

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Nataša Stanisavljević

**POREMEĆAJ FUNKCIJE ENDOTELA
KAO UZROK NASTANKA TROMBOZE
KOD BOLESNIKA SA
ANTIFOSFOLIPIDNIM SINDROMOM**

doktorska disertacija

Beograd, 2017

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

Nataša Stanisavljević

**ENDOTHELIAL DYSFUNCTION AS A
CAUSE OF THROMBOSIS IN PATIENTS
WITH ANTIPHOSPHOLIPID SYNDROME**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017

Mentor

Prof. dr Dragomir Marisavljević

Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

Komentor

Naučni Savetnik Dr sci. med. Ljudmila Stojanović,

KBC „Bežanijska kosa“

Članovi Komisije za odbranu doktorske disertacije:

1. Prof. dr Nada Suvajdžić Vuković

Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

2. Prof. dr Andrija Bogdanović

Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

3. Prof. dr Violeta Dopsaj

Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

Datum odbrane:

Profesoru Dragomiru Marisavljeviću, mentoru ovog rada, zahvaljujem se za stručnu i organizacionu podršku kao i poverenje i strpljenje iskazano tokom izrade ove disertacije.

Zahvaljujem se svom komentoru, Naučnom savetniku Dr sci. med. Ljudmili Stojanović bez čije dragocene pomoći ovaj rad ne bi ugledao svetlost dana kao i za nesebično uloženi trud, znanje i energiju u toku realizacije ovog rada. Njen analitički duh i korisne sugestije su pomogli da se studija uradi što bolje i temeljnije.

Zahvaljujem se svim mojim dragim kolegama koji su učestvovali u različitim fazama izrade ovog rada pošto izrada ove teze ne bi bila moguća bez njihove pomoći, podrške i uloženiog truda i rada.

Hvala mojoj porodici i drugarićima na bezgraničnom razumevanju i podršci.

POREMEĆAJ FUNKCIJE ENDOTELA KAO UZROK NASTANKA TROMBOZE KOD BOLESNIKA SA ANTIFOSFOLIPIDNIM SINDROMOM

UVOD: Dijagnoza antifosfolipidnog sindroma (AFS) ili po autoru Hughesovog sindroma postavlja se kada je prisutna jedna ili više epizoda tromboze arterija, vena ili malih krvnih sudova i/ili komplikacije trudnoće, uz laboratorijski kriterijum pozitivnosti antifosfolipidnog(ih) antitela (aFL) dva ili više puta u razmaku od najmanje 12 nedelja. AFS može biti primarni (PAFS) kada se ispoljava samostalno, ili kada se ispoljava u okviru nekog drugog patološkog stanja ili bolesti (SAFS), prvenstveno sistemskog eritemskog lupusa (SEL). U dosadašnjim istraživanjima o AFS nije dobijen odgovor na pitanje da li je tromboza u okviru ispoljavanja sindroma primarno problem endotela, da li je ona stalno prisutan ili povremeni rizik ili postoje drugi faktori tipa inflamacije, urođenih stanja koji imaju uticaja na „snagu“ različitih aFL.

CILJEVI: Cilj studije je ispitivanja endotelne funkcije kliničkim testom i utvrđivanja povezanosti poremećaja funkcije endotela sa učestalosti i vrstom tromboza kod bolesnika sa primarnim (PAFS) i sekundarnim antifosfolipidnim sindromom (SAFS). Takođe, cilj rada je utvrđivanje prisustva oksidativnog stresa i inflamacije kao i njihov uticaj na promenu endotelne funkcije i nastanak tromboze. Cilj je i da se odredi povezanost između vrste i titra antifosfolipidnih antitela (aFL) sa parametrima oksidativnog stresa, inflamacije i endotelne funkcije kod ispitivanih grupa i da se ustanovi da li postoji njihova povezanost kao mogućih „okidača“ tromboze.

MATERIJAL I METODE: Ova kohortna studija obuhvatila je grupu od 90 PAFS, 50 SAFS bolesnika i 40 zdravih ispitanika. Svim bolesnicima određeni su laboratorijski pokazatelji AFS-a: antikardiolipinska antitela (aKL IgG, IgM klase), anti β -2 glikoprotein I antitela (anti β 2-GPI) (IgG ili IgM klase) i lupus antikoagulans (LA) kao i biohemijske analize uz kompletan lipidogram, hsCRP kao marker zapaljenja i koncentracija asimetričnog dimetilarginina (ADMA). Oksidativna ravnoteža je merena prisustvom oksidativnih produkata: lipidnih hidroperoksida (LOOH) i produkata uznapredovale oksidacije proteina (AOPP) kao i antioksidativnim mehanizmima: aktivnost paraoksonaze (PON1) i prisustvom ukupnih sulfhidrilnih grupa (SH). Hiperkoagulabilnost je procenjivana na osnovu određivanja vrednosti d dimera i

parametara endogenog trombinskog potencijala (ETP). Svim bolesnicima učinjen je klinički pregled određivanja stepena endotelne disfunkcije merenjem vazodilatacije brahijalne arterije izazvane protokom (FMD).

REZULTATI: Procenat endotel zavisne dilatacije (FMD%) u grupi PAFS iznosio je $9,48 \pm 5,68$, u grupi SAFS $10,39 \pm 6,68$ ($p=0,601$). U kontrolnoj grupi je FMD% iznosio $16,52 \pm 6,74$ pa je ta razlika u odnosu na AFS bolesnike bila visoko statistički značajna ($p=0,001$). Takođe je utvrđeno postojanje statistički značajne razlike ($p=0,018$) u prisustvu endotel zavisne disfunkcije ($<10\%$ FMD%) između AFS pacijenata (31,4%) i kontrolne grupe (12,5%). Analizom zastupljenosti kategorija aFL, najveća je bila zastupljenost kategorije I sa 68,7% AFS bolesnika. Analizom titrova pojedinih vrsta aFL, nađena je statistički značajna razlika u zastupljenosti viših titrova aKL IgM ($p=0,020$) i $\beta 2$ GPI IgG antitela ($p=0,010$) kod pacijenata sa SAFS. Registrovano je ukupno 93 trombotična događaja i to 53 u PAFS grupi (58,9%) i 40 (80%) u SAFS grupi. Bilo je ukupno 56 (40%) arterijskih tromboza i 61 (43,6%) venskih. Najčešća lokalizacija venske tromboze su bile duboke i površinske vene donjih ekstremiteta, i to 36% PAFS i 32% SAFS bolesnika. Najčešća lokalizacija arterijske tromboze je bilo moždano korito i to 37,1% pacijenata sa PAFS i 74% pacijenata sa SAFS. U regresionoj analizi faktora rizika za endotelnu disfunkciju kod AFS bolesnika izdvaja se starost ($p=0,001$). Nijedna vrsta i titar aFL nije pokazala da ima direktan udeo u nastanku endotelne disfunkcije. U grupi svih ispitanika (AFS i kontrolne grupe) postoji statistički značajna negativna korelacija FMD% sa hsCRP. Statističkom analizom, primenom ROC krive za značaj hsCRP kod FMD% (AUC 0,624; $p=0,023$), izdvaja se *cut off* vrednost hsCRP od 0,97mg/L koja ima senzitivnost od 69,4% i specifičnost od 50%. Sa ovom vrednosti hsCRP endotelna disfunkcija je prisutna kod 67% ispitanika ($p=0,023$). U grupi svih ispitanika (AFS i kontrolna grupa) postoji statistički značajna negativna korelacija FMD% sa koncentracijom LOOH ($\rho -0,251$; $p=0,001$) i AOPP ($\rho -0,255$; $p=0,010$). Primenom statističke analize ROC krive za LOOH, izdvaja se *cut off* vrednost od 95,4 $\mu\text{mol/L}$ koja ima senzitivnost od 67% i specifičnost od 57%. Sa ovom vrednosti LOOH endotelna disfunkcija je prisutna kod 69% ispitanika ($p=0,005$). Primenom statističke analize ROC krive za AOPP izdvaja se *cut off* vrednost od 10,2 $\mu\text{mol/L}$ koja ima senzitivnost od 73,5% i specifičnost od 53,4%. Sa ovom vrednosti AOPP endotelna disfunkcija je prisutna kod 73,5% ispitanika ($p=0,001$). U binarnoj

regresionoj analizi se u svakoj grupi AFS bolesnika izdvaja LOOH ($p < 0,005$) kao statistički značajan parametar za nastanak endotelne disfunkcije. Analizom svih ispitanika, utvrđeno je postojanje statistički značajne negativne korelacije FMD% sa ADMA ($\rho -0,262$; $p = 0,002$). Statističkom analizom primenom ROC krive izdvaja se *cut off* vrednost ADMA od $0,64 \mu\text{mol/L}$ koja ima senzitivnost od $65,7\%$ i specifičnost od $59,1\%$. Sa ovom vrednosti endotel zavisna disfunkcija je prisutna kod $71,4\%$ ispitanika ($p = 0,023$). U ispitivanoj grupi (AFS+kontrolna grupa) postoji statistički značajna negativna korelacija FMD% sa vrednosti d dimera ($\rho -0,182$; $p = 0,023$) dok nema statistički značajnih korelacija FMD% sa parametrima ETP. Statističkom analizom primenom ROC krive izdvaja se *cut off* vrednost d dimera od $368,6 \mu\text{g/L}$ koja ima senzitivnost od $61,1\%$ i specifičnost od $62,5\%$. Sa ovom vrednosti endotel zavisna disfunkcija je prisutna kod $61,1\%$ ispitanika ($p = 0,016$). U regresionoj analizi faktora rizika za nastanak tromboze kod AFS bolesnika izdvaja se starost ($p < 0,05$). Dokazano je da bolesnici sa pozitivnim LA imaju statistički značajno češće vensku trombozu ($p = 0,021$) kao i površne tromboflebitise donjih ekstremiteta ($p = 0,005$). Bolesnici sa pozitivnim aKL IgG ($p = 0,037$) i $\beta 2\text{GPI IgM}$ ($p = 0,049$) su češće imali arterijsku trombozu donjeg ekstremiteta, dok su bolesnici sa $\beta 2\text{GPI IgG}$ ($p = 0,032$) češće imali TIA ($p = 0,032$) i oni sa aKL IgG ($p = 0,049$) infarkt miokarda. Međutim, pacijenti sa trojno pozitivnim aFL su statistički značajno češće imali trombozu ($p = 0,006$).

Pokazano je da nema statistički značajnih korelacija tromboze sa hsCRP, ADMA i PON1. Procenat endotelne dilatacije korelira sa nastankom tromboze ($\rho -0,176$, $p = 0,038$). Primenom statističke analize ROC krive zavisnosti FMD% i tromboze izdvaja se *cut off* vrednost od $6,85\%$ koja ima senzitivnost od 73% i specifičnost od 45% . Može se zaključiti da je i manje od 10% promene endotel zavisne dilatacije (koja je u ovom ispitivanju bila granica za utvrđivanje prisustva endotel zavisne disfunkcije) dovoljna kao okidač nastanka tromboze. Glavni faktori rizika za nastanak endotel zavisne disfunkcije su: starost, povišena koncentracija LOOH, AOPP i ADMA. U regresionom modelu izdvajaju se dva: starost ($p = 0,002$) i LOOH ($p = 0,028$). Od faktora koji koreliraju sa nastankom tromboze, logističkom regresionom analizom se izdvaja starost kao nezavisni prediktor. Obzirom da je endotel zavisna disfunkcija prethodnik tromboze, u regresionom modelu su posmatrane FMD% i starost kao varijable u nastanku tromboze, ali nijedna se nije izdvojila kao prediktor ovog događaja. Ono što

izdvaja ispitanike sa AFS jeste prisustvo aFL. U ovoj studiji, aFL nisu pokazala direktan efekat na nastanak endotelne disfunkcije, ali su pokazane korelacije aKL (IgM i IgG) i β 2GPI (IgG) sa hsCRP, ADMA, d dimerom i AOPP što znači da je njihov uticaj na endotel značajan. Takođe, direktan uticaj na vensku trombozu ima LA, ali gore navedena aKL i β 2GPI antitela imaju uticaj u nastanku arterijskih tromboza. Imajući gore navedeno u vidu, napravljen je model ROC krive potencijalnog sinergističkog efekta endotelne disfunkcije i pojedinačnih aFL u pravcu nastanka tromboze kod ispitanika sa AFS. Pokazala se statistički značajna veza sa svakim tipom aFL, ali i da je trojna aFL pozitivnost sa prisutnom endotel zavisnom disfunkcijom najjači faktor u nastanku tromboze ($p=0,001$).

ZAKLJUČAK: Trombozi kod ispitanika sa AFS prethodi endotelna disfunkcija, prisustvo inflamacije, oksidativni stres ali nijedan od ovih faktora nije pojedinačni okidač tromboze. U prisustvu aFL stalno je aktivan proces sinteze malih količina trombina što opravdava činjenicu da prisustvo bilo kog aFL u bilo kom titru može biti stalni faktor rizika za nastanak tromboze. Ovom studijom utvrdili smo da AFS bolesnici, koje predominantno čine žene prosečne starosti dobi od 42godina i niske prevalence klasičnih faktora rizika za aterosklerozu, zahtevaju sveobuhvatnu evaluaciju funkcije endotela, agresivnu redukciju postojećih faktora rizika i redovno praćenje radi sprečavanja recidiva tromboze koja je glavni uzrok mortaliteta bolesnika sa AFS.

Ključne reči: antifosfolipidni sindrom, antifosfolipidna antitela, sistemski eritemski lupus, oksidativni stres, tromboza, endotelna disfunkcija, azot monoksid

Naučna oblast: Hematologija

UDK broj

ENDOTHELIAL DYSFUNCTION AS A CAUSE OF THROMBOSIS IN PATIENTS WITH ANTIPHOSPHOLIPID SYNDROME

INTRODUCTION: Diagnosis of antiphospholipid syndrome or Hughes syndrome is established if arterial and/or venous thrombosis, multiple and recurrent fetal losses occurred in presence of elevated levels of antiphospholipid antibodies (aPL) found two or more times at least 12 weeks apart. This syndrome is considered primary (PAPS) if unassociated with any other connective tissue disease or secondary (SAPS) if it appears in association with other autoimmune disorders, mainly systemic lupus erythematosus (SLE). There is not yet answer on the question whether thrombosis is primarily the endothelium problem, whether it is a persistent or occasional risk, or there are other factors like inflammation, congenital conditions that have an effect on the "strength" of different aPL.

OBJECTIVES: The major objectives of the present study were: 1) to analyze endothelial function by clinical test and compare it with frequency and type of thrombosis in patients with APS comparing PAPS and SAPS groups, 2) to investigate possible relationship of oxidative stress and inflammation to endothelium function and thrombotic risk, 3) to establish possible predictive role of aPL as trigger of oxidative stress, inflammation and endothelium dysfunction and thrombosis.

MATERIAL AND METHODS: This cohort study includes a total of 140 (Caucasians) APS patients; (averaged age $42,48 \pm 12,55$ years), 90 were PAPS patients and 50 had APS associated with SLE (SAPS) and 40 healthy controls (averaged age $44,9 \pm 10,18$ years). All patients were evaluated for the presence of aPL: LA, aCL IgG/IgM, anti- $\beta 2$ GPI IgG/IgM and complete biochemistry analysis with measurement of hsCRP and asymmetric dimethylarginine was done. The oxidative balance was measured by the presence of oxidative products: lipid hydroperoxide (LOOH) and products of advanced protein oxidation (AOPP) as well as antioxidant mechanisms: the activity of paraoxonase (PON1) and the presence of total sulfhydryl groups (SH). Hypercoagulability was assessed based on the determination of the values of d dimers and the parameters of endogenous thrombin potential (ETP). All patients have

undergone endothelial dysfunction estimation by the method of flow dilatation mediated dilatation of brachial artery (FMD).

