при чему долази до стварања смртоносног пероксинитрита. Азот-моноксид (NO[•]) настаје деаминацијом L-аргинина из азот-моноксид синтазе (198).

Поред тога, приметили смо смањене вредности O_2^- код пацијената али без статистичке значајности (График 21). Ово такође може бити резултат претходно поменуте реакције синтезе пероксинитрита услед примарно виших вредности нитрита и супероксид анјон радикала код пацијената са РА која покреће реакцију између ових врста и смањује њихове вредности. O_2^- има полу-живот 10^{-6} секунде, док NO молекули има неколико секунди (199) при чему те чињенице подржавају ту могућност.

Осим тога, могуће је да си највеће вредности NO на самом месту запаљења, у зглобовима. Још један важан извор NO представљају зглобни хондроцити и синовијални фибробласти. Током хроничне инфламације која погађа зглобове, различите врсте ћелија као што су неутрофили, лимфоцити, мастоцити и макрофаги могу да доведу до повећаног настанка NO (197). *Kundu* и сарадници су показали значајно већу концентрацију NO у различитим биолошким течностима. Ниво интрацелуларног NO је био је 1,56 пута већи у изолованим моноцитима из крви пацијената са РА у односу на здраве испитанике и моноцитима синовијалног инфилтрата (111). Повећани нивои маркера за пероксинитрит и нитротирозин пронађени су у синовијалној течности пацијената са РА (198). Током дугог трајања болести и високе активности праћене вредностима параметра DAS28, могуће је да је на месту настанка реактивних кисеоничних врста, у зглобовима у којима постоји запаљење, постоји и снажна и брза реакција између NO и O_2^- и настанка пероксинитрата. Али, то остаје непознато, с обзиром да у нашој студији нисмо мерили вредности овог радикала.

Примарно место за везивање реактивних кисеоничних врста су двоструке везе у полинезасићеним масним киселинама у мембранама ћелија, које повећавају липидну пероксидацију и доводе до оксидативних оштећења. Штетни нуспродукти који настају услед оксидативних оштећења посредованом реактивним кисеоничним врстама као што су TBARS и малоналдеhid (MDA) доводе до синтезе различитих продуката и оштећења ткива код пацијената са РА. MDA је примарни биомаркер липидног оштећења изазваног слободним радикалима и оксидационог стреса (200).

Повећана липидна пероксидација која је показана у претходним студијама потврђује присуство оксидационог стреса у реуматоидном артритису. *Vasanthi* и сарадници су показали значајно веће вредности MDA код пацијената са РА у поређењу са контролном групом (197). Исти тренд је примећен у студији *Desai* и сарадници, где је

показано да средња вредност нивоа малоналдехида код здравих испитаника има ниже вредности у поређењу са пацијентима (201). Велики број претходно спроведених студија указује на повишен ниво малоналдехида код пацијената са РА у поређењу са здравим испитаницима у различитим биолошким узорцима (113, 201, 203). *Pasupathi* и сарадници су показали да је ниво TBARS у плазми и еритроцитима значајно повшен код пацијената са реуматоидним артритисом у поређењу са контролама (204) иста као и *Veselinovic* и сарадници (205) чији резултати корелирају са нашим истраживањем.

У нашој студији, вредности H_2O_2 су биле статистички веће код пацијената у односу на здраве контроле (График 29). Овај резултат прати смањену активност каталазе код пацијената са РА, која настаје као последица примарне улоге каталазе у елиминацији H_2O_2 . Претходне студије у популација пацијената са РА показале су повишене вредности концентрације H_2O_2 у односу на здраву популацију испитаника што је у корелацији са нашим резултатима (107, 205).

Наше истраживање је показало статистички значајно повишене активности супероксид дисмутазе и каталазе, као ензима антиоксидационе заштите, у контролној групи као и повишене вредности GSH у истој групи, без статистичке значајности (График 41). Ови ензими имају важну улогу у антиоксидационом систему заштите. Каталаза има различиту улогу у физиолошким и патолошким стањима. У физиолошким условима, каталаза има мали афинитет за H_2O_2 (у поређењу са глутатион-пероксидазом) док у случајевима повећане концентрације H_2O_2 , афинитет каталазе за ову кисеоничну врсту расте (114). Глутатион-пероксидаза користи редуковани глутатион као донор водоника за метаболисање H_2O_2 до воде. Поред тога, претходна истраживања показала су да је глутатион, главни тиолни антиоксиданс, важан антиинфламаторни медијатор (206). Два ензима антиоксидационе заштите, глутатион пероксидаза и каталаза су веома битна у регулацији метаболизма водоник-пероксида који у повећаним концентрацијама може довести до оштећења DNK, RNK као и липида. Улога SOD је у неутрализацији супероксид-анјон радикала, једне од главних кисеоничних врста које учествују у инфламацији (109).

Поред тога, активност CAT и SOD била је већа код здравих испитаника у поређењу са пацијентима (Графици 37 и 39). Исти тренд је забележен у студији Feiјоо и сарадника (102). Исто тако, већа активност супероксид дисмутазе и каталазе праћена сниженим

концентрацијама прооксидационих параметара код здравих контрола у поређењу са пацијентима са РА примећена је и у претходним истраживањима, која су у корелацији са нашим резултатима (113, 200, 201). У претходним истраживањима, вредности GSH биле су више у контролној групи у односу на пацијенте са РА (102, 113, 200, 201). У нашој студији, вредности GSH се нису статистички значајно разликовале између група што је у корелацији са резултатима студије Cimen и сарадници, код којих је примећен исти тренд (207).

Наши резултати су у корелацији са претходним истраживањима који указују на то да оксидациони стрес удружен са зглобом у којем постоји запаљенски процес, може узроковати разарање везивног ткива које доводи до периакуларних деформитета у РА.

Као што је раније поменуто, менопауза као форма репродуктивног старења је стање које се дефинише као губитак фолуларне активности јајника и последично изостанком менструалног циклуса, која физиолошки настаје између 45-55 године (208) или може бити последица хируршких интервенција, хемиотерапије или других обољења (209). Током менопаузе, долази до смањења и престанка секреције естрогена и прогестерона (210) који имају велики значај у развоју других патолошких стања. Оксидациони стрес игра важну улогу у процесу старења који за последицу има повећану концентрацију слободних радикала, као што су реактивне кисеоничне врсте које су присутне у значајно већој концентрацији у односу на антиоксидационе механизме заштите (211). У нашој студији примећена је знатно већа концентрација индекса липидне пероксидације код жена у менопаузи у односу на пременопаузалну групу и у популацији здравих испитаника као и код оболелих од РА. Могући разлог за овакве резултате јесте управо смањење концентрације естрогена код жена у менопаузи, односно сама структура ових хормона. При високим концентрацијама, естроген има тенденцију да ихнибира 8-хидроксилацију гуанинских ДНК база, при чему остварује антиоксидациони ефекат. Међутим, при ниским концентрацијама, посебно када у својој хемијској структури садржи катехол, овај хормон има прооксидациони ефекат, који доводи и до оксидације база (212).

У нашем истраживању, вредности оксидационог стреса биле су повишене у групи жена оболелих од реуматоидног артритиса у односу на здраве испитанике, док су вредности ензима антиоксидационе заштите биле мање у односу на здраву популацију.

Одређивање малондиалдехида и TBARS-а, представљају методе које се најчешће користе за праћење оксидационог стреса (213) и липидне пероксидације, као једног од процеса који настаје као последица деловања реактивних кисеоничних врста. Малондиалдеhid настаје пероксидацијом линолеинске, арахидонске и еикозапентаенске киселине и као такав представља посебно токсичан алдеhid (214). Последице липидне пероксидације могу бити смањење флуидности мембране и повећање њене пропустљивости за супстанце које у физиолошким условима пролазе само кроз јонске канале или посредством других мембранских протеина, инактивацију рецептора и ензима као и поремећај функције и структуре мембранских протеина (214).