RESULTS: Percentage of FMD (FMD%) in PAPS patients was 9.48 ± 5.68 and in SAPS group 10.39 ± 6.68 ($p=0.601$). In the control group, FMD% was 16.52 ± 6.74 , and this difference was statistically significant in relation to AFS patients ($p = 0.001$). There was also a statistically significant difference ($p = 0.018$) in the presence of endothelial dependent dysfunction ($<10\%$ FMD%) between APS patients (31.4%) and control group (12.5%). Regarding aPL category, the most APS patients were in category I (68.7%). The higher titers of aCL IgM ($p=0.020$) and $\beta 2$ GPI IgG antibodies ($p=0.010$) were found in SAPS group. Thrombosis was diagnosed in 93 patients in both groups, 53 (58.9%) in PAPS and 40 (80%) in SAPS group. Arterial thrombosis was recorded in 56 (40%) and venous thrombosis in 61 (43.66%) patients. The most frequent localizations of venous events were leg superficial and deep venous thrombosis, in 36% of PAPS group and 32% in SAPS group. The most frequent arterial thrombosis in both groups was cerebral vascular attack in 37.1% PAPS and 74% SAPS patients. Between all analyzed parameters, age was identified as a risk factor for the development of endothelial dysfunction in regression analysis ($p=0,001$). There was no significant relationship between percentage of FMD of brachial artery and type and level of aPL in APS patients. Regarding the whole study group, there is significant negative correlation between FMD% and hsCRP. The most discriminative cut-off value of hsCRP selected by the ROC analysis in prediction of FMD% was 0.97 mg / L (sensitivity 69.4% and specificity 50%, AUC value 0.624; $p = 0.023$). Endothelial dysfunction is present in 67% of studied group with this value. Regarding the whole study group, there is significant negative correlation of FMD% to LOOH ($\rho -0,251$; $p=0,001$) and AOPP ($\rho -0,255$; $p=0,010$). The most discriminative cut-off value of LOOH selected by the ROC analysis in prediction of FMD% was $95,4 \text{ } \mu\text{mol/L}$ (sensitivity 67% and specificity 57%) and with this value 69% of studied group have endothelial dysfunction ($p=0.005$). Applying this analysis to AOPP, the most discriminative cut off value is $10,2 \text{ } \mu\text{mol/L}$ with 73.5% sensitivity and 53.4% specificity and endothelial dysfunction present in 73.5% studied group ($p=0,001$). Binary regression analysis highlights LOOH ($p<0,005$) as risk factor for endothelial dysfunction in both groups (PAPS and SAPS). There is a significant negative

correlation of FMD% to ADMA (ρ -0,262; $p=0,002$). The most discriminative cut-off value of ADMA selected by the ROC analysis in prediction of FMD% was 0,64 $\mu\text{mol/L}$ (sensitivity 65.7% and specificity 59.1). Endothelial dysfunction is present in 71.4% of studied group with this value ($p=0.023$). There is significant correlation between FMD% to d dimer values (ρ -0,182; $p=0,023$) in the whole studied group, but there is not significant correlation to ETP parameters. Discriminative cut off d dimer value for endothelial dysfunction on ROC curve is 368,6 $\mu\text{g/L}$ (sensitivity 61.1% and specificity 62.5%) and 61.1% studied group endothelial dysfunction present with this value ($p=0.016$).

An age was identified as thrombotic risk factor in regression analysis among all analyzed parameters ($p<0,05$). LA positive AFS patients have venous thrombosis ($p=0,021$) and superficial leg thrombophlebitis ($p=0,005$) more frequently. Arterial leg thrombosis was more frequent in patients with positive aCL IgG ($p=0,037$) and $\beta 2\text{GPI}$ IgM ($p=0,049$). Patients with positive $\beta 2\text{GPI}$ IgG ($p=0,032$) have transitory ischemic attack more frequently, and those with aCL IgG ($p=0,049$) myocardial infarction. But, triple aPL positivity was significant risk factor for thrombosis overall ($p=0,006$).

There is not significant correlations of thrombosis to hsCRP, ADMA and PON1. Percentage of endothelial dilation significantly correlate to thrombosis (ρ -0,176, $p=0,038$). Discriminative FMD% cut off value for thrombosis using ROC curve is 6,85% with sensitivity 73% and specificity 45%. It could be concluded that FMD% less of 10% (that was used in this study as cut off value for presence of endothelial dysfunction) is enough for triggering thrombotic event. Main risk factors for endothelial dysfunction are: age, elevated concentrations of LOOH, AOPP i ADMA. In regression model, just two of them are significant: age ($p=0.002$) and LOOH ($p=0.028$). An independent predictor of thrombosis is age according to regression analysis. Since endothelial dysfunction is predecessor of thrombosis, the regression model has observed FMD% and age as variables in the occurrence of thrombosis, but none have been singled out as predictors of this event. The feature of APL patients is aPL positivity but they were not found to have direct effect on endothelial dysfunction, but correlation have been found between aCL (IgM and IgG) and $\beta 2\text{GPI}$ (IgG) to hsCRP, ADMA, d dimer and AOPP depicting its significant effect on endothelium. Also, there are correlations of LA to venous thrombosis and aCL and $\beta 2\text{GPI}$ to arterial thrombosis.

Considering all above mentioned, ROC curve of potential synergistic effect of aPL and endothelial dysfunction contribution to thrombosis was generated. There is statistical significance of every single aPL contribution to endothelial dysfunction in thrombosis risk but triple positivity was found to be the strongest risk factor ($p=0,001$).

CONCLUSION: Thrombosis in APS patients precedes endothelial dysfunction, the presence of inflammation, oxidative stress, but none of these factors is an individual trigger of thrombosis. In the presence of aPL, a process of small amounts of thrombin synthesis is continuously active, which justifies the fact that the presence of any aPL in any titer can be a persistent risk factor for the occurrence of thrombosis. In this study we determined that APS patients, predominantly consisted of women aged 42 years with low prevalence of atherosclerotic risk factors, demand overall endothelial evaluation and aggressive reduction of present risk factors and closely follow up in order to prevent thrombotic recurrence.

Key words: antiphospholipid syndrome, antiphospholipid antibodies, systemic lupus erythematosus, oxidative stress, thrombosis, endothelial dysfunction, nitric oxide

Scientific area: Hematology

DK number

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| I UVOD | 1 |
| 1.1. ISTORIJSKI PRISTUP ANTIFOSFOLIPIDNOM SINDROMU..... | 1 |
| 1.2. KRITERIJUMI ZA DIJAGNOZU AFS..... | 3 |
| 1.2.1. Klinički kriterijumi za dijagnozu AFS..... | 3 |
| 1.2.2. Laboratorijski kriterijumi za dijagnozu AFS..... | 7 |
| 1.3. EPIDEMIOLOŠKI PODACI..... | 9 |
| 1.4. OKSIDATIVNI STRES U ANTIFOSFOLIPIDNOM SINDROMU..... | 10 |
| 1.5. ENDOTELNA DISFUNKCIJA U ANTIFOSFOLIPIDNOM SINDROMU.. | 13 |
| 1.6. MOGUĆI UZROCI TROMBOZE U ANTIFOSFOLIPIDNOM SINDROMU..... | 16 |
| 1.7. DODATNI FAKTORI RIZIKA ZA NASTANAK TROMBOZE..... | 20 |
| 1.8. LABORATORIJSKI TESTOVI U DOKAZIVANJU HIPERKOAGULABILNOG STANJA..... | 21 |
| 1.9. TERAPIJA ANTIFOSFOLIPIDNOG SINDROMA..... | 23 |
| II CILJEVI ISTRAŽIVANJA | 27 |
| III MATERIJAL I METODE | 28 |
| 3.1. ISPITIVANA GRUPA..... | 28 |
| 3.2. LABORATORIJSKE ANALIZE..... | 29 |
| 3.2.1. Određivanje markera oksidativnog stresa..... | 30 |
| 3.2.2. Određivanje antifosfolipidnih antitela..... | 32 |
| 3.3. ISPITIVANJE UROĐENE TROMBOFILIJE..... | 33 |
| 3.4. ISPITIVANJE ENDOTELNE FUNKCIJE..... | 33 |
| 3.5. TRADICIONALNI FAKTORI RIZIKA..... | 34 |
| 3.6. STATISTIČKA OBRADA..... | 34 |
| IV REZULTATI | 36 |
| 4. 1. UPOREDNA ANALIZA OPŠTIH OSOBINA ISPITIVANIH GRUPA..... | 36 |
| 4.2. UPOREDNA ANALIZA ENDOTELNE FUNKCIJE ISPITIVANIH GRUPA..... | 38 |
| 4.3. UPOREDNA ANALIZA LABORATORIJSKIH PARAMETARA ISPITIVANIH GRUPA..... | 42 |
| 4.3.1. Osnovne laboratorijske analize ispitivanih grupa..... | 42 |

| | |
|--|------------|
| 4.3.2. Analiza pozitivnosti aFL..... | 43 |
| 4.3.3. Analiza markera zapaljenja..... | 46 |
| 4.3.4. Analiza parametara oksidativnog stresa..... | 51 |
| 4.3.5. Analiza prisustva asimetričnog dimetilarginina (ADMA)..... | 54 |
| 4.3.6. Analiza aktivnosti hemostatskog sistema (d dimer, ETP)..... | 55 |
| 4.4. KORELACIJE ENDOTELNE DISFUNKCIJE SA ISPITIVANIM PARAMETRIMA..... | 60 |
| 4.4.1. Korelacije endotelne disfunkcije sa klasičnim kardiovaskularnim faktoriima rizika..... | 60 |
| 4.4.2. Korelacije endotelne disfunkcije sa sa aFL..... | 62 |
| 4.4.3. Korelacije endotelne disfunkcije sa markerima zapaljenja..... | 63 |
| 4.4.4. Korelacije endotelne disfunkcije sa parametrima oksidativnog stresa. | 64 |
| 4.4.5. Korelacije endotelne disfunkcije sa asimetričnim dimetilargininom.... | 67 |
| 4.4.6. Korelacije endotelne disfunkcije sa aktivnosti hemostatskog sistema.. | 68 |
| 4.5. KLINIČKE MANIFESTACIJE AFS..... | 69 |
| 4.5.1. Korelacije tromboze sa klasičnim faktoriima rizika..... | 72 |
| 4.5.2. Korelacije tromboze sa vrstom i titrom aFL..... | 73 |
| 4.5.3. Korelacije tromboze sa ostalim laboratorijskim parametrima..... | 76 |
| 4.6. ENDOTELNA DISFUNKCIJA I TROMBOTIČNI DOGAĐAJ..... | 77 |
| V DISKUSIJA..... | 81 |
| VI ZAKLJUČAK..... | 96 |
| VII LITERATURA..... | 100 |

I UVOD

1.1. ISTORIJSKI PRISTUP ANTIFOSFOLIPIDNOM SINDROMU

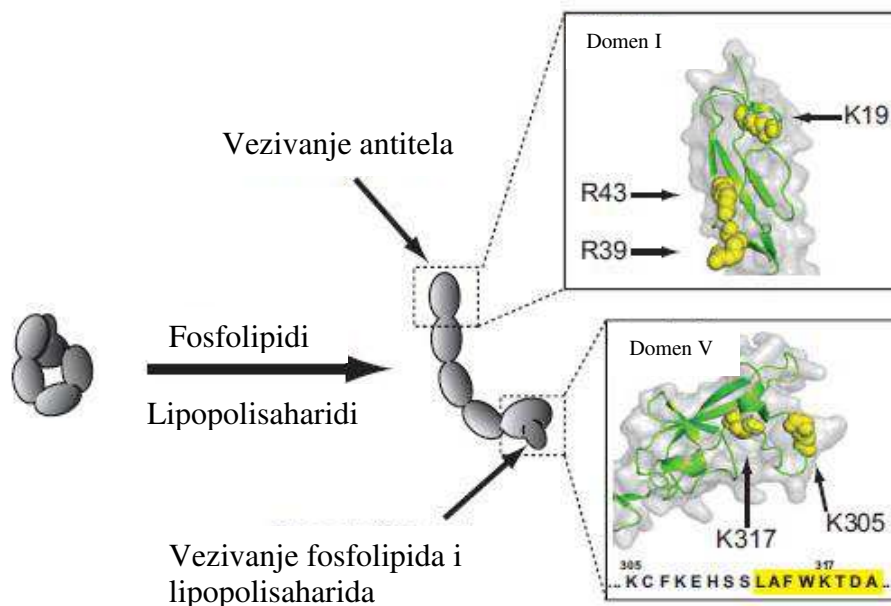
Antifosfolipidni sindrom (AFS) opisan je kao poseban entitet u drugoj polovini prošlog veka. Prvi put je prepoznat u kontekstu seroloških ispitivanja sifilisa od strane Wassermana i sar.¹ koji su u prvoj polovini XX veka godine razvili test fiksacije komplementa za sifilis koristeći antigen (koji su nazvali reagin) tj. fosfolipide dobijene iz jetrinog ekstrakta fetusa sa kongenitalnim sifilisom.

Serološki test za sifilis se masovno primenjivao, ali je pokazano da veliki broj osoba i pored pozitivnog testa nikada ne razvije kliničke simptome bolesti. Godine 1941., Pangborn² je dokazao da je reagens anjonski fosfolipid i nazvao ga kardiolipin pošto ga je izolovao iz srčanog mišića. Moore i Mohr³ su 1952. godine pokazali da osobe koje ne razviju kliničku sliku sifilisa, a imaju lažno pozitivan test, kasnije razviju neke druge bolesti. Takođe, osobe koje imaju stalno lažno pozitivan test na sifilis imaju veći rizik da razviju simptome i znake sistemskog lupus eritematozusa (SEL). U isto vreme, kod dva pacijenta sa SEL uočeno je prisustvo stečenog cirkulišućeg inhibitora koji u *in vitro* uslovima produžava vreme koagulacije zbog čega je dobio naziv lupusni antikoagulant (LA)⁴. Bowie i sar.⁵ su prvi 1963. godine opisali povezanost LA sa trombozama umesto krvarenjem. Feinstein i Rapaport⁶ su ovaj inhibitor koagulacione kaskade fosfolipida 1972. godine nazvali lupusnim antikoagulansom (LA). Ovaj naziv je zadržao do danas. Antikoagulantni efekat ovih antitela je striktno *in vitro* fenomen, dok u *in vivo* uslovima imaju protrombogeni efekat.

Sledeći korak napravili su Harris i sar. koji 1983. uvode imunoserološki metod za detekciju antikardiolipinskih antitela (aKL)⁷, a dve godine kasnije i ELISA metodu za određivanje njihove koncentracije⁸. Primenjujući test na velikom broju pacijentkinja sa SEL, utvrđeno je da jedna grupa pacijentkinja sa povišenim titrom aKL ima veću incidencu tromboza i gubitaka ploda što je nazvano antikardiolipinski sindrom⁹.

U medicinskoj literaturi, pojam antifosfolipidni sindrom prvi put je uveden pre više od 30 godina. Graham Hughes je 1983. godine prvi opisao taj sindrom te se u literaturi često nalazi i pod imenom Hughesov sindrom (*Sy Hughes*)⁹, definišući ga kao udruženost prisustva antikardiolipinskih antitela (aKL) sa trombozom i/ili spontanim pobačajem.