Индекс липидне пероксидације показао је значајан пораст у групи жена које су у менопаузи у односу на здраве жене пре менопаузе. Претходна истраживања указују на повећање вредности укупног оксидационог стреса код жена у менопаузи, као и смањење укупног антоксидационог статуса у истој популацији код жена са дијагностикованом остеопорозом, у односу на здраву популацију (215). Повеће параметара оксидационог стреса било је присутно и у здравој популацији жена у менопаузи у поређењу са женама пре менопаузе, где је примећено статистички значајно повећење малоналдехида (216, 217), смањење глутатион пероксидазе (217) као и непромењене вредности супероксид-дисмутазе (216) које су и код нас биле непромењене.

Вредности азот-моноксида мерене концентрацијом нитрита, у нашој студији су показале смањене концентрације нитрита код жена оболелих од РА. Смањење овог вазодилататора игра веома важну улогу у развоју кардиоваскуларних болести доводећи до пролиферације глатких мишића, инфламације и атерогених ефеката на васкулатуру (218, 219). Поред тога, резултати наше студије показали су значајно смањење концентрације нитрита код жена оболелих од РА у пременопаузи у односу на контролну групу жена у пременопаузи, као и смањење вредности овог параметра код жена оболелих од РА у односу на популацију здравих жена исте доби. Претходна истраживања указују да постменопаузалне жене имају мању концентрацију азот-моноксида у односу на жене које нису у менопаузи (220). Такође, већи ниво азот-моноксида је примећен код пременопаузалних жена и као такав има кардиопротективни ефекат као и инхибиторни ефекат на пропагацију глатких мишића, које је карактеристична за болести срца (218). У нашој студији није показана значајна разлика између ових популација. Све ово указује на

веома битну улогу естрогена и других хормона у менопаузи као и повећање ризика за настанак кардиоваскуларних болести. Управо због тога, развијен је велики број лекова који се користи у терапији дефицита естрогена и неповољног редокс статуса при чему су показали позитиван ефекат за ове индикације. Особе које не могу да толеришу ове лекове или њихове нежељене ефекте, физичка активност и суплементација антиоксидансима такође се могу користити за сузбијање симптома менопаузе (220).

Све ово додатно представља велики ризик код пацијенткиња са РА, с обзиром на већ поменути чињеницу да инфламација такође повећава ризик за настанак кардиоваскуларних морбидитета и морталитета. Овакав резултат корелира и са резултатима глобалних метода хемостазе, где је показано да код здравих жена које су у менопаузи као и код пацијенткиња пре и након менопаузе долази до активације коагулације и смањења фибринолитичког потенцијала, у односу на здраву популацију жена које нису у менопаузи.

VI

ЗАКЉУЧЦИ

6. ЗАКЉУЧЦИ

1. Анализирајући резултате глобалних метода хемостазе, ово истраживање указује да је коагулација снажно погођена дуготрајном инфламацијом код пацијената са реуматоидним артритисом, и менопаузом код здравих жена.
2. Параметри глобалних хемостатских метода могу бити корисни у дијагностиковању и праћењу хиперкоагулационог стања код пацијената са РА. Нивои укупног коагулационог потенцијала (*OCP*) и укупног хемостатског потенцијала (*ONP*) су у корелацији са активношћу болести код пацијената са РА, мереним параметром *DAS28*.
3. Свеобухватна процена хемостазе указује на перзистентну активацију коагулације код пременопаузалних жена са установљеним РА. Пацијенти су добро описани и за присуство традиционалних кардиоваскуларних фактора ризика, лекова коришћених у току узорковања крви и присуства умерене до високе активности болести, што је омогућило процену у реалном животном окружењу.
4. Посматрајући структуру фибринског угрушка, код пацијената са РА у пременопаузи и у менопаузи, као и код здравих контрола у менопаузи, постоји неповољно измењена фибринска мрежа и морфологија влакана фибринског угрушка. Пацијенти са РА као и здраве контроле у менопаузи имају гушћу структуру фибринског угрушка са мањим порама, која је мање осетљива на фибринолизу.
5. Укупни фибринолитички потенцијал (*OFP*) је у негативној корелацији са ΔCLT код пацијената са РА, показујући да је поремећена фибринолиза повезана са повећаном *TAFI* активношћу.
6. Резултати глобалних метода хемостазе иду у прилог хипотези студије, да су и инфламаторна болест и менопауза активатори хемостазе. Код особа са РА затвара се "gap", односно потпуно смањује разлика између параметара хемостазе пре и након менопаузе у односу на разлике ових параметара код здравих жене пре и након менопаузе, које остају значајно различите.
7. Укупна концентрација микропартикула била је значајно већа код жена оболелих од РА као и концентрација микропартикула које потичу од тромбоцита.

Микропартикуле које потичу од тромбоцита могу бити потенцијални биомаркер за РА.

8. Редокс статус код пацијенткиња са РА је промењен и огледа се у повећању вредности прооксидационих параметара и смањењу активности параметара антиоксидационе заштите. Примећено повећање реактивних кисеоничних врста и индекса липидне пероксидације као и смањење активности антиоксидационог система заштите, доводи до настанка оксидационог стреса који може допринети оштећењу ткива и хрскавице код пацијената са РА и до хроничног тока болести. Ови резултати могу да укажу на потребу и бенефит примене антиоксиданаса у виду суплемената код жена са реуматоидним артритисом.
9. Неспецифични параметри инфламације, седиментација, Ц-реактивни протеин и фибриноген су значајно повишени код пацијената са РА. Значајна корелације је примећена у вредностима, Ц-реактивног протеина и седиментације нивоима укупног коагулационог потенцијала (*ОСР*) и укупног хемостатског потенцијала (*ОНР*) што додатно говори у прилог могуће употребе глобалних метода хемостазе за праћење терапије и дијагностиковања хиперкоагулационог стања код пацијента са реуматоидном артритисом.

VII

ЛИТЕРАТУРА

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Goldblatt F, O'Neill SG. Clinical aspects of autoimmune rheumatic diseases. *Lancet* 2013; 382(9894): 797-808.
2. Moroni L, Bianchi I, Lleo A. Geoepidemiology, gender and autoimmune disease. *Autoimmun Rev* 2012; 11(6-7): A386-392.
3. Quintero OL, Amador-Patarroyo MJ, Montoya-Ortiz G, Rojas-Villarraga A, Anaya JM. Autoimmune disease and gender: plausible mechanisms for the female predominance of autoimmunity. *J Autoimmun* 2012; 38(2-3): J109-19.
4. Oliver JE, Silman AJ. Why are women predisposed to autoimmune rheumatic diseases? *Arthritis Res Ther* 2009; 11(5): 252.
5. Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2016; 388(10055): 2023-38.
6. Dye JR, Ullal AJ, Pisetsky DS. The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol* 2013; 78(2): 140-8.
7. Angelotti F, Parma A, Cafaro G, Capecchi R, Alunno A, Puxeddu I. One year in review 2017: pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2017; 35(3): 368-78.
8. Talsania M, Scofield RH. Menopause and Rheumatic Disease. *Rheum Dis Clin North Am* 2017; 43(2): 287-302.
9. Cross M, Smith E, Hoy D, Carmona L, Wolfe F, Vos T, et al. The global burden of rheumatoid arthritis: estimates from the global burden of disease 2010 study. *Ann Rheum Dis* 2014; 73(7): 1316-22.
10. Ungurianu A, Margină D, Grădinaru D, Băcanu C, Ilie M, Tsitsimpikou C, et al. Lipoprotein redox status evaluation as a marker of cardiovascular disease risk in patients with inflammatory disease. *Mol Med Rep* 2017; 15(1): 256-62.
11. Sokka T, Toloza S, Cutolo M, Kautiainen H, Makinen H, Gogus F, et al; QUEST-RA Group. Women, men, and rheumatoid arthritis: analyses of disease activity, disease characteristics, and treatments in the QUEST-RA study. *Arthritis Res Ther* 2009; 11(1): R7.