Jedno od najzanimljivijih otkrića kraja devedesetih godina bilo je da aKL pozitivnost kod većine pacijenata sa AFS zavisi od prisustva proteinskog kofaktora. Tri nezavisne grupe istraživača su skoro istovremeno pokazale da tzv. antikardiolipinska antitela nisu uperena protiv samog kardiolipina već protiv kofaktora¹⁰⁻¹². Taj kofaktor je plazma apolipoprotein nazvan β_2 glikoprotein I (β_2 GPI) koji se kao jednonančani polipeptid vezuje za anjonske fosfolipide. Oko 40% cirkulišućeg β_2 GPI vezano je za lipoproteine, po čemu je i dobio naziv apolipoprotein H. Biološka uloga ovog proteina nije u potpunosti jasna mada se smatra prirodnim antikoagulansom. Dalja istraživanja su pokazala da nisu sva aKL antitela β_2 GPI zavisna i da *in vitro* antikoagulantni efekat LA pozitivnih aKL zavisi od prisustva β_2 GPI samo kod dela pacijenata. β_2 GPI zavisna antitela nađena su samo kod pacijenata sa autoimunim bolestima, dok su kod pacijenata sa infektivnim bolestima nađena β_2 GPI nezavisna antifosfolipidna antitela¹². Zatim je od strane drugih autora¹³⁻¹⁵ potvrđeno da je β_2 GPI potreban kao kofaktor za LA mada je kod nekih pacijenata pokazano je da je LA aktivnost zavisna od prisustva protrombina^{16,17}. Najnovija istraživanja pokazuju da naglašeni protrombotski efekat imaju aFL usmerena protiv domena I β_2 GPI¹⁸. Tj. β_2 GPI je cirkularna formacija čiji su domeni I i V u kontaktu. Međutim, nakon vezivanja za anjonski fosfolipid, β_2 GPI menja konformaciju i prelazi u lančanu formu čime otkriva domen I i dobija na trombotskom potencijalu¹⁸ (Slika 1).



Slika 1: Promena konformacije β_2 GPI (Adaptirano prema DeGroot i sar¹⁸)

1.2. KRITERIJUMI ZA DIJAGNOZU AFS

1.2.1. KLINIČKI KRITERIJUMI ZA DIJAGNOZU AFS

Kriterijumi za dijagnozu AFS-a su klinički i laboratorijski (Sapporo 1998. god, revidirani 2006. god u Sidneju)^{19,20} (Tabela 1). Klinički kriterijumi za postavljanje dijagnoze AFS-a podrazumevaju jednu ili više epizoda tromboze arterija, vena ili malih krvnih sudova u nekom tkivu ili organu i/ili komplikacije trudnoće. Laboratorijski kriterijum za postavljanje dijagnoze AFS-a su prisustvo (jednog ili više vrsta) antitela, antikardiolipinskih, β_2 glikoprotein I (β_2 GPI), i/ili prisustvo antitela u krvi na lupus antikoagulans (LA) koja su otkrivena dva ili više puta u razmaku od najmanje 12 nedelja. Konsenzus obuhvata kliničke i laboratorijske kriterijume, pri čemu ne bi trebalo da prođe više od 5 godina za ispoljavanje kliničkih manifestacija u odnosu na laboratorijsku potvrdu¹⁹.

Tabela 1. Kriterijumi za dijagnozu AFS

Klinički kriterijumi (jedan ili više od sledećih kriterijuma mora biti prisutan)

I Vaskularna tromboza

Jedna ili više epizoda arterijske, venske ili tromboze malih krvnih sudova koje zahvataju neko tkivo ili organ

II Komplikacije trudnoće

- Neobjašnjiva smrt morfološki normalnog ploda tokom i nakon 10.-te nedelje trudnoće
- Prevremeni porođaj morfološki normalnog ploda tokom i posle 34.-te nedelje trudnoće, zbog preeklampsije ili eklampsije ili teške insuficijencije placente
- Tri ili više neobjašnjenih uzastopnih spontanih pobačaja pre 10 nedelja gestacije

Laboratorijski kriterijumi (jedan ili više od sledećih kriterijuma mora biti prisutan)

III Laboratorijski kriterijumi

- Antikardiolipinska antitela IgG ili IgM (aKL) klase, prisutna u srednjem ili visokom (tj. za IgG: >40 IgG fosfolipidnih jedinica/mL (GPL/mL) ili za IgM: >40 IgM fosfolipidnih jedinica/mL (MPL/mL) ili vrednosti iznad granice 99 percentila metode) u razmaku od najmanje 12 nedelja
- Lupus antikoagulans (LA) utvrđen u krvi u dva ili više navrata u razmaku od najmanje 12 nedelja
- Anti-β₂-glikoprotein I antitela (anti β₂GPI) klase IgG i IgM, prisutna u vrednosti iznad granice 99 percentila metode) u razmaku od najmanje 12 nedelja

AFS je poznat faktor rizika za nastanak arterijskih tromboza (koje nastaju u 1/3 slučajeva) i venskih tromboza (koje nastaju u 2/3 slučajeva). Najčešće mesto venske tromboze su donji ekstremiteti, a skoro polovina pacijenata sa dubokom venskom trombozom (DVT) razvije emboliju pluća. Najčešće mesto arterijske okluzije je cerebralna cirkulacija, koja može biti posledica tromboze ili embolije, a rezultat je klinička slika tranzitornog ishemijskog ataka (TIA) i/ili moždanog udara. Međutim, bilo koji deo vaskularnog sistema može da bude pogođen. Po pravilu, recidivi tromboza dešavaju se kod istog bolesnika na istim krvnim sudovima: ako je bolesnik imao prvu

trombozu u arterijskoj mreži, najverovatnije će imati recidiv neke arterijske tromboze (ne mora iste lokalizacije), a venske tromboze se ponavljaju, po pravilu, opet u venskom slivu. Razlog takvom kliničkom ispoljavanju nije jasan. Mortalitet pacijenata sa AFS u petogodišnjem praćenju iznosi 5,3%. Najčešći uzrok smrti, i to do 40% slučajeva, je tromboza²¹.

AFS je bolest sa mnogo lica i ponekad je teško postaviti dijagnozu pošto može biti zahvaćen bilo koji organ, uključujući pluća, srce, kožu, bubrege, oči, žlezde i jetru. Kliničke manifestacije koje nisu prihvaćene kao klinički kriterijumi AFS („*non criterial*“) su valvularna bolest srca, livedo retikularis, trombocitopenija, nefropatija, neurološke i netrombotske manifestacije^{19,22}. U okviru AFS moguće su različite hematološke manifestacije od kojih je trombocitopenija najčešća²³, pored autoimune hemolitičke anemije. Od kardioloških manifestacija, jedino intrakardijalni tromboza ispunjava kriterijum tromboze u AFS, dok se često nalaze i valvularna bolest srca, aseptični endokarditis i sl²⁴. Od dermatoloških manifestacija AFS, pored livedo retikularis, mogu se javiti ulceracije kože, gangrena prstiju, površinski tromboflebitis i podnokatne hemoragije²⁵. Pored tranzitornog ishemijskog ataka i ishemijskog moždanog udara, nema drugih prepoznatih neuroloških manifestacija u AFS. Uveliko se diskutuje i nakupljeno je mnogo dokaza i da bi se i manifestacije tipa kognitivne disfunkcije, horee, glavobolje ili migrene, transverzalne mijelopatije, epilepsije, Sneddonovog sindroma (ponavljani ishemijski moždani udari i livedo retikularis) uvrstile u kriterijume bolesti²⁶.

AFS se može ispoljiti kao primarni ili sekundarni, kada je udružen sa drugom bolesti. Primarni AFS (PAFS) se ispoljava kao osnovna bolest, dok se udružen sa drugom bolesti (SAFS) javlja u okviru nekog drugog patološkog stanja ili bolesti, prvenstveno sistemskog eritemskog lupusa (SEL), maligne bolesti, infekcije, hematoloških i dr. bolesti. Glavna promena u kriterijumima iz Sidneja je uvođenje β_2 GPI kao laboratorijskog kriterijuma bolesti i produžavanje perioda za retestiranje na više od 12 nedelja. Takođe, preporuka je da se ne pravi razlika između primarnog i sekundarnog AFS zato što nije poznato da li su AFS i SEL dve bolesti koje koinduciraju kod jedne osobe, ili je postojeći SEL osnova za razvoj AFS, ili su AFS i SEL dva

elementa istog procesa. Sekundarni i primarni AFS se ne mogu uvek razlikovati pošto imaju zajedničke kliničke i serološke manifestacije²⁷. Kao poseban oblik izdvojen je katastrofični antifosfolipidni sindrom (KAFS), koji je izrazito teška forma antifosfolipidnog sindroma sa veoma visokom stopom mortaliteta (50%)²⁸⁻³¹.

Prisustvo LA je najjači faktor rizika za pojavu tromboza, povećava rizik za trombozu 5,7-9,4 puta, i to naročito venskih³². Prisustvo aKL nosi manji rizik za trombozu u odnosu na prisustvo LA. Usporedna analiza sedam studija ukazuje da je prisustvo aKL povezano sa arterijskom trombozom, posebno cerebralnim insultom i akutnim infarktom miokarda, ali ne i sa dubokom venskom trombozom³³. Danowsky i sar.³⁴ uočili su značajnu povezanost visokog titra aKL (>40GPL-U) i incidence tromboza kod bolesnika sa PAFS. Marai i sar.³⁵ nisu uočili povezanost titra aKL i pojave tromboza. Prisustvo više od jedne vrste aFL je povezano sa višim rizikom za nastanak tromboze i recidiva³⁶. Rezultat ELISA testa za β_2 GPI ne pokazuje značajnu korelaciju sa trombotskim događajima. Objašnjenje je da se ovim testom detektuju antitela protiv svakog domena β_2 GPI, a da je za trombotski rizik značajan domen I. Subpopulacija antifosfolipidnih antitela koja prepoznaju domen I β_2 GPI pokazuju visoku korelaciju sa trombozama i LA pozitivnošću. Retrospektivna statistička analiza je pokazala da je OR za trombozu 42,3 kod pacijenata sa β_2 GPI zavisnom LA aktivnošću u odnosu na 1,6 kod kojih je LA aktivnost nezavisna od β_2 GPI³⁷ tj. subpopulacija β_2 GPI antitela usmerenih na domen I ima aktivnost lupus antikoagulansa.

U svakodnevnom kliničkom radu uveden je i pojam visokorizičnog profila aFL. To su pacijenti sa 1) pozitivnim LA testom, 2) višim titrom aKL i β_2 GPI antitela IgG izotipa¹⁹, 3) trojnom aFL pozitivnosti (LA, aKL, β_2 GPI) koja je češće vezana za kliničku manifestaciju u odnosu na dvojnu ili pojedinačnu aFL pozitivnost³⁸, 4) kontinuirano pozitivnim aFL, pošto se prolazna aFL mogu naći tokom infekcije i nekih drugih stanja, 5) većim brojem klasičnih faktora rizika pošto proporcionalno raste i rizik od tromboze^{39,40} (slično kao u opštoj populaciji). Takođe, pacijenti se u prakse često dele na one sa trombotskim i/ili akušerskim manifestacijama AFS.

Međutim, dileme oko AFS obuhvataju i seronegativni AFS („*probable APS*“), tj bolesnike koji imaju kliničke manifestacije, a serijsko testiranje na aFL je negativno. Predloženo objašnjenje je prisustvo antitela koja nisu u rutinskom opsegu testiranja (npr. antitela IgA aKL izotipa, β_2 GPI IgA, antifosfatidilserin antitela, antifosfatidiletanolamin antitela, antitela na protrombin) ili prolazna seronegativnost zbog bolesti, lekova, nefrotskog sindroma⁴².

1.2.2. LABORATORIJSKI KRITERIJUMI

Antifosfolipidna antitela (engl. Antiphospholipid Antibodies - aFL) su familija od najmanje 20-tak antitela protiv negativno naelektrisanih proteina koji vezuju fosfolipide, a od značaja su ona koja su u najjačoj korelaciji sa kliničkim manifestacijama. Iako je β_2 GPI dominantni cilj za autoimuna aFL, opisani su i drugi fosfolipid vezujući proteini sa sličnom ulogom kao što su protrombin, protein C, protein S i aneksin A5⁴³⁻⁴⁵. Testovi za otkrivanje ovih aFL koriste različite antigene: antikardiolipinski ELISA test detektuje prisustvo autoantitela na kardiolipin i β_2 GPI, ELISA za β_2 GPI detektuje autoantitela usmerena na β_2 GPI, dok lupus antikoagulans esej meri prisustvo “funktionalnih” anti β_2 GPI antitela i antiprotrombinskih antitela.

Lupus antikoagulans obuhvata grupu aFL koja su usmerena protiv negativno naelektrisanih fosfolipida ili kompleksa fosfolipid-plazmatski protein (faktori koagulacije, β_2 GPI itd.). LA su imunoglobulini klase IgG ili IgM koji kada se vežu za svoje antigene, produžavaju vreme koagulacije koje zavisi od fosfolipida. Detektuju se koagulacionim testovima u kojima LA antitela produžavaju koagulaciono vreme zavisno od fosfolipida. Određivanje LA izvodi se prema revidiranim kriterijumima od strane ISHT kao *multistep procedura*⁴⁶ koja podrazumeva skrining test, test mešanja sa normalnom plazmom i potvrdni test (dodatkom fosfolipida). Najčešće primenjivani skrining testovi (dovoljan je jedan pozitivan) su: a) test kojim se ispituje zajednički put koagulacije: koagulaciono vreme sa razblaženim Rasellovim zmijskim otrovom (engl. Diluted Russells Viper Venom Test - DRVVT), b) aktivirano parcijalno tromboplastinsko vreme. Ako je skrining test pozitivan pristupa se testu mešanja

ispitivane plazme u odnosu 1:1 sa normalnom puliranom plazmom bez prethodne inkubacije. Za potvrdni test preporučuje se onaj sa dvoslojnim i heksagonalnim fosfolipidima⁴⁷. Potrebno je istaknuti da je kod pacijenata na antikoagulantnoj terapiji, posebno na terapiji heparinom, tumačenje laboratorijskih testova za LA otežano zbog visokog procenta lažno pozitivnih rezultata. Uzimanje uzorka krvi za određivanje LA potrebno je izvršiti pre započinjanja antikoagulantne terapije, kada je INR manji od 1,5 ili kada se oralna antikoagulantna terapija zameni niskomolekularnim heparinom (uzimanje uzorka krvi kada prođe 12 sati od poslednje injekcije).

Antikardiolipinska antitela su grupa antitela prvenstveno usmerenih protiv membranskih fosfolipida, kao što su kardiolipin i fosfatidilserin. Ova antitela se određuju imunskim testovima, kao što je ELISA. Postoje različite potklase i izotipovi imunoglobulina iz ove grupe, kao što su: IgG (IgG1-4), IgA i IgM. Kriterijumi podrazumevaju testiranje na IgG i IgM za potvrdu dijagnoze AFS. Povišen nivo subklase IgG nosi najveći rizik od tromboza i zato aKL IgG klase imaju najveći klinički značaj⁴⁸. Prema nekim autorima, korelacija pozitivnosti LA i aKL ide i do 85%. Anti- β_2 -glikoprotein-I antitela se takođe detektuju imunskim ELISA testom i danas se smatra da ovaj tip antifosfolipidnih antitela ima najveći klinički značaj. Poslednjih godina IgA izotipovi postaju aktuelna u kliničkim istraživanjima.

Ostala aFL, koja se sporadično testiraju, a klinički značaj još nije dokazan su antiprotrombinska antitela (heterogena grupa usmerena protiv protrombina i fosfatidilserin/protrombin kompleksa), fosfatidilholin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilglicerol, fosfatidilinozitol, i fosfatidilserin, antianeksin i dr⁴⁹.

Kad god je moguće preporuka je pacijente klasifikovati prema aFL pozitivnosti na klasu I) više od jednog aFL pozitivno (bilo koja kombinacija), IIa) LA test izolovano pozitivan, IIb) aKL izolovano pozitivan (srednji/visoki titar), IIc) β_2 GPI izolovano pozitivan (srednji/visoki titar)¹⁹.

Postoje i skorovi za kvantifikaciju rizika kliničkih manifestacija AFS određenog profila aFL, ali nijedan od njih još uvek nema kliničku primenu. Skor Otomo i sar.

kreiran je na osnovu određivanja nekoliko aFL, a svakom aFL je dodeljen različit skor na osnovu relativnog rizika za nastanak kliničke manifestacije. U ovaj skor ulazi određivanje antifosfatidilserin zavisnih antiprotrombinskih antitela koja nisu deo konvencionalnog serološkog testiranja⁵⁰. GAPSS⁵¹ skor Sciascia i sar osim profila aFL (takode i antifosfatidilserin zavisnih antiprotrombinskih antitela) uzima u obzir i dva konvencionalna faktora rizika, hipertenziju i hiperlipidemiju, ali i sami autori ocenjuju da je potrebna dalja validacija skora u prospektivnoj kohorti pacijenata.

1.3. EPIDEMIOLOŠKI PODACI

Tačna prevalenca AFS nije poznata ali se smatra da je incidenca AFS oko 5 novih slučajeva na 100.000 godišnje sa prevalencom od oko 40-50 slučajeva na 100.000 osoba⁵². Prevalenca aFL u opštoj populaciji kod pacijenata sa moždanim udarom iznosi 13%, kod pacijenata sa infarktom miokarda 11%, kod pacijenata sa DVT 9,5% i kod 6% pacijenata sa gubitkom ploda⁵³. Međutim, činjenica je i da 12% starije i 2% mlađe zdrave populacije ima pozitivna aFL, ali bez ispoljenih tromboembolijskih komplikacija⁵⁴.

LA antitela su prisutna kod 1-3,6% zdravih osoba, a aKL kod 1-5,6%⁵⁵. Učestalost pojavljivanja ovih antitela kod zdravih osoba povećava se sa godinama starosti, pa nalaz pozitivnih LA antitela sa oprezom treba tumačiti kod starijih osoba. Prevalenca aFL kod pacijenata sa SEL je raznolika, 15-86%, što se objašnjava raznolikošću studija, etničkom pripadnošću i aktivnošću autoimune bolesti⁴⁹. Revidirani kriterijumi za postavljanje dijagnoze SEL uključuju aFL⁵⁶. Do 40% pacijenata sa aFL i SEL će razviti kliničke manifestacije AFS, dok će manje od 15% pacijenata sa PAFS razviti sliku SEL tj SAFS⁵².

Nije registrovana veća učestalost primarnog AFS kod pojedinih rasa, iako je sistemski lupus mnogo učestaliji kod Amerikanaca afričkog porekla i Hispano Amerikanaca. Žene češće oboljevaju od sekundarnog AFS, što se dovodi u vezu sa učestalijim oboljevanjem žena i od drugih autoimunskih bolesti. Najčešće oboljevaju

žene u reproduktivnom životnom dobu, a zabeleženi su i slučajevi obolele dece, čak i mlađe od osam meseci⁵⁷. Prevalenca KAFS je mala (manje od 1% AFS)²⁸.

1.4. OKSIDATIVNI STRES U ANTIFOSFOLIPIDNOM SINDROMU

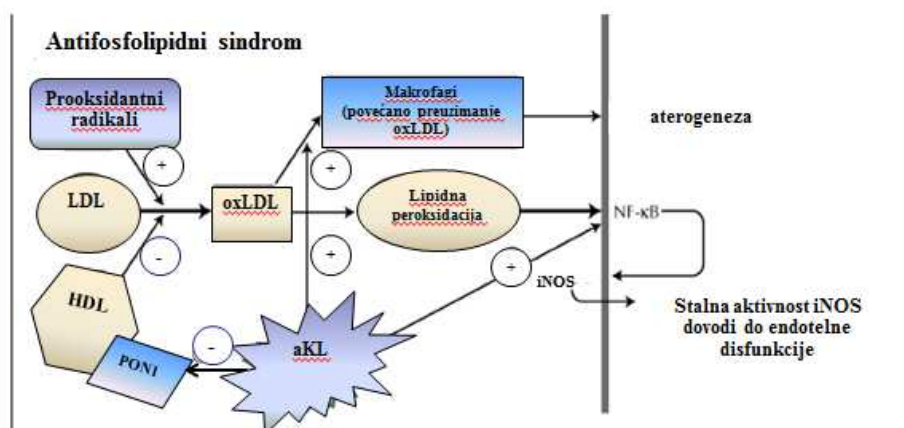
Oksidativni stres predstavlja disbalans između prooksidanasa (slobodnih radikala) i sistema antioksidativne zaštite u korist prooksidanasa, koji potencijalno vodi ka oštećenju različitih struktura, od molekula, preko ćelija do tkiva. Laboratorijska kvantifikacija prooksidanasa je nepouzdana zbog kratkog poluživota radikala tako da se oksidativni stres može proceniti indirektno, merenjem oksidovanih produkata lipida, proteina i statusa endogenih antioksidanasa.

Dokazano je prisustvo oksidativnog stresa (različitim metodama) kod pacijenata sa sistemskom progresivnom sklerozom, SEL, RA⁵⁸ i to prevashodno kao posledica povećane produkcije slobodnih radikala⁵⁹ u odnosu na mehanizme antioksidativne zaštite. Takođe je pokazano da je oksidativni stres u većoj meri prisutan kod pacijenata sa AFS koji imaju trojnu pozitivnost aFL⁶⁰.

Osnova merjenja oksidativnog stresa jeste merenje nivoa peroksidacije lipida u ćelijskoj membrani. Lipidna peroksidacija izaziva razgradnju lipida na veliki broj primarnih oksidativnih produkata, kao što su konjugovani dieni (lipidni hidroperoksidi, *LOOH*), i sekundarnih oksidativnih produkata uključujući tu malondialdehid (MDA), F2- izoprostan ili izdahnuti pentan, heksan ili etan. Za oslobađene vazoaktivne izoprostane je dokazano da aktiviraju koagulaciju⁶¹. Prisustvo aFL kod bolesnika sa SEL dovodi do povećane oksidacije lipida i u osnovi ovog procesa jeste lipidna peroksidacija⁶²⁻⁶⁵ a dokazana je pozitivna korelacija lipidne peroksidacije i titra IgG aKL kod bolesnika sa AFS i SEL⁶⁶. Merenje *LOOH* se takođe pokazao kao mera ateroskleroze i prediktor kardiovaskularnih događaja⁶⁷. Povećana lipidna peroksidacija je dokazana kod aFL pozitivnih SEL pacijenata sa signifikantnom korelacijom sa F1+2 (kao markerom generacije trombina) što je mogući dokaz da lipidna peroksidacija može da dovede do aktivacije sistema koagulacije krvi⁶⁸.

Produkti uznapredovale oksidacije proteina (AOPP, „*advanced oxidation protein products*“) su produkti nastali dejstvom slobodnih radikala na proteine, i pokazana je njihova uloga kao medijatora aktivacije neutrofila, monocita i T limfocita koja vodi povećanoj ekspresiji biološki aktivnih molekula (adhezionih molekula, citokina, vazoaktivnih supstanci, faktora koagulacije, metaloproteinaza) čime doprinose procesima ateroskleroze i tromboze^{69,70}. Do sada je AOPP praćen kod bolesnika sa SEL i pokazano je da pozitivno korelira sa aktivnosti SEL kao i vrednostima CRP i fibrinogena (tj. zapaljenskim pokazateljima koji prate SEL). U radu Lozovoy i sar.⁷¹ dokazano je prisustvo oksidativnog stresa kod pacijenata sa SEL kao povećanje LOOH i AOPP. Inflamacija podržava prisustvo oksidativnog stresa što je potvrđeno pozitivnom korelacijom CRP sa ovim markerima⁷¹.

Paraoksonaza (PON1) je enzim sa antioksidativnom aktivnošću koji je vezan za cirkulišući HDL („*high density*“ lipoprotein) u plazmi. Njegova uloga je prevencija oksidacije LDL. β_2 GPI se vezuje za oxLDL ali ne i za nativni LDL. Alves i sar.⁷² su prvi pokazali obrnuto proporcionalan odnos titra aKL klase IgG i β_2 GPI prema PON1 aktivnosti kod bolesnika sa AFS i SEL. U prilog ovome govori i to što su IgG anti HDL i IgG anti β_2 GPI antitela udružena sa smanjenom aktivnosti PON1 kod pacijenata sa SEL i AFS, dok su samo IgG anti β_2 GPI nezavisan faktor rizika za smanjenu PON1 aktivnost kod pacijenata sa primarnim AFS⁷² (Slika 2).



Slika 2: Proaterogeni mehanizam indukovani aKL i PON1 kod pacijenata sa antifosfolipidnim sindromom (Adaptirano prema Alves i sar)⁷³

Na promociju lipidne peroksidacije u prisustvu oxLDL utiče nizak stepen inflamacije (koji se može pratiti kao CRP) i dodatni kardiovaskularni faktori rizika. CRP se veže za LDL⁷⁴ i takođe učestvuje u ovom procesu.

U prisustvu aKL, oksidativni stres dobija na značaju u smislu povećanja rizika ka aterosklerozi ali i povećanja rizika ka nastanku tromboze. Antitela na oxLDL se takođe smatraju velikim činiocem rizika za nastanak tromboze, pošto LDL („*low density*” lipoprotein) sadrži kako fosfolipide tako i proteinski kofaktor-apolipoprotein B. U nizu studija je dokazana međusobna povezanost koronarne bolesti kod SEL bolesnika sa anti-ox LDL i aFL. Mehanizam hiperkoagulabilnosti nije do kraja razjašnjen, te su stoga važni radovi Vaarale i sar.⁷⁵ koji su prvi pokazali ukrštenu reakciju antitela na oxLDL sa aFL. U svim slojevima ateroskleroznog plaka opisan je β_2 GPI, dok njegov titar koreliše sa stepenom uznapredovanosti ateroskleroze. Godine 1997. prvi put je opisan patogenetski mehanizam β_2 GPI⁷⁶. Pokazano je da u odsustvu aKL, β_2 GPI ima protektivnu ulogu inhibicijom preuzimanja oxLDL-a od strane makrofaga preko *scavenger* receptora. Međutim, ako u cirkulaciji postoje aKL, β_2 GPI se menja i na taj način se preuzimanje oxLDL-a povećava, ali u ovom slučaju, preko Fc receptora. Ništa manji značaj od navedenog imaju i anti-oxLDL antitela koja su nađena kod 22% bolesnika sa AFS i čiji je titar značajno povećan kod bolesnika sa arterijskim trombozama uz konstataciju da sama bolest (SEL) jeste najznačajniji faktor rizika za pojavu ubrzane ateroskleroze⁷⁷.

Kao indirektna mera antioksidativne zaštite određivano je prisustvo ukupnih sulfhidridnih (tiol, SH) grupa (proteinskih i neproteinskih). β_2 GPI u cirkulaciji učestvuje u oksidoreduktivnim reakcijama razmene tiol grupa⁷⁸ pa se može naći u oksidovanom (nema tirole) i redukovanom obliku (ima tirole). Ovaj redukovani oblik štiti endotel od oštećenja⁷⁹. Kod pacijenata sa AFS se nalazi veća koncentracija slobodnog i oksidovanog oblika⁸⁰ koji mogu da budu razlog oštećenja endotela i potencijalnog razvoja tromboze.

1.5. ENDOTELNA DISFUNKCIJA U ANTIFOSFOLIPIDNOM SINDROMU

Endotel je regulator hemostaze, dinamički organ sa kompleksnim metaboličkim sposobnostima, koji izlučuje određene antitrombotičke i protrombotičke materije, kao i vazodilatatorne i vazokonstriktorne faktore, utiče na protok biološki aktivnih supstanci, interćelijske kontakte, interreakciju matriksa i ćelija.

Kao što je već poznato, endotel krvnog suda ima odlučujuću ulogu u održavanju integriteta krvnog suda⁸¹. Endotel odrasle osobe, prosečne telesne težine, dinamičan je organ koji sadrži $1-6 \times 10^{13}$ ćelija, težak oko 1kg, površine koja bi mogla da prekrije otprilike 6 teniskih terena, sa kompleksnim metaboličkim sposobnostima, jedan od najvažnijih regulatora hemostaze⁸². Endotel sekretuje različite vazodilatatorne (NO, prostaciklin, EDHF – *endothelial-derived hyperpolarizing factors*, ADP-azu, ugljen monoksid), vazokonstriktorne supstance (endotelin, vazokonstriktorni prostanoidi, PAF-*platelet activating factor*), antiaterosklerotske i antitrombotske supstancije (NO, prostaciklin, heparinu slične molekule, glikozaminoglikane, heparan) kao i proaterosklerotske i protrombotske faktore (tkivni faktor, FVIII, vWF, PAI-1, TAFI)^{82,83}.

Lezija endotela se ispoljava disfunkcijom endotela ili može biti grublja sa deskvamacijom endotela, ogoljavanjem intime arterije i njenog kolagena na kom može doći do adhezije trombocita i nastanku tromboze⁸⁴. Disfunkcija endotela se karakteriše redukcijom sinteze azot monoksida (NO) i smanjenjem sinteze PGI₂, koja omogućava ekspimiranje adhezivnih proteina koje dovodi do adhezije ćelija na endotel⁸⁵ (VCAM-1 - *vascular cell adhesion molecule-1*, MCP-1 - *monocyte chemotactic factor-1*, P-selektin, E-selektin). Mnoge inflamatorne molekule su uključene u proces inflamacije kao što su interleukin (IL)-1, IL-6. Istovremeno trombociti koji adheriraju na mesto povrede endotela sekretuju različite citokine (CD40L, PAF - *platelet activating factor*, RANTES, ENA-78, MIP - *macrophage inflammatory protein*, CXC ligand 4), koji imaju autokrini i parakrini dejstva.

Uopšteno sagledavajući „zdravi“ endotel, tokom fizioloških uslova, ekspirira antitrombotična svojstva. Suprotno tome oštećeni ili aktivirani endotel pokazuje protrotbotička svojstva.

Razlog disfunkcije endotela može da bude interrekcija aFL sa antigenima na endotelnim ćelijama^{86,87}. Prvo je u *in vitro* studijama pokazano da prisustvo aFL može od endotela da napravi prokoagulantnu površinu ekspresijom inhibitora plazminogen aktivatora, tkivnog faktora, vonWillebrandovog faktora kao i adhezivnih molekula za leukocite (VCAM, ICAM, E selektin)⁸⁸. Endotelne ćelije na supstratu sa aFL, povećano ekspiriraju ćelijske adhezivne molekule i to posredstvom β 2GPI, čime povećavaju adheziju leukocita na zid krvnog suda i promovišu inflamaciju i trombozu. U prvoj studiji na kliničkom materijalu je pokazano da je trombogeni potencijal aFL posredovan intercelularnim adhezivnim molekulom-1 (ICAM-1), plazminogen aktivatorom i vonWillebrandovim faktorom⁸⁹.