12. Rojas-Villarraga A, Toro CE, Espinosa G, Rodríguez-Velosa Y, Duarte-Rey C, Mantilla RD, et al. Factors influencing polyautoimmunity in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 2010; 9(4): 229-32.
13. Smolen JS, Aletaha D, Barton A, Burmester GR, Emery P, Firestein GS, et al. Rheumatoid arthritis. *Nat Rev Dis Primers* 2018; 4: 18001.
14. Boyer JF, Gourraud PA, Cantagrel A, Davignon JL, Constantin A. Traditional cardiovascular risk factors in rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Joint Bone Spine* 2011; 78(2): 179-83.
15. Tobón GJ, Youinou P, Saraux A. The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 2010; 9(5): A288-92.
16. van den Oever IA, Sattar N, Nurmohamed MT. Thromboembolic and cardiovascular risk in rheumatoid arthritis: role of the haemostatic system. *Ann Rheum Dis* 2014; 73(6): 954-7.
17. Alamanos Y, Voulgari PV, Drosos AA. Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis, based on the 1987 American College of Rheumatology criteria: a systematic review. *Semin Arthritis Rheum* 2006; 36(3): 182-8.
18. Del Puente A, Knowler WC, Pettitt DJ, Bennett PH. High incidence and prevalence of rheumatoid arthritis in Pima Indians. *Am J Epidemiol* 1989; 129(6): 1170-8.
19. Harvey J, Lotze M, Stevens MB, Lambert G, Jacobson D. Rheumatoid arthritis in a Chippewa Band. I. Pilot screening study of disease prevalence. *Arthritis Rheum* 1981; 24(5): 717-21.
20. Guillemin F, Saraux A, Guggenbuhl P, Roux CH, Fardellone P, Le Bihan E, Cantagrel A, Chary-Valckenaere I, Euller-Ziegler L, Flipo RM, Juvin R, Behier JM, Fautrel B, Masson C, Coste J. Prevalence of rheumatoid arthritis in France: 2001. *Ann Rheum Dis*. 2005; 64(10): 1427-30.
21. Adomaviciute D, Pileckyte M, Baranauskaite A, Morvan J, Dadoniene J, Guillemin F. Prevalence survey of rheumatoid arthritis and spondyloarthritis in Lithuania. *Scand J Rheumatol* 2008; 37(2): 113-9.
22. Tuncer T, Gilgil E, Kaçar C, Kurtaiş Y, Kutlay Ş, Bütün B, et al. Prevalence of Rheumatoid Arthritis and Spondyloarthritis in Turkey: A Nationwide Study. *Arch Rheumatol*. 2017; 33(2): 128-36.

23. Zlatković-Švenda MI, Stojanović RM, B Šipetić-Grujičić S, Guillemin F. Prevalence of rheumatoid arthritis in Serbia. *Rheumatol Int* 2014; 34(5): 649-58.
24. Amadori A, Zamarchi R, De Silvestro G, Forza G, Cavatton G, Danieli GA, Clementi M, Chieco-Bianchi L. Genetic control of the CD4/CD8 T-cell ratio in humans. *Nat Med* 1995; 1(12): 1279-83.
25. Cutolo M, Capellino S, Sulli A, Seriola B, Secchi ME, Villaggio B, et al. Estrogens and autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1089: 538-47.
26. Lleo A, Battezzati PM, Selmi C, Gershwin ME, Podda M. Is autoimmunity a matter of sex? *Autoimmun Rev* 2008; 7(8): 626-30.
27. Castagnetta LA, Carruba G, Granata OM, Stefano R, Miele M, Schmidt M, et al. Increased estrogen formation and estrogen to androgen ratio in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2003; 30(12): 2597-605.
28. Cutolo M, Seriola B, Villaggio B, Pizzorni C, Craviotto C, Sulli A. Androgens and estrogens modulate the immune and inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 966: 131-42.
29. Kaliterna DM, Perković D, Radić M, Krstulović DM, Borić K, Marinović I. Sex hormones, immune disorders, and inflammatory rheumatic diseases. *Reumatizam* 2014; 61(1): 17-22.
30. Cutolo M, Sulli A, Capellino S, Villaggio B, Montagna P, Pizzorni C, Paolino S, Seriola B, Felli L, Straub RH. Anti-TNF and sex hormones. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1069: 391-400.
31. Spector TD, Perry LA, Tubb G, Silman AJ, Huskisson EC. Low free testosterone levels in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1988; 47(1): 65-8.
32. Bellucci E, Terenzi R, La Paglia GM et al.: One year in review 2016: pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2016; 34(5): 793-801.
33. Haus E, Sackett-Lundeen L, Smolensky MH. Rheumatoid arthritis: circadian rhythms in disease activity, signs and symptoms, and rationale for chronotherapy with corticosteroids and other medications. *Bull NYU Hosp Jt Dis* 2012; 70 Suppl1: 3-10.
34. Zoli A, Lizzio MM, Ferlisi EM, Massafra V, Mirone L, Barini A, Scuderi F, Bartolozzi F, Magaró M. ACTH, cortisol and prolactin in active rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2002; 21(4): 289-93.

35. Silman AJ, MacGregor AJ, Thomson W, Holligan S, Carthy D, Farhan A, et al. Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study. *Br J Rheumatol* 1993; 32(10): 903-7.
36. Pikwer M, Bergstrom U, Nilsson JA, Jacobsson L, Turesson C. Early menopause is an independent predictor of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2012; 71: 378–81.
37. Pikwer M, Nilsson JÅ, Bergström U, Jacobsson LT, Turesson C. Early menopause and severity of rheumatoid arthritis in women older than 45 years. *Arthritis Res Ther* 2012; 14(4): R190.
38. Bengtsson C, Malspeis S, Orellana C, Sparks JA, Costenbader KH, Karlson EW. Association Between Menopausal Factors and the Risk of Seronegative and Seropositive Rheumatoid Arthritis: Results From the Nurses' Health Studies. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2017; 69(11): 1676–84
39. Burmester GR, Pope JE. Novel treatment strategies in rheumatoid arthritis. *Lancet* 2017; 389(10086):2338-2348.
40. Goemaere S, Ackerman C, Goethals K, De Keyser F, Van der Straeten C, Verbruggen G, Mielants H, Veys EM. Onset of symptoms of rheumatoid arthritis in relation to age, sex and menopausal transition. *J Rheumatol* 1990; 17(12): 1620-2.
41. Avina-Zubieta JA, Thomas J, Sadatsafavi M, Lehman AJ, Lacaille D. Risk of incident cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. *Ann Rheum Dis* 2012; 71(9): 1524-9.
42. Lauper K, Gabay C. Cardiovascular risk in patients with rheumatoid arthritis. *Semin Immunopathol* 2017; 39(4): 447-59.
43. Baghdadi LR, Woodman RJ, Shanahan EM, Mangoni AA. The impact of traditional cardiovascular risk factors on cardiovascular outcomes in patients with rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2015; 10(2): e0117952.
44. Chung WS, Peng CL, Lin CL, Chang YJ, Chen YF, Chiang JY, Sung FC, Kao CH. Rheumatoid arthritis increases the risk of deep vein thrombosis and pulmonary thromboembolism: a nationwide cohort study. *Ann Rheum Dis* 2014; 73(10): 1774-80.
45. Ramagopalan SV, Wotton CJ, Handel AE, Yeates D, Goldacre MJ. Risk of venous thromboembolism in people admitted to hospital with selected immune-mediated diseases: record-linkage study. *BMC Med* 2011; 9: 1.