Prema tome, osnovna osobina aFL je da učestvuju kako u nastanku venske tako i arterijske tromboze. Kako je u venskom slivu povećana lokalna produkcija trombina sa taloženjem fibrina i agregacijom trombocita u uslovima sporijeg toka krvi, najčešće se viđa proksimalna propagacija tromba. U arterijskim krvnim sudovima, gde je tok krvi brži, češće se sreće distalna propagacija sa embolizacijom.

Jedan od uzroka endotelne disfunkcije je inaktivacija azot monoksida (NO) reaktivnim slobodnim radikalima, odnosno nishodna regulacija eNOS (endotelna NO sintetaza) destabilizacijom eNOS mRNA. Azot monoksid (NO) koji nastaje iz eNOS učestvuje u prevenciji tromboze tako što inhibira agregaciju trombocita i inhibira sintezu adhezivnih molekula koji učestvuju u formaciji ugruška. Smatra se da NO ima važnu ulogu u endotelnoj disfunkciji kod bolesnika sa autoimunim bolestima. Wanchu i sar.⁹⁰ pokazali su povećanu sintezu NO kod pacijenata sa SEL sa pozitivnom korelacijom sa aktivnošću bolesti i vrednostima komplementa. Druga studija preseka je pokazala da SEL pacijenti sa aktivnom bolesti, niskim komplementom i visokim titrovima anti dsDNA imaju višu koncentraciju NO⁹¹. Smatra se da aFL mogu da interferiraju sa većom aktivnošću eNOS i samim tim sa proizvodnjom NO⁹². Alves i sar.⁹³ su na

mišjem modelu dokazali da su aKL u korelaciji sa smanjenom NO sintezom. U studiji Ramesh i sar.⁹⁴ je potvrđeno da aFL inhibira aktivaciju eNOS putem prepoznavanja domena I na β_2 GPI. Ovaj antagonizam eNOS je posredovan apoER2 plazma membranskim receptorom koji se nalazi na površini endotelnih ćelija.

Asimetrični dimetilarginin (ADMA) je direktan endogeni kompetitivni inhibitor eNOS. Povišena koncentracija ADMA obrnuto korelira sa vazodilatacijom endotela (snižanjem dostupnog NO na endotelu) i smatra se novim markerom endotelne disfunkcije⁹⁵. U studijama je dokazana veza ADMA sa povećanim kardiovaskularnim rizikom za 34% kao i povećanim mortalitetom ovih bolesnika za 56%⁹⁶. Takođe, povećan je mortalitet kod bolesnika sa bubrežnom bolešću, pošto se ADMA kod njih usporeno izlučuje^{97,98}. Porast koncentracije ADMA je zabeležen i kod starije populacije kao i kod pacijenata sa dijagnozom dijabetesa⁹⁹. Koncentracija ADMA pozitivno korelira sa povišenim vrednostima CRP⁹⁷⁻⁹⁹. Kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom koncentracija ADMA je značajno veća u odnosu na zdravu populaciju¹⁰⁰.

Endotelna disfunkcija se može proceniti biohemijskom analizom sistemskih markera endotelnog oštećenja i aktivacije ili kliničkim testom na krvnim sudovima periferne cirkulacije. Široko prihvaćen je test endotel zavisne vazodilatacije-brahijalni test kao neinvazivna, ultrazvučna metoda kojom se meri dilatacija brahijalne arterije¹⁰¹. U većem broju istraživanja potvrđeno je postojanje endotelne disfunkcije utvrđeno ovom metodom kod pacijenta sa AFS i SEL¹⁰²⁻¹⁰⁵. Kod pacijenata sa primarnim AFS prisutna je endotelna disfunkcija¹⁰⁶, i to posebno kod pacijenata sa arterijskom trombozom u odnosu na vensku¹⁰² i onih sa povišenim titrom aKL¹⁰⁷. Kod pacijenata sa SEL prisutna je endotelna disfunkcija^{108,109} koja korelira sa koncentracijama modifikovanog i nativnog LDL, E selektina i ICAM 1 u serumu¹¹⁰. Bengtsson i sar.¹¹¹ su pokazali da na endotelnu zavisnu i nezavisnu vazodilataciju kod pacijenata sa SEL utiče terapija. Kortikosteroidi redukuju endotel zavisnu dilataciju dok je varfarin povećava, a antimalarici povećavaju stepen endotel nezavisne dilatacije.

CRP je dokazani cirkulišući marker i medijator za endotelnu disfunkciju i aterosklerozi kod kardiovaskularnih bolesti. Obzirom na dokazano prisustvo

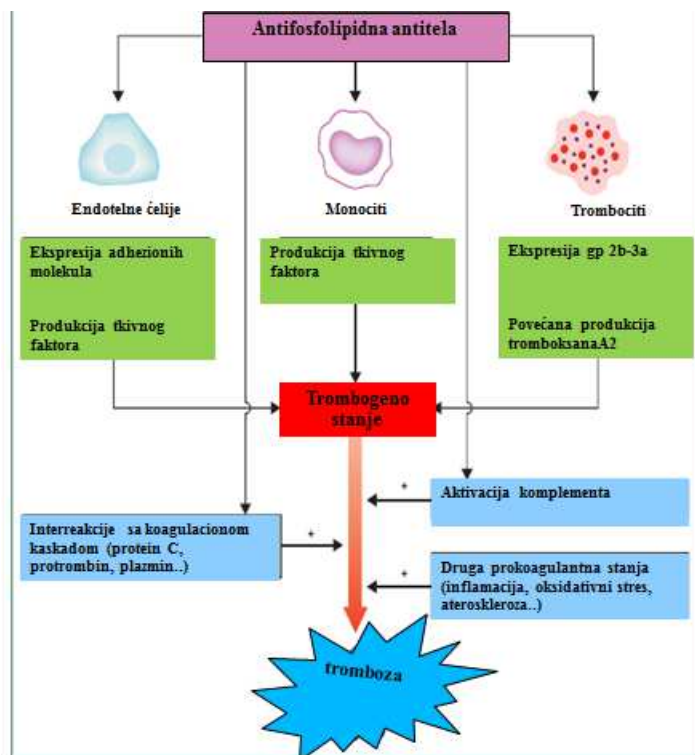
inflamacije kod bolesnika sa SEL (ako nisu u remisiji bolesti), neosporiva je uloga CRP u produkciji NO ¹¹².

Broj leukocita u serumu je marker inflamacije dok je odnos neutrofila i limfocita (NLR) jednostavan i jeftin pokazatelj prisustva zapaljenja, maligniteta, kardiovaskularnih bolesti i dijabetesne nefropatije. Qun i sar.¹¹³ su pokazali da NLR može da bude pokazatelj aktivnosti SEL.

1.6. MOGUĆI UZROCI TROMBOZE U ANTIFOSFOLIPIDNOM SINDROMU

Popularna je hipoteza o dva koraka u nastanku tromboze kod AFS ¹¹⁴. Prvi korak u nastanku tromboze je samo prisustvo aFL koji povećavaju trombotski rizik (putem aktivacije endotela, monocita, trombocita i komplementa) i potenciraju prokoagulantni efekat kasnijeg trombofilnog stanja koji ima efekat „drugog koraka“. Vodeći se ovom hipotezom kod 50% bolesnika sa AFS nađeni su pridruženi faktori rizika za trombozu kao što su dislipidemija, arterijska hipertenzija udružena sa pojavom arterijskih tromboza, tradicionalni faktori rizika (pušenje, rana menopauza, sedenterni način života, gojaznost), hirurška intervencija, produžena imobilizacija udružena sa venskim trombozama.

Mogući patogenetski mehanizmi nastanka tromboze kod pacijenata sa AFS su prikazani na slici 3 gde je jasno prikazana njihova multifaktorijalnost.



Slika 3: Patogeneza antifosfolipidnog sindroma¹¹⁵

Imajući u vidu antigenske determinante protiv kojih su usmerena aFL, suština njihovog dejstva je interakcija sa pojedinim komponentama hemostaznog sistema, čime se menja funkcija tih komponenti, zbog čega proces hemostaze postaje disfunkcionalan. U najvećem broju slučajeva dolazi do prevage prokoagulantnog sistema sa posledičnim nastankom tromboza. Veoma retko može doći i do aktivacije antikoagulantnih mehanizama i nastanka krvarenja (inhibicija aktivacije protrombina, Faktora IX i X)^{116,117}.

Prokoagulantni efekat aFL je dominantan i on se ostvaruje preko čitavog niza mehanizama kojima se favorizuje prokoagulabilna aktivnost hemostaznog sistema. Antifosfolipidna antitela, pored direktne interferencije sa faktorima koagulacije, mogu da povećaju vezivanje protrombina za membrane ćelija, inhibiraju aktivirani protein C, pojačavaju aktivnost tkivnog faktora kao i von Willebrandovog faktora koristeći kao kofaktore druge plazmatske proteine (Tabela 2).

β 2GPI obavlja funkciju prirodnog antikoagulansa preko vezivanja ovog proteina za endotelne ćelije, trombocite i heparin sa kojima se nalazi u prirodnoj vezi. Funkcija β 2GPI kao prirodnog antikoagulansa se direkto inhibira kada se aKL vežu za njega. Oksidovani β 2GPI može da se veže i za dendritičnu ćeliju pa posebnim receptorima čak da poveća produkciju autoantitela^{21,119}.

Aneksin V (Anx 5) je protein sa snažnim antikoagulantnim delovanjem koje nastaje kao posledica njegovog visokog afiniteta za anjonske fosfolipide na čijoj površini stvara kristalni štit koji zaustavlja koagulaciju (od fosfolipida zavisan proces koagulacije). AnxA5 je u visokoj meri eksprimiran na apikalnim membranama horionskih čupica. Utvrđeno je da je kod pacijentkinja sa AFS na apikalnim membranama horionskih čupica ovaj protein eksprimiran u znatno manjoj meri, a takođe ga ima u manjoj količini i na normalnim čupicama koje su izložene antifosfolipidnim antitelima. Verovatni mehanizam nastanka tromboze i posledičnog gubitka ploda u AFS je antifosfolipidnim antitelima posredovano cepanje AnxA5 i blokiranje njegove antikoagulantne funkcije. Pored ovog mehanizma do neželjenog ishoda trudnoće u AFS mogu dovesti i drugi patofiziološki mehanizmi, kao što su antifosfolipidnim antitelima posredovana aktivacija komplementa, dejstvo aFL na funkciju trombocita, aktivaciju endotela, apoptozu, protein C i protein S i endotelni protein C receptor, sintezu prostaglandina, funkciju proteina Z i dr¹²⁰.

Bitne su i interrekcije aFL sa trombocitima tako što povećanju stepen agregacije i aktivacije trombocita¹²¹. Takođe, aFL inhibiraju aktivnost antitrombina i inhibiraju fibrinolizu¹²². Smatra se da aFL mogu ometati fagocitozu ćelija u poslednjoj fazi apoptoze pošto u ovoj fazi fagociti (uglavnom makrofazi) vrše fagocitozu, prepoznajući, pre svega, fosfolipide apoptotičnih ćelija (fosfatidilserin). Najverovatnije se β 2GPI vezuje za fosfatidilserinski ostatak na membrani apoptotične ćelije¹²³.

Tabela 2. Mogući mehanizmi aFL posredovane tromboze^{124,125}

| |
|---|
| <p>Efekti aFL na koagulacioni sistem</p> <ul style="list-style-type: none"> - Interferencija sa komponentama unutrašnjeg puta koagulacije <ul style="list-style-type: none"> - inhibicija aktivnosti faktora XI - deficijencija ili inaktivacija faktora XII - Inhibicija antitrombinske aktivnosti - Interferencija sa putem proteina C <ul style="list-style-type: none"> - kompeticija sa antikoagulantnim putem aktiviranog proteina C na fosfolipidnoj površini - prekid interakcija unutar puta kompleksa aktiviranog proteina C - stečeni nedostatak proteina S - interferencija sa putem trombomodulin-protein S- protein C - vezivanje za aktivirane kofaktore Va i VIIIa što dovodi do poremećaja proteolize - antitela usmerena na endotelni receptor proteina C - Povećano stvaranja trombina - Neutralizacija inhibitora aktiviranog faktora X i puta tkivnog faktora - Podsticanje tkivnog faktora i inhibitora puta tkivnog faktora - Povećanje količine von Willebrand faktora - Inhibicija β2GPI antikoagulantne aktivnosti |
| <p>Efekti aFL na ćelije</p> <ul style="list-style-type: none"> - Prokoagulantni efekat na trombocite preko receptora za ApoER2 i GPIIbα - Ekspresija tkivnog faktora i proinflamatornih citokina od strane monocita - Prekid antitrombotskog štita AnxA2 na vaskularnim ćelijama - Inhibicija produkcije prostaciklina od strane endotelnih ćelija - Aktivacija endotela oksidativnim reakcijama - Poremećaj funkcije endotelne sintetaze azot monoksida (eNOS) |
| <p>Ostali efekti aFL</p> <ul style="list-style-type: none"> - Aktivacija komplemena - Disfunkcija ADAMTS3 |

1.7. DODATNI FAKTORI RIZIKA ZA NASTANAK TROMBOZE

Činjenica da 12% starije i 2% mlađe populacije ima pozitivna aFL, ali bez ispoljenih tromboembolijskih implikacija, govori u prilog tome da aFL nisu jedino odgovorni za nastanak tromboze, već da su mogući faktor rizik u njenom nastanku^{36,54}. Zbog toga bi trebalo uzeti u obzir i dodatne „*second hit*“ faktore. Od promenljivih faktora rizika od značaja su tradicionalni kardiovaskularni faktori rizika (npr. hipertenzija, dijabetes, proaterogeni lipidni profil, gojaznost, rana menopauza kao i stečeni okidači tromboze (npr. pušenje, oralne kontraceptive, trudnoću, imobilizaciju, hirušku intervenciju). Od nepromenljivih faktora to su starost i genetska hiperkoagulabilna stanja (npr. nedostatak proteina C i S, mutacija FV Leiden, mutacija gena za protrombin 20210). Kao primer se navodi RATIO (Rizik arterijske tromboze u odnosu na oralne kontraceptive) studija, gde je kod žena mlađih od 50 godina pokazano da je rizik za moždani udar dva puta veći kod LA pozitivnih žena pušača u odnosu na nepušače; a da je rizik za one koji koriste oralne kontraceptive veći i od 7 puta¹²⁷.

Postojeća autoimuna sistemska bolest takođe može da poveća rizik od tromboze, a primer su pacijenti sa SEL kod kojih je uočena viša incidenca vaskularnih događaja koja se ne može objasniti tradicionalnim faktorima rizika. Visoka pevalenca aFL u SEL dodatno proporcionalno povećava rizik za trombozu¹²⁸. Inflamacija kod bolesnika sa sistemskim autoimunim događajima može da dovede do promene fenotipa¹²⁹ pojačavajući efekat aFL, bez obzira na vrstu osnovnog oboljenja.

Posebna genetska predispozicija za AFS i produkciju aFL su razmatrani kod osoba sa HLA antigenima DR¹³⁰ i DQ, kao i kod registrovanog polimorfizama gena za β_2 GPI, kod varijacija gena koji kodiraju trombocitne glikoproteine, signalne puteve proinflamatornih medijatora i delove imunog sistema (IgA i komplement¹³¹).