46. Solomon DH, Bitton A, Katz JN, Radner H, Brown EM, Fraenkel L. Review: treat to target in rheumatoid arthritis: fact, fiction, or hypothesis? *Arthritis Rheumatol* 2014; 66(4): 775-82.
47. van Nies JA, Krabben A, Schoones JW, et al. What is the evidence for the presence of a therapeutic window of opportunity in rheumatoid arthritis? A systematic literature review. *Ann Rheum Dis* 2014; 73: 861–70. 8
48. van Nies JA, Tsonaka R, Gaujoux-Viala C, Fautrel B, van der Helm-van Mil AH. Evaluating relationships between symptom duration and persistence of rheumatoid arthritis: does a window of opportunity exist? Results on the Leiden early arthritis clinic and ESPOIR cohorts. *Ann Rheum Dis* 2015; 74: 806–12.
49. Burmester GR, Bijlsma JWJ, Cutolo M, McInnes IB. Managing rheumatic and musculoskeletal diseases - past, present and future. *Nat Rev Rheumatol*. 2017; 13(7): 443-448.
50. 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.
51. Barbhuiya M, Solomon DH. Rheumatoid arthritis and cardiovascular disease: an update on treatment issues. *Curr Opin Rheumatol* 2013; 25(3): 317-24.
52. Kisiel B, Kruszewski R, Juskiewicz A, Raczekiewicz A, Bachta A, Thustochowicz M, Staniszewska-Varga J, Kłos K, Duda K, Bogusławska-Walecka R, Płoski R, Thustochowicz W. Methotrexate, Cyclosporine A, and Biologics Protect against Atherosclerosis in Rheumatoid Arthritis. *J Immunol Res* 2015; 2015: 759610.
53. Carbone F, Bonaventura A, Liberale L, Paolino S, Torre F, Dallegri F, Montecucco F, Cutolo M. Atherosclerosis in Rheumatoid Arthritis: Promoters and Opponents. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2018. doi: 10.1007/s12016-018-8714-z.[Epub ahead of print].
54. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*. 2013; 200:373–83.
55. Sellam J, Proulle V, Jüngel A, Ittah M, Miceli Richard C, Gottenberg JE, Toti F, Benessiano J, Gay S, Freyssinet JM, Mariette X. Increased levels of circulating microparticles in primary Sjögren's syndrome, systemic lupus erythematosus and

- rheumatoid arthritis and relation with disease activity. *Arthritis Res Ther.* 2009; 11(5): R156.
56. Cunningham M, Marks N, Barnado A, Wirth JR, Gilkeson G, Markiewicz M. Are microparticles the missing link between thrombosis and autoimmune diseases? Involvement in selected rheumatologic diseases. *Semin Thromb Hemost.* 2014; ., 40(6): 675-81.
 57. Rodríguez-Carrio J, Alperi-López M, López P, Alonso-Castro S, Carro-Esteban SR, Ballina-García FJ, Suárez A. Altered profile of circulating microparticles in rheumatoid arthritis patients. *Clin Sci (Lond).* 2015; 128(7): 437-48.
 58. Pisetsky DS, Ullal AJ, Gauley J, Ning TC. Microparticles as mediators and biomarkers of rheumatic disease. *Rheumatology (Oxford)* 2012; 51(10): 1737-46.
 59. Olumuyiwa-Akeredolu OO, Pretorius E. Platelet and red blood cell interactions and their role in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* 2015; 35(12): 1955-64.
 60. Teruel R, Corral J, Perez-Andreu V, Martinez-Martinez I, Vicente V, Martinez C. Potential role of miRNAs in developmental haemostasis. *PLoS One* 2011; 6: e17648.
 61. Barbati C, Vomero M, Colasanti T, Ceccarelli F, Marcosano M, Miranda F, Novelli L, Pecani A, Perricone C, Spinelli FR, Truglia S, Conti F, Valesini G, Alessandri C. Microparticles and autophagy: a new frontier in the understanding of atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *Immunol Res* 2018; 66(6): 655-62.
 62. Morel O, Toti F, Hugel B, Freyssinet JM. Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. *Curr Opin Hematol.* 2004; 11(3):156-64.
 63. Yong PJ, Koh CH, Shim WS. Endothelial microparticles: missing link in endothelial dysfunction? *Eur J Prev Cardiol.* 2013; 20(3):496-512.
 64. Schroit AJ, Tanaka Y, Madsen J, Fidler IJ. The recognition of red blood cells by macrophages: role of phosphatidylserine and possible implications of membrane phospholipid asymmetry. *Biol Cell Auspices Eur Cell Biol Organ.* 1984; 51:227–38.
 65. Erdbrugger U, Le TH. Extracellular vesicles in renal diseases: more than novel biomarkers? *J Am Soc Nephrol* 2016; 27: 12–26.
 66. Mobarrez F, Abraham-Nordling M, Aguilera-Gatica K, Friberg I, Antovic A, Pisetsky DS, et al. The expression of microvesicles in the blood of patients with Graves' disease and its relationship to treatment. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2016; 84(5): :729-35.

67. Mause SF, von Hundelshausen P, Zerneck A, Koenen RR, Weber C. Platelet microparticles: a transcellular delivery system for RANTES promoting monocyte recruitment on endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 1512–8.
68. Mause SF, Weber C. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ Res* 2010; 107: 1047–57.
69. Knijff-Dutmer EA, Koerts J, Nieuwland R, Kalsbeek-Batenburg EM, van de Laar MA. Elevated levels of platelet microparticles are associated with disease activity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 1498–503.
70. Melki I, Tessandier N, Zufferey A, Boilard E. Platelet microvesicles in health and disease. *Platelets* 2017; 28(3): 214–21.
71. Nozaki T, Sugiyama S, Sugamura K, Ohba K, Matsuzawa Y, Konishi M, Matsubara J, Akiyama E, Sumida H, Matsui K, Jinnouchi H, Ogawa H. Prognostic value of endothelial microparticles in patients with heart failure. *Eur J Heart Fail* 2010; 12(11): 1223-8.
72. Fan W, Wang W, Wu J, Ma L, Guo J. Identification of CD4(+) T-cell-derived CD161(+) CD39(+) and CD39(+)CD73(+) microparticles as new biomarkers for rheumatoid arthritis. *Biomark Med* 2017; 11(2): 107-116.
73. Harifi G, Sibia J. Pathogenic role of platelets in rheumatoid arthritis and systemic autoimmune diseases. Perspectives and therapeutic aspects. *Saudi Med J* 2016; 37(4): 354-60.
74. Boilard E, Nigrovic PA, Larabee K, Watts GF, Coblyn JS, Weinblatt ME, Massarotti EM, Remold-O'Donnell E, Farndale RW, Ware J, Lee DM. Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science* 2010; 327(5965): 580-3.
75. Michou L, Cornélis F, Baron M, Bombardieri S, Balsa A, Westhovens R, Barrera P, Alves H, Radstake TR, Migliorini P, Bardin T, Petit-Teixeira E, Boilard E. Association study of the platelet collagen receptor glycoprotein VI gene with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2013; 31(5): 770-2.
76. Ollikainen E, Mikkelsson J, Perola M, Penttilä A, Karhunen PJ. Platelet membrane collagen receptor glycoprotein VI polymorphism is associated with coronary thrombosis and fatal myocardial infarction in middle-aged men. *Atherosclerosis* 2004; 176(1): 95-9.