Od urođenih trombofilnih stanja dostupnim dijagnostičkim metodama najčešće se otkrivaju nedostatak proteina C i S, mutacija FV Leiden, mutacija gena za protrombin 20210. One se dovode u vezu sa sklonošću ka nastanku, uglavnom, venskih tromboza i generalno ne povećavaju rizik od arterijskih tromboza, mada mogu da

modulišu uticaj drugih faktora rizika. Iako su Faktor V Leiden (prevalenca 3-7%) i mutacija protrombina 20210 (prevalenca 1-3%) mutacije sa najvećom prevalencom, one povećavaju rizik za prvi venski trombotični događaj za oko 5 puta a skoro da nemaju uticaja za nastanak rekurentne tromboze¹³². Rezistencija FVa na APC nalazi se kod 20-40% bolesnika sa venskom trombozom, dok učestalost u opštoj populaciji iznosi 4-5%^{133,134}. Relativno retke trombofilije su nedostatak antitrombina (prevalenca 0,02% opšte populacije, 2-4% u bolesnika sa VTE), proteina C (prevalenca 0,03%) i proteina S (prevalenca nepoznata, u VTE oko 3%), ali njihovo prisustvo povećava rizik za venski tromboembolizam oko 10 puta, a rizik za ponovljenu trombozu oko 2 puta¹³⁵. Mutacija MTHFR je relativno česta mutacija (30-40% heterozigota, oko 15% homozigota), međutim nije dokazan njen jasan uticaj u nastanku tromboze osim ako nema i jasno dokazane hiperhomocistinemije kada povećava rizik za trombozu 2-4 puta.

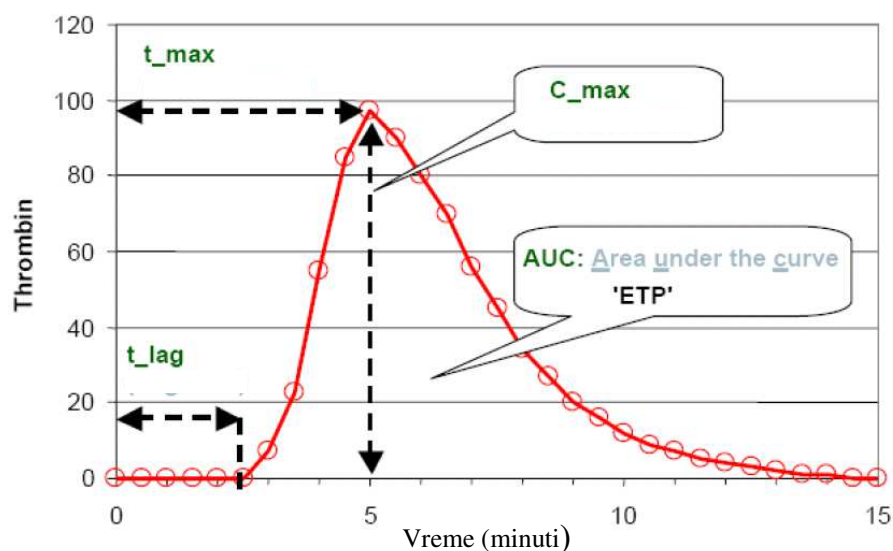
1.8. LABORATORIJSKI TESTOVI U DOKAZIVANJU HIPERKOAGULABILNOG STANJA

Normalna hemostaza je dinamička ravnoteža između prokoagulantnih i antikoagulantnih komponenti. Bilo bi idealno da postoji laboratorijski test koji bi u svakom trenutku mogao da pokaže gde je ta ravnoteža ali za sada ne postoji idealna laboratorijska metoda koja bi merila hemostatski potencijal mogućeg nastanka tromboze ili krvarenja.

U savremenim uslovima, na raspolaganju su merenja na nivou adhezije, agregacije, koagulacije i fibrinolize ali ne postoji test koji bi objedinio čitav proces. Na nivou određivanja koagulacionog kapaciteta se nalazi endogeni trombin potencijal. Međutim, postoji fundamentalna razlika između merenja koagulacionog kapaciteta u stvaranju trombina u *in vitro* uslovima u epruveti prema procesu koji se obavlja u *in vivo* uslovima. Merenje kapaciteta stvaranja trombina u epruveti je odgovor na prethodno određen aktivacioni stimulus i on kvantitativno pokazuje potencijal za

stvaranje trombina kod te osobe i, verovatno, sklonost ka razvoju spontane ili provocirane tromboze. U *in vivo* uslovima merenje generacije trombina se zasniva na npr. fibrin degradacionim produktima kao što je d dimer, peptidima aktivacije kao što je protrombinski fragment 1+2 ili kompleksima enzim-inhibitor kao trombin-antitrombin, ali je njihova zajednička osobina da zavise i od drugih faktora osim generacije trombina, kao što je vreme klirensa ili fibrinolitička aktivnost¹³⁶.

Merenje endogenog trombinskog potencijala (ETP) je atraktivna metoda koja dobija na značaju poslednjih godina¹³⁷. Iako metodi nedostaje standardizacija¹³⁸ korišćen je kao test kod različitih grupa pacijenata. Obzirom na rizik nastanka tromboze primenjivan je kao test za predikciju rekurentnog venskog tromboemolizma^{139,140}, prve tromboze¹⁴¹, kako skrining za nasledne trombofilije^{142,143}, tako i u dijagnozi AFS^{144,145}. Softverski program omogućava dobijanje parametara *t_{lag}* (vreme od momenta dobijanja signala do više od 2 SD od horizontalne linije), *C_{max}* (visina maksimalne generacije trombina), *t_{max}* (vreme do maksimalne generacije trombina) i *area under the curve* (AUC, površina ispod krive), što je prikazano na Slici 4.



Slika 4: Parametri dobijeni merenjem endogenog trombinskog potencijala, ETP¹³⁷

Dokazano je da produženje *t_{lag}* i sniženje *C_{max}* korelira sa pozitivnim LA^{144,145}. Povezanost β_2 GPI i aKL sa produženjem *t_{lag}*/smanjenom generacijom trombina je kontraverzna^{146,147}. U studijama o AFS, efekat generacije trombina uglavnom je pripisivan β_2 GPI antitelima mada su Ninnivaggi i sar.¹⁴⁷ pokazali da je preinkubacija sa

fosfolipidima potrebna kako bi došlo do konformacionih promena β_2 GPI i uticaja na generaciju trombina. Ove razlike najverovatnije su posledica različitih testova za aFL kao i LA aktivnosti koja ne zavisi od β_2 GPI. Urođena mutacija FV Leiden ne menja ETP. Međutim, pokazano je da kod pacijenata sa AFS, stečena rezistencija na aktivirani protein C (kao mogući razlog tromboze) može da se detektuje ovim testom^{148,149}. Takođe, kod pacijenata sa SEL metoda ETP može da bude dobar pokazatelj hiperkoagulabilnog stanja^{150,151}.

Aktivirana koagulacija vodi u reaktivnu fibrinolizu. FDP i D-dimer su proizvodi sekundarne, reaktivne hiperfibrinolize i ukazuju na stanje hiperkoagulabilnosti. Kao što je poznato, D-dimer nije specifični marker tromboze. D-dimer služi kao pomoćni test u dijagnostičkom protokolu za isključivanje VTE jer ima negativnu prediktivnu vrednost^{152,153}. D-dimer je test niske specifičnosti i visoke osetljivosti. Povišene vrednosti ne moraju ukazivati na VTE dok negativne vrednosti mogu da isključe njeno postojanje. Koncentracija D-dimera u plazmi zavisi od dinamike fibrinolize i klirensa (uklanjanja) D-dimera iz cirkulacije.

Metode za određivanje D-dimera koriste monoklonska antitela koja se specifično vezuju za epitop na D-dimeru kao ELISA metoda i VIDAS –mikroelisa sa fluorescentno obeleženim enzimom, dok se od ostalih testova ređe koriste lateks aglutinacija, imunoturbidimetrijske metode i imunofiltracija.

1.9. TERAPIJA ANTIFOSFOLIPIDNOG SINDROMA

Tromboza je među najtežim manifestacijama AFS što zavisi od vrste i veličine pogođenog krvnog suda. Korektno lečenje trombotske komplikacije direktno utiče na njen ishod i posledice. Idealan pristup bi se zasnivao na prevenciji, tj da osobe sa pozitivnim aFL ne razviju sliku AFS i da tok njihove bolesti ostane asimptomatski. Nažalost, često se desi da je trombotska klinička manifestacija prva, i da bude razlog testiranja i utvrđivanja pozitivnosti aFL. Pristup terapiji je i dalje tema debata i zavisi

od vrste krvnog suda gde je došlo do tromboze (arterijska/venska), profila pozitivnih aFL, prisutnih drugih faktora rizika (starost, standardni kardiovaskularni faktori, korbidity) i prisustva/odsustva druge autoimune bolesti (PAFS/SAFS).

Terapija izbora u primarnoj prevenciji, dakle kod bolesnika s pozitivnim aFL (naročito visokorizičnim profilom) bez prethodnih trombotskih događaja, jesu niske doze (1 mg/kg) acetilsalicilne kiseline (ASA)¹⁵⁴. Osim dejstva na enzim ciklooksigenazu kojim se podstiče ravnoteža zaštitnog prostaciklina (koji uzrokuje vazodilataciju i inhibiciju agregacije trombocita) i štetnog tromboksana A2 (koji uzrokuje vazokonstrikciju i potiče agregaciju trombocita), ASA smanjuje stepen spontane aktivacije trombocita i ograničava vezivanje aFL za njihovu površinu, ali isto tako pojačava stvaranje interleukina 3, čime posredno stimuliše trombocitopoezu, a ovaj mehanizam dodatno pridonosi normalizaciji broja trombocita¹⁵⁵. Za razliku od primarne prevencije, primena acetilsalicilne kiseline je nedovoljna u sekundarnoj prevenciji arterijskih tromboembolija kod bolesnika s AFS¹⁵⁶.

U sekundarnoj prevenciji, dakle kod bolesnika s pozitivnim aFL i prethodnim trombotskim događajem, prihvaćen je stav da bolesnici s primarnim ili sekundarnim AFS zahtevaju trajno, po pravilu doživotno, antikoagulantno liječenje. Ovaj stav proizlazi iz opažanja da su mnogi bolesnici s AFS nakon prekida antikoagulantnog lečenja doživeli ponovljene tromboze. Ponekad se recidivi tromboza javljaju i tokom naizgled primerenog antikoagulantnog lečenja s održavanjem vrednosti INR u rasponu od 2 do 3¹⁵⁷. Primena dugotrajne antikoagulantne terapije zavisi od ravnoteže rizika tromboze i krvarenja. Godišnja prijavljena incidenca krvarenja kod pacijenata na varfarinu u opsegu INR vrednosti od 2-3 je između 1,1% i 2,3%, mada se smatra da je i veća. Rizik fatalnog krvarenja je 0,25%¹⁵⁸.

Zbog toga je vrlo često odluka o dužini i intenzitetu antikoagulantne terapije individualna i bazira se na aFL profilu i vrsti tromboze. Tako se kod manje rizičnih pacijenta (nizak rizik aFL profila u smislu izolovane intermitentne aKL ili β 2GPI pozitivnosti u niskom/srednjem titru) savetuje kraća i niža antikoagulacija¹¹⁵. Npr., kod pacijenata sa primarnim AFS sa embolijskim cerebralnim vaskularnim događajem u

arterijskom koritu (koji nije kardiološkog porekla), sa aFL profilom niskog rizika i prisustvom reverzibilnih faktora rizika savetuje se dugotrajna sekundarna profilaksa sa antiagregacionim lekom umesto antikoagulantne terapije. Ako je reč o prvom venskom vaskularnom događaju, pacijentu sa aFL profilom niskog rizika i poznatim prolaznim faktorom rizika savetuje se antikoagulacija od 3-6 meseci umesto doživotne terapije.

Lečenje varfarinom ima ograničenja u smislu interrekcija sa nekim vrstama namirnica bogatim vitaminom K, kontrolama INR-a (različit rezultat zavisno od tromboplastinskog reagensa u prisustvu LA) kao i određivanja LA zbog produžavanja fosfolipid-zavisnog vremena zgrušavanja. Zbog toga na značaju dobijaju novi antikoagulansi (NOAK), direktni inhibitori trombina (dabigatran) i antiXa (rivaroxaban, apixaban, endoxaban), koji nemaju ograničenja kao varfarin. Međutim, nema završenih kliničkih studija i primeni NOAK kod AFS pacijenata. U toku su RAPS i TRAPS (u kojoj kao centar učestvuje i KBC “Bežanijska kosa”) studija čiji se pozitivni rezultati očekuju.

Kao dodatni agens u profilaksi tromboza važno mesto ima i hidroksihlorohin zbog svog dokazanog antiinflamatornog, imunomodulatornog i metaboličkog efekta (snižava lipide i glikemiju). Svoje mesto u prevenciji tromboze je dokazao kod pacijenata sa SEL, kod kojih je manja prevalenca tromboza ukoliko su i na terapiji ovim lekom^{159,160}. Zatim, je još pre 20 godina na modelu miša dokazano da smanjuje veličinu i vreme prisustva aKL indukovano tromba¹⁶¹, a zatim i da smanjuje aFL indukovanu aktivaciju trombocita¹⁶² pri čemu su oba efekta bila dozno zavisna. Dokazana je njegova uloga u primarnoj prevenciji tromboza kod SEL pacijenata sa ili bez aFL, u primarnoj prevenciji aFL pozitivnih osoba kao i u sekundarnoj prevenciji tromboze aFS pacijenata¹⁶³.

Statini su inhibitori sinteze holesterola a svoju ulogu u AFS imaju zbog antiinflamatornog, imunomodulatornog i antritrombotskog efekta. Za fluvastatin je dokazano da inhibira aFL posredovanu ekspresiju tkivnog faktora na monocitima i endotelnim ćelijama¹⁶⁴, kao i da statini uopšte preveniraju povećanu adhezivnost endotelnih ćelija indukovanu β 2GPI¹⁶⁵ antitelima. Trenutno nema aktivnih studija koje

istražuju direktan efekat statina na AFS pacijente. Po preporukama lečenja AFS pacijenata statini imaju svoje mesto u lečenju AFS pacijenata sa hiperlipidemijom i ponavljajućim trombozama uprkos adekvatnoj antikoagulaciji kao i u perioperativnoj pripremi visokorizičnih AFS pacijenata¹⁶³.

Rituksimab, monoklonsko anti CD20 antitelo, snižava aFL koncentracije pa je našlo svoje mesto u lečenju AFS pacijenata sa refraktarnim citopenijama i rekurentnim trombozama uprkos standardnoj terapiji¹⁶⁶. U toku je ispitivanje efekta lekova koji blokiraju komplement i peptidnih blokatora različitih domena β 2GPI.

Pored gore navedenih medikamenata, neophodno je svim pacijentima savetovati kontrolu dodatnih faktora rizika.

II CILJEVI ISTRAŽIVANJA

- ✓ Da se odredi da li kod pacijenata sa AFS postoji disfunkcija endotela
- ✓ Da se analizira da li postoji povezanost učestalosti i vrste tromboza sa disfunkcijom endotela kod bolesnika sa primarnim i sekundarnim AFS i izvrši uporedna analiza rezultata između ovih grupa
- ✓ Da se ispita da li su oksidativni stres i inflamacija okidači disfunkcije endotela kod pacijenata sa primarnim i sekundarnim AFS
- ✓ Da se odredi povezanost između vrste i titra aFL sa parametrima oksidativnog stresa, inflamacije i endotelne funkcije kod ispitivanih grupa
- ✓ Da se ustanovi da li postoji povezanost parametara oksidativnog stresa, inflamacije i endotelne disfunkcije kao mogućih „okidača“ tromboze sa laboratorijskim testovima tromboznog stanja kod bolesnika sa primarnim i sekundarnim AFS

III MATERIJAL I METODE

3.1. Ispitivana grupa

Studija je obuhvatila ukupno 140 bolesnika sa AFS i 40 ispitanika u kontrolnoj grupi i to:

- Grupa 1: 90 ispitanika sa PAFS (prosečne starosti $43,78 \pm 12,77$);
- Grupa 2: 50 ispitanika sa sekundarnim AFS u sklopu SEL (prosečne starosti $41,18 \pm 12,29$);
- Grupa 3: 40 zdravih osoba kao kontrolna grupa bez prethodnih trombotskih događaja i sa negativnim aFL u serološkim ispitivanjima komparabilna prema starosti i polu (prosečne starosti $44,9 \pm 10,18$).