77. Eaton DL, Malloy BE, Tsai SP, Henzel W, Drayna D. Isolation, molecular cloning, and partial characterization of a novel carboxypeptidase B from human plasma. *J Biol Chem* 1991; 266(32): 21833-8.
78. Hsu J, Gu Y, Tan SL, Narula S, DeMartino JA, Liao C. Bruton's Tyrosine Kinase mediates platelet receptor-induced generation of microparticles: a potential mechanism for amplification of inflammatory responses in rheumatoid arthritis synovial joints. *Immunol Lett* 2013;150(1-2): 97-104.
79. Brodsky SV, Zhang F, Nasjletti A, Goligorsky MS. Endothelium-derived microparticles impair endothelial function in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286(5): H1910-5.
80. Myers DD, Hawley AE, Farris DM, Wroblewski SK, Thanaporn P, Schaub RG, Wagner DD, Kumar A, Wakefield TW. P-selectin and leukocyte microparticles are associated with venous thrombogenesis. *J Vasc Surg* 2003, 38(5):1075-89. Erratum in: *J Vasc Surg*. 2004; 39(1):188.
81. Nomura S, Kanazawa S, Fukuhara S: Effects of eicosapentaenoic acid on platelet activation markers and cell adhesion molecules in hyperlipidemic patients with Type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* 2003, 17:153–159.
82. Myers D Jr, Farris D, Hawley A, Wroblewski S, Chapman A, Stoolman L, Knibbs R, Strieter R, Wakefield T. Selectins influence thrombosis in a mouse model of experimental deep venous thrombosis. *J Surg Res* 2002; 108(2): 212-21.
83. Connor DE, Exner T, Ma DD, Joseph JE. Detection of the procoagulant activity of microparticle-associated phosphatidylserine using XACT. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2009; 20: 558–64.
84. Mackman N. The many faces of tissue factor. *J Thromb Haemost.* 2009;7 Suppl 1:136-9.
85. Lacroix R, Sabatier F, Mialhe A, Basire A, Pannell R, Borghi H, et al. Activation of plasminogen into plasmin at the surface of endothelial microparticles: a mechanism that modulates angiogenic properties of endothelial progenitor cells in vitro. *Blood*. 2007; 110:2432–9.
86. Seré KM, Hackeng TM. Basic mechanisms of hemostasis. *Semin Vasc Med*. 2003; 3(1): 3-12.

87. Egorina EM, Sovershaev MA, Hansen JB. The role of tissue factor in systemic inflammatory response syndrome. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2011; 22(6): 451-6.
88. Levi M, van der Poll T, Büller HR. Bidirectional relation between inflammation and coagulation. *Circulation* 2004 ;109(22): 2698-704.
89. Salvagno GL, Berntorp E. Thrombin Generation Assays (TGAs). *Methods Mol Biol.* 2017; 1646: 515-22.
90. Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost.* 2005; 3(8): 1894-904.
91. Hoppe B. Fibrinogen and factor XIII at the intersection of coagulation, fibrinolysis and inflammation. *Thromb Haemost.* 2014; 112(4): 649-58.
92. Flick MJ, LaJeunesse CM, Talmage KE, Witte DP, Palumbo JS, Pinkerton MD, Thornton S, Degen JL. Fibrin(ogen) exacerbates inflammatory joint disease through a mechanism linked to the integrin alphaMbeta2 binding motif. *J Clin Invest* 2007; , 117(11): 3224-35.
93. Dahlbäck B, Villoutreix BO. Regulation of blood coagulation by the protein C anticoagulant pathway: novel insights into structure-function relationships and molecular recognition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25(7): 1311-20.
94. Miljić P, Heylen E, Willemse J, Djordjević V, Radojković D, Colović M, Elezović I, Hendriks D. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI): a molecular link between coagulation and fibrinolysis. *Srp Arh Celok Lek* 2010; 138 Suppl 1: 74-8.
95. Nesheim M, Wang W, Boffa M, Nagashima M, Morser J, Bajzar L. Thrombin, thrombomodulin and TAFI in the molecular link between coagulation and fibrinolysis. *Thromb Haemost* 1997; 78(1): 386-91.
96. Song JJ, Hwang I, Cho KH, Garcia MA, Kim AJ, Wang TH, et al. Plasma carboxypeptidase B downregulates inflammatory responses in autoimmune arthritis. *J Clin Invest* 2011; 121(9): 3517-27.
97. Mosnier LO, Buijtenhuijs P, Marx PF, Meijers JC, Bouma BN. Identification of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) in human platelets. *Blood* 2003; 101(12): 4844-6.
98. Redlitz A, Tan AK, Eaton DL, Plow EF. Plasma carboxypeptidases as regulators of the plasminogen system. *J Clin Invest* 1995; 96(5): 2534-8.
99. Orbe J, Alexandru N, Roncal C, Belzunce M, Bibiot P, Rodriguez JA, Meijers JC, Georgescu A, Paramo JA. Lack of TAFI increases brain damage and microparticle

- generation after thrombolytic therapy in ischemic stroke. *Thromb Res* 2015; 136(2): 445-50.
100. Zöller B, Li X, Sundquist J, Sundquist K. Autoimmune diseases and venous thromboembolism: a review of the literature. *Am J Cardiovasc Dis* 2012; 2(3): 171-83.
101. Sack MN, Fyhrquist FY, Saijonmaa OJ, Fuster V, Kovacic JC. Basic Biology of Oxidative Stress and the Cardiovascular System: Part 1 of a 3-Part Series. *J Am Coll Cardiol* 2017; 70(2): 196-211.
102. Feijóo M, Túnez I, Ruiz A, Tasset I, Muñoz E, Collantes E. Oxidative stress biomarkers as indicator of chronic inflammatory joint diseases stage. *Reumatol Clin* 2010; 6(2): 91-4.
103. Đukić M, Ninković M, Jovanović M. Oxidative stress: Clinical diagnostic significance. *Journal of Medical Biochemistry* 2008; 27(4): 409-425.
104. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 2006; 141(2): 312-22.
105. Cohen G. Enzymatic/nonenzymatic sources of oxyradicals and regulation of antioxidant defenses. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 738: 8-14.
106. Colak E. New markers of oxidative damage to macromolecules. *Journal of Medical Biochemistry* 2008; 27 (1): 1–16.
107. Khojah HM, Ahmed S, Abdel-Rahman MS, Hamza AB. Reactive oxygen and nitrogen species in patients with rheumatoid arthritis as potential biomarkers for disease activity and the role of antioxidants. *Free Radic Biol Med* 2016; 97: 285-291.
108. Vaya J. Exogenous markers for the characterization of human diseases associated with oxidative stress. *Biochimie* 2013; 95(3): 578-84.
109. Mateen S, Moin S, Zafar A, Khan AQ. Redox signaling in rheumatoid arthritis and the preventive role of polyphenols. *Clin Chim Acta* 2016; 463: 4-10.
110. Bates EJ, Lowther DA, Handley CJ. Oxygen free-radicals mediate an inhibition of proteoglycan synthesis in cultured articular cartilage. *Ann Rheum Dis* 1984; 43(3): 462-9.
111. Kundu S, Ghosh P, Datta S, Ghosh A, Chattopadhyay S, Chatterjee M. Oxidative stress as a potential biomarker for determining disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Free Radic Res* 2012; 46(12): 1482-9.

112. Tiku ML, Shah R, Allison GT. Evidence linking chondrocyte lipid peroxidation to cartilage matrix protein degradation. Possible role in cartilage aging and the pathogenesis of osteoarthritis. *J Biol Chem* 2000; 275: 20069–76.
113. Mateen S, Moin S, Khan AQ, Zafar A, Fatima N. Increased Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress in Rheumatoid Arthritis. *PLoS One* 2016; 11(4): e0152925.
114. Kalpakcioglu B, Senel K. The interrelation of glutathione reductase, catalase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and glucose-6-phosphate in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2008; 27(2): 141-5.
115. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis.* 2010; 69(9): 1580-8.
116. Smolen JS, Breedveld FC, Schiff MH, Kalden JR, Emery P, Eberl G, van Riel PL, Tugwell P. A simplified disease activity index for rheumatoid arthritis for use in clinical practice. *Rheumatology (Oxford)*. 2003; 42(2): 244-57.
117. Gossec L, Paternotte S, Aanerud GJ, Balanescu A, Boumpas DT, Carmona L, et al. Finalisation and validation of the rheumatoid arthritis impact of disease score, a patient-derived composite measure of impact of rheumatoid arthritis: a EULAR initiative. *Ann Rheum Dis* 2011; 70(6): 935-42
118. Maksimovic M, Lazarevic M, Erdeljan B, Savic A. uticaj jutarnje ukocenosti, vrednosti DAS 28 i DAS28CRP, vas aktivnosti bolesti na vrednosti HAQ-DI skora kod pacijenata obolelih od reumatoidnog artritisa lecenih biologskom terapijom MD-Medical Data 2014; 6(3): 237-242
119. Fransen J, van Riel PL. The Disease Activity Score and the EULAR response criteria. *Rheum Dis Clin North Am* 2009; 35(4): 745-57, vii-viii.
120. Bruce B, Fries JF. The Stanford Health Assessment Questionnaire: a review of its history, issues, progress, and documentation. *J Rheumatol.* 2003; 30(1):167-78.
121. Antovic JP, Mikovic D, Elezovic I, Holmström M, Wilkens M, Elfvinge P, Mahmoud Hourani Soutari N, Antovic A. Two global haemostatic assays as additional tools to monitor treatment in cases of haemophilia A. *Thromb Haemost.* 2012; 108(1): 21-31.

122. Antovic A. The overall hemostasis potential: a laboratory tool for the investigation of global hemostasis. *Semin Thromb Hemost* 2010; 36(7): 772-9.
123. Carter AM, Cymbalista CM, Spector TD, Grant PJ; clot, EuroCLOT Investigators. Heritability of formation, morphology, and lysis: the EuroCLOT study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27(12): 2783-9
124. Antovic A, Mikovic D, Elezovic I, Zabczyk M, Huttenby K, Antovic JP. Improvement of fibrin clot structure after factor VIII injection in haemophilia A patients treated on demand. *Thromb Haemost* 2014; 111(4): 656-61.
125. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351–8.
126. Pick E, Keisari Y. A simple colometric method for the measurement of hydrogen peroxide by cells in culture. *J Immunol Methods* 1980; 38: 161–70.
127. Auclair C, Voisin E. Nitrobluetetrazolium reduction. In: Greenwald RA (ed) *Handbook of methods for oxygen radical research*. CRP Press, Boca Raton 1985: pp 123–32.
128. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PI, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; 126: 131–8.
129. McCord JM, Fridovich I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J Biol Chem* 1969; , 244: 6056–63.
130. Beutler E. Catalase. In: Beutler E (ed) *Red cell metabolism, a manual of biochemical methods*. Grune and Stratton, New York 1982: pp 105–6.
131. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxidedismutase. *J BiolChem* 1972; 247: 3170–5.
132. Beutler E. Superoxide dismutase. In: Beutler E, ed. *Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods*. Philadelphia: Grune and Stratton; 1984: 83-85.
133. Beutler E. Reduced glutathione (GSH). In: Beutler E (ed) *Red cell metabolism, a manual of biochemical methods*. Grune and Stratton, New York 1975: pp 112–4.
134. Lacroix R, Dubois C, Leroyer AS, Sabatier F, Dignat-George F. Revisited role of microparticles in arterial and venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 2013; 11 Suppl 1: 24-35.

135. Zhang Y, Zhao C, Wei Y, Yang S, Cui C, Yang J, Zhang J, Qiao R. Increased circulating microparticles in women with preeclampsia. *Int J Lab Hematol* 2018; 40(3): 352-358.
136. van Eijk IC, Tushuizen ME, Sturk A, Dijkmans BA, Boers M, Voskuyl AE, et al. Circulating microparticles remain associated with complement activation despite intensive anti-inflammatory therapy in early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2010; 69(7):1378-82.
137. Iversen LV, Østergaard O, Ullman S, Nielsen CT, Halberg P, Karlsmark T, et al. Circulating microparticles and plasma levels of soluble E- and P-selectins in patients with systemic sclerosis. *Scand J Rheumatol* 2013; 42(6): 473-82.
138. Guiducci S, Distler JH, Jungel A, Huscher D, Huber LC, Michel BA, et al. The relationship between plasma microparticles and disease manifestations in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2008; 58: 2845–53.
139. Chamouard P, Desprez D, Hugel B, Kunzelmann C, Gidon-Jeangirard C, Lessard M, et al. Circulating cell-derived microparticles in Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 2005; 50: 574–80.
140. Pereira J, Alfaro G, Goycoolea M, Quiroga T, Ocqueteau M, Massardo L, et al. Circulating platelet-derived microparticles in systemic lupus erythematosus. Association with increased thrombin generation and procoagulant state. *Thromb Haemost* 2006; 95(1): 94–9.
141. Combes V, Simon AC, Grau GE, Arnoux D, Camoin L, Sabatier F, et al. In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J Clin Invest* 1999; 104: 93–102.
142. Erdbruegger U, Grossheim M, Hertel B, Wyss K, Kirsch T, Woywodt A, et al. Diagnostic role of endothelial microparticles in vasculitis. *Rheumatology (Oxford)* 2008; 47: 1820–5.
143. Daniel L, Fakhouri F, Joly D, Mouthon L, Nusbaum P, Grunfeld JP, et al. Increase of circulating neutrophil and platelet microparticles during acute vasculitis and hemodialysis. *Kidney Int* 2006; 69:1416–23.
144. Shirafuji T, Hamaguchi H, Higuchi M, Kanda F. Measurement of platelet-derived microparticle levels using an enzyme-linked immunosorbent assay in polymyositis and dermatomyositis patients. *Muscle nerve* 2009; 39: 586–90.