Ukupno je bilo 85% osoba ženskog pola i 15% osoba muškog pola.

Ovo je studija preseka u koju su prospektivno uključivani ispitanici u periodu 2012.-2015. godine u KBC "Bežanijska kosa". Selekcija bolesnika sa AFS je izvršena od strane reumatologa KBC "Bežanijska kosa". Dijagnoza AFS-a je postavljena u skladu sa revidiranim Sidnejskim kriterijumima (laboratorijskim i kliničkim) iz 2006.godine¹⁹. Klinički kriterijum o prethodnoj akušerskoj anamnezi je potvrđen iz medicinske dokumentacije, dok je trombotični događaj dokazivan dijagnostičkom metodom u zavisnosti od lokalizacije (dopler ultrazvuk za DVT, kompjuterizovana tomografija za emboliju pluća, ultrazvuk srca i dr). Dijagnoza sistemskog eritemskog lupusa u okviru kojeg se analizira postojanje sekundarnog AFS, postavljena je od strane reumatologa prema revidiranim ARA (American College of Rheumatology) kriterijumima^{56,167}, a aktivnost bolesti je u momentu uključivanja u studiju procenjena na osnovu SLEDAI skora (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index)¹⁶⁸. Svi pacijenti su bili na adekvatnoj terapiji u skladu sa aktivnošću bolesti.

Broj ispitanika po grupama određen je na osnovu nasumično očekivanog broja osoba sa dijagnozama od interesa koji se u 3-godišnjem periodu javljaju na pregled u KBC “Bežanijska kosa”.

Kriterijumi za uključivanje u studiju:

- Bolesnici sa dokazanim primarnim AFS-om
- Bolesnici sa dokazanim AFS-om i SEL
- Stabilno stanje osnovne bolesti

Kriterijumi za isključivanje iz studije:

- Ispitanici sa primarnim ili sekundarnim AFS koji ne potpišu informisani pristanak, odnosno odbiju učešće u studiji.
- Ispitanici koji imaju akutnu infekciju, bilo koje maligno oboljenje, značajni poremećaj bubrežne i jetrine funkcije
- Trudnoća

Ispitivanje je odobreno od strane lokalnog Etičkog komiteta i Naučnog odbora KBC “Bežanijska kosa”, i ispunjava etičke kriterijume Helsinške deklaracije deklaracije (Edinburgh, 2000) sa amandmanima.

3.2. Laboratorijske analize

Sve analize su rađene u laboratoriji KBC “Bežanijska kosa”.

Uzorak krvi za laboratorijske analize uzimana je posle 12-časovnog noćnog gladovanja.

Na dan uzimanja rađeni su sledeći parametri:

- kompletna krvna slika (osmodiferencijalna leukocitarna formula; Pentradx 120; ABX Horiba)
- biohemijski parametri kako bi se isključio poremećaj funkcije jetre, bubrega i aktivna hemoliza (bilirubin direktan i indirektan, transaminaze, urea, kreatinin,

laktat dehidrogenaza, ukupni proteini, mokraćna kiselina) automatizovanim standardnim laboratorijskim metodama (COBAS 511c, Roshe).

- lipidni status (ukupni holesterol, *high-density* lipoprotein (HDL) holesterol, *low-density* lipoprotein (LDL) holesterol, trigliceridi) kao i aterogeni indeksi: faktor rizika ateroskleroze iz odnosa ukupnog holesterola i HDL holesterola i indeks ateroskleroze kao odnos LDL i HDL holesterola. Normalne vrednosti lipida i navedenih aterogenih indeksa usklađene su sa važećim preporukama¹⁶⁹. Lipidi su određivani rutinskim metodama (Olympus System Reagensi na uređaju Olympus AU 2700, Hamburg, Nemačka).

Za ostale analize uzorci su centrifugirani i u odgovarajuće plastične epruvete izdvojeni i čuvani na temperaturi od -80C.

- ultrasenzitivni hsCRP (imunoturbidimetrijska metoda, Cobas 511c, Roshe) i interpretiran kao kontinuirana varijabla i kao nisko (<1mg/L), prosečno (1-3mg/L) i visokorizična (>3mg/L)
- d dimer (enzimski imunotest; VIDAS; BioMerieux) i endogeni trombinski potencijal (ETP-koagulometrijska metoda; BCS Xp; Siemens)
- asimetrični dimetilarginin (ADMA) ELISA metodom (proizvođač Cusabio). Ova analiza je rađena u laboratoriji Kliničkog centra Srbije.

3.2.1. Određivanje markera oksidativnog stresa

Analize su rađene u laboratoriji KCS.

- Lipidni hidroperoksidi (LOOH)

Nivo LOOH u uzorcima određivan je primenom modifikacije metode koju je izvorno prezentovao Craig A. Gay¹⁷⁰, a modifikaciju metode opisala je A. Jurek. Princip metode se zasniva na oksidaciji Fe^{2+} u kiseloj sredini do Fe^{3+} u prisistvu LOOH iz uzorka. Stvoreni Fe^{3+} formira kompleks sa bojom ksilenol-oranž (o-krezosulfonftalein-3,3'-bismetilimino-bisirčetna kiselina). Intenzitet boje meri se bihromatski na 540 nm na kojoj apsorbuju uzorak i eventualno prisutni interferenti i na 670 nm gde apsorbuju

samo interferirajuće supstance, čime se anulira njihov uticaj. Analiza se izvodi uz proces deproteinizacije sa perhlornom kiselinom.

- Produkti uznapredovale oksidacije proteina (AOPP)

Za određivanje AOPP kao markera oksidativnog stresa korišćena je metoda koju su postavili Witko-Sarsat i saradnici¹⁷¹. Uzorak se razblažuje fosfatnim puferom (pH=7,4). Dodavanjem sirćetne kiseline u razblažen serum i rastvora kalijum-jodida (1,16 M) dolazi do promene apsorbancije koja se meri na 340 nm. Koncentracija AOPP se izražava preko ekvivalenta hloramina T koji se koristi za izradu standardne krive u koncentracijama 10-100 $\mu\text{mol/L}$, pri čemu njegoa apsorbancija linearno raste sa porastom koncentracije.

- Sadržaj sulfhidrilnih grupa (SH)

Ukupni sadržaj SH u plazmi se određuje Ellman-ovom metodom¹⁷². Metoda za određivanje tiol grupa se zasniva na reakciji 2,2'-dinitro-5,5'-ditio-benzojeve kiseline (DTNB) sa alifatičnim tiolnim jedinjenjima u baznoj sredini (pH 9.0), pri čemu se stvara jedan mol p-nitrofenol anjona po jednom molu tiola, čije je merenje apsorbancije je moguće na 412 nm. Apsorbancija se čita posle 25 minuta i koncentracija ukupnog sadržaja SH grupa se računa na osnovu standardne krive korišćenjem vodenog rastvora redukovano glutationa (GSH) kao standarda. Od koncentrovanog standarda (1 mmol/L) redukovano glutationa su napravljena razblaženja nižih koncentracija koji pokrivaju opseg vrednosti od 0,1 mmol/L do 1 mmol/L.

- Aktivnost paraoksonaze 1 (PON1)

PON1 status određivan je prema metodi Richtera i Furlonga¹⁷³. Određivanje paraoksonazne aktivnosti se zasniva na delovanju PON1 enzima iz seruma na supstrat paraokson, pri čemu dolazi do konverzije paraoksona do p-nitrofenola a brzina te promene se prati kinetički na 405 nm, gde je karakteristični apsorpcioni maksimum za p-nitrofenol koji se u u baznoj sredini nalazi u obliku p-nitrofenoksidnog anjona. Promena aktivnosti se prati u toku tri minuta i računa se promena apsorbancije po minuti. Za određivanje POazne aktivnosti serum se razblažuje diluent puferom u odnosu 1:10.

3.2.2. Određivanje antifosfolipidnih antitela (aFL)

Detekcija LA se izvodi prema revidiranim kriterijumima od strane ISHT⁴⁷. Lupus antikoagulans (LA) je detektovan koagulacionim testovima u kojima LA antitela produžavaju koagulaciono vreme zavisno od fosfolipida. Kao skrining test korišćen je DRVVT. Izvodi se u dva koraka: preliminarni LA1 (LA screen) i potvrdni LA2 (LA confirm). U preliminarnom LA1 testu ispitivanom serumu se dodaje reagens koji je siromašan fosfolipidima i u tim uslovima aFL se vezuju za fosfolipide i proteine odgovorne za koagulaciju, tako da je vreme koagulacije produženo u odnosu na normalni kontrolni serum. Ako je ovo vreme produženo za više od 20% u odnosu na kontrolu prelazi se na drugi korak tokom kojeg se izvodi potvrdni LA2 test. U ovom testu se koristi reagens bogat heksagonalnim fosfolipidima koji se prethodno dodaje ispitivanom serumu, tako da se neutrališu prisutna aFL i time omogućuje normalizaciju koagulacionog procesa, odnosno, skraćuje koagulaciono vreme. Klinički značajnim smatra se odnos preliminarni LA1/potvrdni LA2 veći od 1,2.

Antikariolipinska (aKL: IgG/IgM) i β 2glikoprotein I (β 2GPI: IgG/IgM) su određivana ELISA (proizvođač *Binding site*) metodom i izražena kao G fosfolipidne (GPL) ili M fosfolipidne (MPL) jedinice (GPU-U i MPL-U). Titar je izražavan kao nizak (11-40U/ml), srednji (41-99U/ml) i visok >100 U/ml)¹⁹.

Svi AFS pacijenti su klasifikovani u sledeće grupe prema profilu pozitivnih aFL³³:

- a) **I** - kada je prisutno više od jednog laboratorijskog kriterijuma u bilo kojoj kombinaciji,
- b) **IIa** - kada je prisutan samo LA,
- c) **IIb** - kada su prisutna samo antikardiolipinska antitela (aKL), i
- d) **IIc** - kada su prisutna samo anti- β 2 glycoprotein-I antitela (anti- β 2GPI)³³.

Formirana je i posebna kategorija pacijenata sa trostrukom pozitivnošću aFL zbog njihovog potvrđenog kliničkog značaja iz podataka u literaturi.

Antinuklearna antitela su određivana metodom indirektno imunofluorescencije na supstratu mišje jetre i Hep-2 supstratu. Antitela na dvolančanu zavojnicu DNK (anti dsDNA) su određivana ELISA metodom (proizvođač *Binding site*).

3.3. Ispitivanje urođene trombofilije

Rezistencija na aktivirani protein C, protein C i protein S su određivani u citratnoj plazmi, koagulometrijskom metodom. Referentni interval normalnih vrednosti za protein C iznosio je 70%–130%, za protein S 60%–140%, i za rezistenciju za aktivirani protein C >2,1.

Mutacije FII20210, FV Leiden i MTHFR su određivane PCR metodom van naše ustanove, po izboru pacijenta.

3.4. Ispitivanje endotelne funkcije

Pokazatelji endotel-zavisne i endotel-nezavisne vazodilatacije su vazodilatacija brahijalne arterije indukovana protokom (*flow mediated dilatation*, FMD) i nitroglicerinom uzrokovana vazodilatacija (*nitroglycerine-mediated dilatation*, NMD). Procedura je vršena prema metodi koju su originalno opisali Celermajer i sar^{174,175}. Metoda je obavljana između 13 i 15h. Ispitanici nisu uzimali hranu najmanje 4 sata pre merenja i nisu konumirali alkohol. Takođe je savetovano da u najmanje prethodna 24 sata ne konzumiraju hranu bogatu nitratima (korenasto povrće, salata, spanać, kupus kao i maline, višnje, jagode) ili pića koja sadrže kofein. Ispitanici su postavljani u ležeći položaj u mirnoj prostoriji oko 10min pre pristupanju merenju. Dijametar brahijalne arterije je meren 2D ultrazvučnom metodom na aparatu Agilent Image Point HX. Slika je dobijana merenjem na 2 do 15 cm iznad kubitalne jame koja se poklapa sa R zupcem na elektrokardiogramu. Kako bi se dobio stimulus protoka u brahijalnoj arteriji, poveska za merenje krvnog pritiska se stavi na nadlakticu i naduva za najmanje 50mmHg iznad sistolnog pritiska. Arterija se okludirala tokom 5 minuta. Drugo merenje je obavljano 60 do 80 sekundi nakon otpuštanja poveske kako bi se izmerila vazodilatacija brahijalne arterije uzrokovana protokom (FMD). Za svako merenje, uzimana je srednja vrednost od najmanje tri puta određivanja (u odnosu na srčani ciklus R zupca). FMD je računat kao procenat promene dijametra u odnosu na početni dijametar određen u miru.

Prosečni očekivani odgovor, prema literaturnim podacima, je porast dijametra brahijalne arterije za više od 20%. Redukovani ili odsutan odgovor ukazuje na

prisustvo endotelne disfunkcije tj. endotel zavisne ili protokom uzrokovane vazodilatacije. Ispitanici u ovoj studiji su podeljeni u dve grupe, zavisno da li je FMD manji ili veći od 10%.

Nakon deset minuta, ponovo je određivan dijametar brahijalne arterije kao početni. Potom je metod ponavljan na istovetan način ali nakon aplikacije lingvaletе nitroglicerina. Na taj način se određuje endotel-nezavisna tj. nitroglicerinom indukovana vazodilatacija (NMD) a kao *cut off* vrednost disfunkcije korišćena je vrednost od 10%.

3.5. Tradicionalni faktori rizika

Uvidom u medicinsku dokumentaciju o svakom pacijentu dobijeni su podaci o hipertenziji, gojaznosti, navici pušenja cigareta i šećernoj bolesti.

Hipertenzija je definisana kao sistolni krvni pritisak veći od 140 mmHg i/ili dijastolni krvni pritisak veći od 90mmHg zabeležen na dva ili više uzastopnih merenja, a pre započinjanja antihipertenzivne terapije.

Navika pušenja cigareta je definisana kao navika konzumiranja cigareta svakodnevno, povremeno konzumiranje cigareta i prestanak pušenja pre perioda koji nije kraći od godinu dana.

Svakom ispitaniku je određen indeks telesne mase (engl. *body mass index* - BMI) prema formuli Adolphe Queteleta (visina/težina^2). Normalna vrednost BMI je bila ispod 26 kg/m^2 , na prekomernu telesnu težinu je ukazivala vrednost BMI 26-30 kg/m^2 a ukoliko je BMI iznosio iznad 30 kg/m^2 bolesnici su smatrani gojaznim.

Diabetes mellitus je dijagnostikovao od strane endokrinologa¹⁷⁶.