145. Burnouf T, Goubran HA, Chou ML, Devos D, Radosevic M. Platelet microparticles: detection and assessment of their paradoxical functional roles in disease and regenerative medicine. *Blood Rev* 2014; 28(4): 155-66.
146. Shi J, Heegaard CW, Rasmussen JT, Gilbert GE. Lactadherin binds selectively to membranes containing phosphatidyl-L-serine and increased curvature. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1667(1): 82-90.
147. Burnier L, Fontana P, Kwak BR, Angelillo-Scherrer A. Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine. *Thromb Haemost* 2009; 101: 439–51.
148. Nurden AT. Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thromb Haemost* 2011; 105 Suppl 1: S13-33.
149. Xue LJ, Cui BB, Li X, Huang QR, Liu Y, Lin H. [Association of Elevated Platelet Microparticles with Disease Activity in Rheumatoid Arthritis]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2017; 48(3): 405-9.
150. Ertenli I, Kiraz S, Arici M, Haznedaroglu IC, Calgüneri M, Celik I, et al. P-selectin as a circulating molecular marker in rheumatoid arthritis with thrombocytosis. *J Rheumatol* 1998; 25(6): 1054-8.
151. Pamuk GE, Vural O, Turgut B, Demir M, Pamuk ON, Cakir N. Increased platelet activation markers in rheumatoid arthritis: are they related with subclinical atherosclerosis? *Platelets* 2008; 19(2): 146-54.
152. Heijnen HF, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood* 1999; 94(11): 3791-9.
153. Barry OP, Pratico D, Savani RC, FitzGerald GA. Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J Clin Invest* 1998; 102: 136–44.
154. Jy W, Mao WW, Horstman LL, Tao J, Ahn YS. Platelet microparticles bind, activate and aggregate neutrophils in vitro. *Blood Cells Mol Dis* 1995; 21: 217–31.
155. Heloïre F, Weill B, Weber S, Batteux F. Aggregates of endothelial microparticles and platelets circulate in peripheral blood. Variations during stable coronary disease and acute myocardial infarction. *Thromb Res* 2003; 110: 173–80.
156. Hjeltnes G, Hollan I, Førre O, Wiik A, Lyberg T, Mikkelsen K, et al. Serum levels of lipoprotein(a) and E-selectin are reduced in rheumatoid arthritis patients treated with

- methotrexate or methotrexate in combination with TNF- α -inhibitor. *Clin Exp Rheumatol* 2013; 31(3): 415-21.
157. Kuuliala A, Eberhardt K, Takala A, Kautiainen H, Repo H, Leirisalo-Repo M: Circulating soluble E-selectin in early rheumatoid arthritis: a prospective five year study. *Ann Rheum Dis* 2002; 61: 242-6.
158. Yu G, Rux Ah, Ma P, Bdeir K, Sachais Bs: Endothelial expression of E-selectin is induced by the platelet-specific chemokine platelet factor 4 through LRP in an NF-kappaB-dependent manner. *Blood* 2005; 105: 3545-51.
159. Klimek E, Skalska A, Kwaśny-Krochin B, Surdacki A, Sulicka J, Korkosz M, et al. Differential associations of inflammatory and endothelial biomarkers with disease activity in rheumatoid arthritis of short duration. *Mediators Inflamm* 2014; 2014: 681635.
160. Poncelet P, Robert S, Bailly N, Garnache-Ottou F, Bouriche T, Devalet B, et al. Tips and tricks for flow cytometry-based analysis and counting of microparticles. *Transfus Apher Sci* 2015; 53(2): 110-26.
161. Mackman N, Tilley RE, Key NS. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27(8): 1687–93.
162. Osterud B, Breimo ES, Olsen JO. Blood borne tissue factor revisited. *Thromb Res* 2008; 122(3): 432-4.
163. Drake TA, Morrissey JH, Edgington TS. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am J Pathol* 1989; 134(5): 1087-97.
164. Graf J, Scherzer R, Grunfeld C, Imboden J. Levels of C-reactive protein associated with high and very high cardiovascular risk are prevalent in patients with rheumatoid arthritis. *PLoS One* 2009; 4(7): e6242.
165. Newson L: Menopause and cardiovascular disease. *Post Reprod Health* 2018; 24(1): 44-9.
166. Renda G, Patti G, Lang IM, Siller-Matula JM, Hylek EM, Ambrosio G; Working Group on Thrombosis of the Italian Society of Cardiology. Thrombotic and hemorrhagic burden in women: Gender-related issues in the response to antithrombotic therapies. *Int J Cardiol* 2019; 286: 198-207.

167. Kuiper S, van Gestel AM, Swinkels HL, de Boo TM, da Silva JA, van Riel PL. Influence of sex, age, and menopausal state on the course of early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2001; 28(8): 1809-16.
168. Mollard E, Pedro S, Chakravarty E, Clowse M, Schumacher R, Michaud K. The impact of menopause on functional status in women with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2018; 57(5): 798-802.
169. Westlake SL, Colebatch AN, Baird J, Kiely P, Quinn M, Choy E, Ostor AJ, Edwards CJ. The effect of methotrexate on cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis: a systematic literature review. *Rheumatology (Oxford)*. 2010; 49(2): 295-307.
170. Ruysse-Witrand A, Fautrel B, Saraux A, Le Loët X, Pham T. Cardiovascular risk induced by low-dose corticosteroids in rheumatoid arthritis: a systematic literature review. *Joint Bone Spine*. 2011; 78(1): 23-30.
171. Ingegnoli F, Fantini F, Griffini S, Soldi A, Meroni Pl, Cugno M: Anti-tumor necrosis factor alpha therapy normalises fibrinolysis impairment in patients with active rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2010; 28: 254–7
172. Agirbasli M, Inanc N, Baykan Oa, Direskeneli H: The effects of TNF alpha inhibition on plasma fibrinolytic balance in patients with chronic inflammatory rheumatic disorders. *Clin Exp Rheumatol* 2006; 24: 580–3
173. Undas A, Gissel M, Kwasny-Krochin B, Gluszko P, Mann Kg, Brummel-Ziedins Ke: Thrombin generation in rheumatoid arthritis: dependence on plasma factor composition. *Thromb Haemost* 2010; 104: 224–30.
174. Kern A, Balog A, Dulic S, Barabás E, Kiszalák M, Vásárhelyi B. Alterations of the thrombin generation profile in rheumatoid arthritis. *J Thromb Thrombolysis* 2016; 41(3): 359-64.
175. He S, Bremme K, Blombäck M. A laboratory method for determination of overall haemostatic potential in plasma. I. Method design and preliminary results. *Thromb Res* 1999; 96(2): 145-56.
176. Antovic JP, Yngen M, Ostenson CG, et al. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and hemostatic changes in patients with type I diabetes mellitus with and without microvascular complications. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2003; 14(6): 551–556

177. Anzej S, Bozic M, Antovic A, et al. Evidence of hypercoagulability and inflammation in young patients long after acute cerebral ischaemia. *Thromb Res* 2007; 120(1): 39–46
178. Rooth E, Wallen H, Antovic A, et al. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and its relationship to fibrinolysis and inflammation during the acute and convalescent phase of ischemic stroke. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2007; 18(4): 365–70.
179. Borjas-Howard JF, Leeuw K, Rutgers A, Meijer K, Tichelaar VYIG. Risk of Recurrent Venous Thromboembolism in Autoimmune Diseases: A Systematic Review of the Literature. *Semin Thromb Hemost.* 2019; 45(2): 141-9.
180. Zöller B, Li X, Sundquist J, Sundquist K. Risk of pulmonary embolism in patients with autoimmune disorders: a nationwide follow-up study from Sweden. *Lancet* 2012; 379(9812): 244-9.
181. Yang X, Chang Y, Wei W. Endothelial Dysfunction and Inflammation: Immunity in Rheumatoid Arthritis. *Mediators Inflamm* 2016; 2016: 6813016.
182. Aksu K, Donmez A, Keser G. Inflammation-induced thrombosis: mechanisms, disease associations and management. *Curr Pharm Des* 2012; 18(11):1478-93.
183. Maturana MA, Irigoyen MC, Spritzer PM. Menopause, estrogens, and endothelial dysfunction: current concepts. *Clinics (Sao Paulo)* 2007; 62(1): 77-86.
184. Piróg M, Jach R, Kacalska-Janssen O. Differential effect of the ultra-low dose and standard estrogen plus dydrogesterone therapy on thrombin generation and fibrinolysis in postmenopausal women. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2017; 96(12): 1438-45.
185. Dhillon PK, Adams MJ. Thrombosis in systemic lupus erythematosus: role of impaired fibrinolysis. *Semin Thromb Hemost.* 2013; 39(4): 434-40.
186. Kwasny-Krochin B, Gluszko P, Undas A. Unfavorably altered fibrin clot properties in patients with active rheumatoid arthritis. *Thromb Res* 2010; 126(1): e11-6.
187. Lord ST. Molecular mechanisms affecting fibrin structure and stability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31(3): 494-9.
188. Martínez-Zamora MA, Tassies D, Carmona F, Espinosa G, Cervera R, Reverter JC, et al. Clot lysis time and thrombin activatable fibrinolysis inhibitor in severe preeclampsia with or without associated antiphospholipid antibodies. *J Reprod Immunol.* 2010; 86(2): 133-40.

189. McEntegart A, Capell HA, Creran D, Rumley A, Woodward M, Lowe GD. Cardiovascular risk factors, including thrombotic variables, in a population with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2001; 40(6): 640-4.
190. Pretorius E, Oberholzer HM, van der Spuy WJ, Swanepoel AC, Soma P. Scanning electron microscopy of fibrin networks in rheumatoid arthritis: a qualitative analysis. *Rheumatol Int* 2012; 32(6): 1611-5.
191. Siudut J, Świat M, Undas A. Altered Fibrin Clot Properties in Patients With Cerebral Venous Sinus Thrombosis: Association With the Risk of Recurrence. *Stroke* 2015; 46(9): 2665-8.
192. Tehrani S, Jörneskog G, Ågren A, Lins PE, Wallén H, Antovic A. Fibrin clot properties and haemostatic function in men and women with type 1 diabetes. *Thromb Haemost* 2015; 113(2): 312-8.
193. Rooth E, Wallen NH, Blombäck M, He S. Decreased fibrin network permeability and impaired fibrinolysis in the acute and convalescent phase of ischemic stroke. *Thromb Res* 2011; 127: 51–56.
194. Collet JP, Allali Y, Lesty C, Tanguy ML, Silvain J, Ankri A, Blanchet B, Dumaine R, Gianetti J, Payot L, Weisel JW, Montalescot G. Altered fibrin architecture is associated with hypofibrinolysis and premature coronary atherothrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26(11): 2567-73.
195. Piróg MM, Milewicz T, Jach R, Undas A. Plasma fibrin clot properties in postmenopausal women: effects of hormone therapy. *Menopause*. 2016; 23(5): 511-7.
196. Lanir N, Ciano PS, van de Water L, Mcdonagh J, Dvorak Am, Dvorak Hf et al. Macrophage migration in fibrin gel matrices. II. Effects of clotting factor XIII, fibronectin, and glycosaminoglycan content on cell migration. *J. Immunol* 1988; 140: 2340-9.
197. Vasanthi P, Nalini G, Rajasekhar G. Status of oxidative stress in rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis*. 2009; 12(1): 29-33.
198. Bauerová K, Bezek A. Role of reactive oxygen and nitrogen species in etiopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Gen Physiol Biophys* 1999; 18 Spec No: 15-20.
199. Ristic P, Srejovic I, Nikolic T, Stojic I, Ristic D, Zivkovic V, Jakovljevic VL. The effects of zofenopril on cardiac function and pro-oxidative parameters in the streptozotocin-induced diabetic rat heart. *Mol Cell Biochem* 2017; 426(1-2): 183-93

200. Shah D, Wanchu A, Bhatnagar A. Interaction between oxidative stress and chemokines: possible pathogenic role in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Immunobiology* 2011; 216(9): 1010-7.
201. Desai PB, Manjunath S, Kadi S, Chetana K, Vanishree J. Oxidative stress and enzymatic antioxidant status in rheumatoid arthritis: a case control study. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2010; 14(11): 959-67.
202. Jaswal S, Mehta HC, Sood AK, Kaur J. Antioxidant status in rheumatoid arthritis and role of antioxidant therapy. *Clin Chim Acta* 2003; 338(1-2): 123-9.
203. Sarban S, Kocyigit A, Yazar M, Isikan UE. Plasma total antioxidant capacity, lipid peroxidation, and erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clin Biochem* 2005; 38(11): 981-6.
204. Pasupathi P, Deepa M, Rani P, Sankar RR. Circulating lipid peroxidation, plasma and erythrocyte antioxidant status in patients with rheumatoid arthritis. *Bangladesh Med Res Counc Bull* 2009; 35(2): 57-62.
205. Veselinovic M, Barudzic N, Vuletic M, Zivkovic V, Tomic-Lucic A, Djuric D, Jakovljevic V. Oxidative stress in rheumatoid arthritis patients: relationship to diseases activity. *Mol Cell Biochem* 2014; 391(1-2): 225-32.
206. Al Arfaj AS, Chowdhary AR, Khalil N, Ali R. Immunogenicity of singlet oxygen modified human DNA: implications for anti-DNA antibodies in systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol* 2007; 124: 83–89.
207. Cimen MY, Cimen OB, Kacmaz M, Ozturk HS, Yorgancioglu R, Durak I. Oxidant/antioxidant status of the erythrocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2000; 19: 275–7.
208. te Velde ER, Scheffer GJ, Dorland M, Broekmans FJ, Fauser BC. Developmental and endocrine aspects of normal ovarian aging. *Mol Cell Endocrinol* 1998; 145: 67–73
209. Mishra GD, Kuh D. Health symptoms during midlife in relation to menopausal transition: British prospective cohort study. *BMJ* 2012; 344: e402.
210. Li Q, Geng X, Zheng W, Tang J, Xu B, Shi Q. Current understanding of ovarian aging. *Sci China Life Sci.* 2012; 55:659–69.
211. Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A, Gupta S. The role of oxidative stress of female reproduction: A review. *Reprod Biol Endocrinol* 2012; 10: 1–32.

212. Wang Z, Chandrasena ER, Yuan Y, Peng KW, van Breemen RB, Thatcher GR, Bolton JL. Redox cycling of catechol estrogens generating apurinic/aprimidinic sites and 8-oxo-deoxyguanosine via reactive oxygen species differentiates equine and human estrogens. *Chem Res Toxicol* 2010; 23: 1365–73.
213. Czerska M, Mikołajewska K, Zieliński M, Gromadzińska J, Wąsowicz W. Today's oxidative stress markers. *Med Pr* 2015; 66(3): 393-405.
214. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Ed 4. Clarendon Press, Oxford, 2006.
215. Altindag O, Erel O, Soran N, Celik H, Selek S. Total oxidative/anti-oxidative status and relation to bone mineral density in osteoporosis. *Rheumatol Int* 2008; 28(4): 317-21.
216. Uppoor RB, Rajesh A, Srinivasan MP, Unnikrishnan B, Holla R. Oxidative Stress in Obese Postmenopausal Women: An Additive Burden for Atherosclerosis. *J Clin Diagn Res.* 2015; 9(12): OC03–OC5
217. Signorelli SS, Neri S, Sciacchitano S, Pino LD, Costa MP, Marchese G, et al. Behaviour of some indicators of oxidative stress in postmenopausal and fertile women. *Maturitas.* 2006; 53(1):77-82.
218. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109–42.
219. Cohen RA. The role of nitric oxide and other endothelium-derived vasoactive substances in vascular disease. *Prog Cardiovasc Dis* 1995; 38: 105–28.
220. Doshi SB, Agarwal A. The role of oxidative stress in menopause. *J Midlife Health.* 2013; 4(3): 140–146.