3.6. Statistička obrada

Statistička analiza je obavljena SPSS paketom (*StatisticalPackage for SocialScience, version 20*). Upotrebljena je metoda analize podataka po principima deskriptivne i analitičke statistike. Osnovne karakteristike ispitanika sa vrstom (arterijska ili venska) i lokalizacijom tromboze analizirane su metodama deskriptivne statistike. Procenat i

učestalost zabeleženih trombotičnih događaja u grupi bolesnika sa primarnim i sekundarnim AFS upoređene su hi kvadrat ili Fišerovim testom tačne verovatnoće. Za proveru normalnosti raspodele podataka korišćen je Kolmogorov Smirnov test. Za ispitivanje razlika biohemijskih markera između grupa ispitanika sa primarnim i sekundarnim AFS korišćen je Studentov t-test (za normalno distribuirane parametre) i Mann-Whitney U test (kao analogni neparametarski metod). Za ispitivanje razlike biohemijskih parametara (zapaljenja, oksidativnog stresa i trombofilnog stanja) u odnosu na klinički test endotelne disfunkcije primenjena je jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA). Varijable koje su se našle statistički značajnim u univarijantnoj analizi korišćene su za multivarijantnu logističku regresionu analizu. ROC analiza (*receiver operating characteristic curve*) primenjena je u evaluaciji značaja hsCRP, LOOH, PON, AOPP za trombozu.

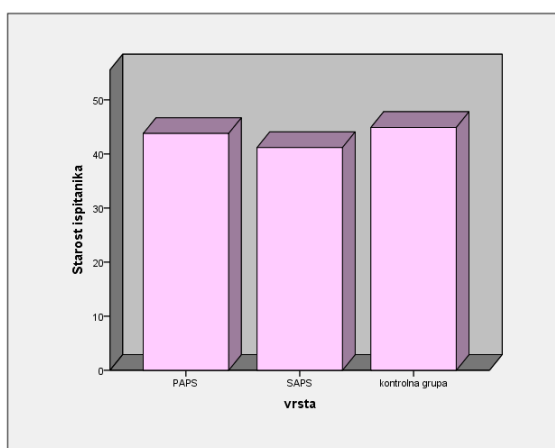
Značajnost razlika je procenjivana na osnovu p vrednosti ($p < 0,05$).

IV REZULTATI

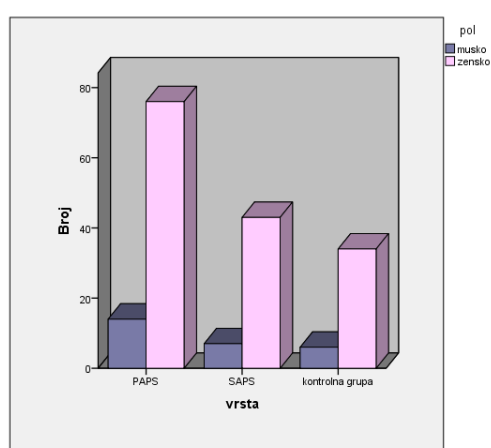
4.1. UPOREDNA ANALIZA OPŠTIH OSOBINA ISPITIVANIH GRUPA

Pacijenti su uključivani u studiju tokom perioda 2012.-2015. godine u KBC “Bežanijska kosa”, po prethodno definisanim kriterijumima za ulazak u studiju.

Bilo je ukupno 140 bolesnika sa AFS (90 sa PAFS i 50 sa SAFS) kao i 40 ispitanika u kontrolnoj grupi bez statistički značajne razlike po starosti i polu učesnika (Grafikon 1 i 2).



Grafikon 1: Distribucija bolesnika i ispitanika kontrolne grupe prema starosti (p=0,970)



Grafikon 2: Distribucija bolesnika i ispitanika kontrolne grupe prema polu (p=0,293)

Prosečna dužina trajanja osnovne bolesti u vreme uključivanja ispitanika je za PAFS grupu iznosila $4,68 \pm 2,89$ (min 1, max 12) godine a u SAFS grupi $5,56 \pm 2,91$ (min 1, max 15) (p=0,09). Prosečan SLEDAI skor za pacijente sa SLE iznosio je $4,26 \pm 7,41$.

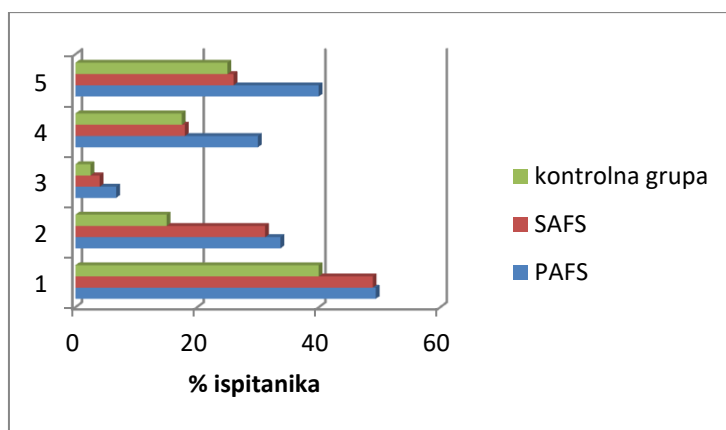
Zastupljenost tradicionalnih faktora rizika kod ispitivanih grupa prikazane su u Tabeli 1.

Tabela 1: Demografske karakteristike i prisustvo aterosklerotskih faktora rizika u ispitivanim grupama

| Obeležje | PAFS N=90 | SAFS N=50 | kontrolna grupa N=40 | p vrednost |
|-----------------------|--------------|--------------|-------------------------|---------------|
| BMI | 25,30±4,68 | 25,78±4,93 | 25,14±5,41 | 0,805 |
| Hipertenzija | 30 (33,7%) | 15 (31,2%) | 6 (15%) | 0,086 |
| Dijabetes | 6 (6,7%) | 2 (4%) | 1 (2,5%) | 0,328 |
| Pušenje | 27 (30%) | 9 (18%) | 7 (17,5%) | 0,250 |
| Hiperlipoproteinemija | 36 (40%) | 13 (26%) | 10 (25%) | 0,199 |

Nije bilo statistički značajne razlike u prisustvu ovih faktora rizika između ispitivanih grupa.

Najzastupljeniji faktor rizika u sve tri ispitivane grupe je bila gojaznost (Grafikon 3).



1- Gojaznost; 2- Hipertenzija; 3- Dijabetes; 4- Pušenje; 5- Hiperlipoproteinemija

Grafikon 3: Zastupljenost pojedinačnih faktora rizika kod bolesnika i ispitanika kontrolne grupe

Ispitanici sa PAFS su bili na terapiji aspirinom (82.2 %), hidroksihlorohinom (71.1 %), varfarinom (16.7 %), dok su neki bili na kombinacijama ovih medikamenata koja nije obustavljena u vreme uključivanja ispitanika i njihovog praćenja.

Ispitanici sa SAFS su lečeni kortikosteroidima (72.0 %), hidroksihlorokinom (92 %), aspirinom (96 %), varfarinom (14 %) kao i kombinacijama. Uzorak krvi za studiju je uziman najmanje šest meseci od poslednje doze ciklofosfamida ukoliko su ga bolesnici sa SEL dobijali tokom faza pogoršanja. Doza kortikosteroida je zavisila od aktivnosti SEL (u vreme uzimanja uzorka krvi manje od 0.5 mg/kg/dan, srednja doza $12,5 \pm 6,32$ mg).

Ukupno je 116 ispitanika sa AFS testirano na urođene trombofilije. Od toga nedostatak proteina C je utvrđen kod 1,7%, nedostatak proteina S kod 0,86%, rezistencija na aktivirani protein C kod 6%, mutacija FII20210 kod 1,7%, mutacija faktora V Leiden kod 3,4%, mutacija MTHFR (C677T) kod 55,2% (od toga 75% heterozigota i 25% homozigota).

4.2. UPOREDNA ANALIZA ENDOTELNE FUNKCIJE ISPITIVANIH GRUPA

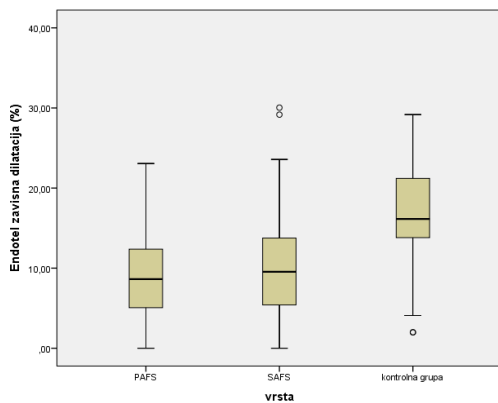
Klinička procena postojanja disfunkcije endotela izvršena je merenjem procenta dilatacije brahijalne arterije Doppler UZ pregledom. Nije bilo statistički značajne razlike u početnim vrednostima dijametra brahijalne arterije između ispitivanih grupa ($p=0,318$).

Poređenje procenta endotel zavisne i endotel nezavisne dilatacije brahijalne arterije između grupa PAFS i SAFS nije pokazalo statističku značajnost. Međutim, postojala je statistički značajna razlika u procentu endotel zavisne dilatacije (FMD%) između pacijenata sa AFS (PAFS i SAFS) i kontrolne grupe što je prikazano tabelarno (Tabela 2) i grafički (Grafikon 4,5,6,7).

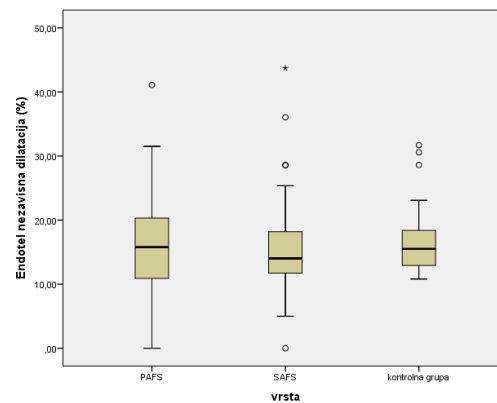
Tabela 2: Razlike u vrednostima procenta endotel zavisne (FMD%) i endotel nezavisne dilatacije (NMD%) a. brachialis kod ispitanika

| | PAFS N=90 | SAFS N=50 | Kontrolna grupa, N=40 | p vrednost |
|------|--------------|--------------|--------------------------|--------------|
| FMD% | 9,48±5,68 | 10,39±6,68 | 16,52±6,74 | 0,001 |
| | p=0,601 | | | |
| NMD% | 16,18±7,73 | 15,54±7,56 | 16,79±5,15 | 0,395 |
| | p=0,344 | | | |

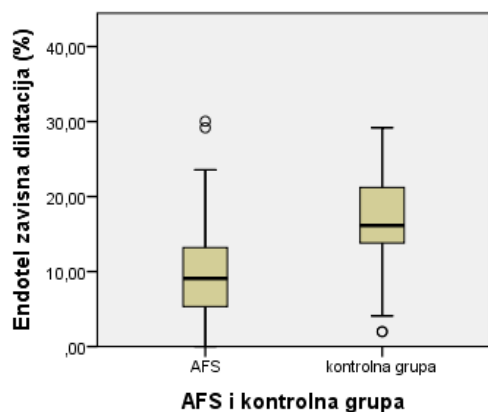
FMD% - procenat protokom izazvane (endotel zavisna) dilatacije a. brachialis; NMD% – procenat nitratima izazvane (endotel nezavisna) dilatacije a. brachialis



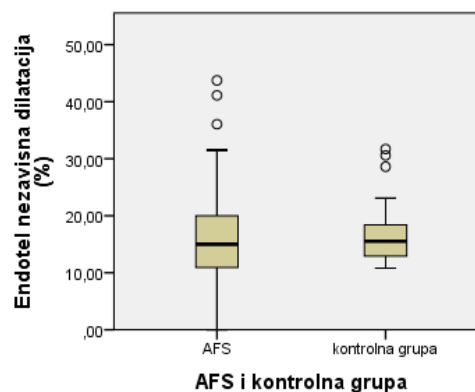
Grafikon 4: Prosečne vrednosti procenta endotel zavisne dilatacije (FMD%) kod ispitanika sa primarnim (PAFS), sekundarnim (SAFS) antifosfolipidnim sindromom i kontrolne grupe



Grafikon 5: Prosečne vrednosti procenta endotel nezavisne dilatacije (NMD%) kod ispitanika sa primarnim (PAFS), sekundarnim (SAFS) antifosfolipidnim sindromom i kontrolne grupe



Grafikon 6: Prosečne vrednosti procenta endotel zavisne dilatacije (FMD%) kod bolesnika sa antifosfolipidnim sindromom (AFS) i kontrolne grupe



Grafikon 7: Prosečne vrednosti procenta endotel nezavisne dilatacije (NMD%) kod bolesnika sa antifosfolipidnim sindromom (AFS) i kontrolne grupe

Određivanjem “cut off” vrednosti od 10 % endotel zavisne i endotel nezavisne dilatacije utvrđeno je da je u PAFS grupi 31,3% bolesnika imalo endotelnu disfunkciju, u SAFS grupi taj procenat iznosio 32% dok je u kontrolnoj grupi 12,5% imalo endotel zavisnu disfunkciju. Razlika nije bila statistički značajna (Tabela 3). Prema istom modelu uvrđeno je da je 10% PAFS bolesnika imalo endotel nezavisnu dilataciju manju od 10%, dok je taj procenat u SAFS grupi iznosio 6%, a u kontrolnoj grupi 7,5%. Razlika takođe nije bila statistički značajna (Tabela 4).

Tabela 3: Razlika učestalosti patoloških vrednosti endotel zavisne i endotel nezavisne dilatacije a. brachialis među ispitivanim grupama

| obeležje | PAFS (N=90) | SAFS (N=50) | Kontrolna grupa (N= 40) | P vrednost |
|--------------------------------------|----------------|----------------|----------------------------|---------------|
| <10% endotel zavisne dilatacije | 28 (31,3%) | 16 (32%) | 5 (12,5%) | 0,060 |
| <10% endotel nezavisne dilatacije | 9 (10%) | 3 (6%) | 3 (7,5%) | 0,698 |

Utvrđeno je postojanje statistički značajne razlike u prisustvu endotel zavisne disfunkcije između AFS pacijenata i kontrolne grupe (Tabela 4).

Tabela 4: Razlike učestalosti patoloških vrednosti endotel zavisne i endotel nezavisne dilatacije a. brachialis u grupi ispitivanih bolesnika sa antifosfolipidnim sindromom (AFS) u odnosu na kontrolnu grupu

| obeležje | AFS (N=140) | Kontrolna grupa (N= 40) | P vrednost |
|--------------------------------------|----------------|----------------------------|--------------|
| <10% endotel zavisne dilatacije | 44 (31,4%) | 5 (12,5%) | 0,018 |
| <10% endotel nezavisne dilatacije | 12 (8,6%) | 3 (7,5%) | 0,829 |

Nije bilo statistički značajnih korelacija FMD sa urođenim trombofilijama, dok je utvrđeno postojanje statistički značajne korelacije NMD sa mutacijom FV Leiden ($p=0,180$, $p=0,044$) i mutacijom MTHFR ($p=0,183$, $p=0,043$).

4.3. UPOREDNA ANALIZA LABORATORIJSKIH PARAMETARA ISPITIVANIH GRUPA

4.3.1. OSNOVNE LABORATORIJSKE ANALIZE ISPITIVANIH GRUPA

Analiza parametra krvne slike, pokazatelja biohumoralnog sindroma, uključujući azotne materije, hepatogram, glikemiju i ukupne proteine, prikazana je u tabeli (Tabela 5).

Tabela 5: Razlike prosečnih vrednosti laboratorijskih analiza ispitivanih grupa

| obeležje | PAFS N=90 | SAFS N=50 | kontrolna grupa N=40 | p vrednost |
|-------------|---------------|--------------|-------------------------|--------------|
| Hemoglobin | 135,53±12,42 | 131,91±12,83 | 131,43±14,66 | 0,183 |
| Leukociti | 5,93±1,73 | 6,37±2,29 | 5,73±1,69 | 0,284 |
| Trombociti | 218,47±65,33 | 243,32±82,58 | 256±62,19 | 0,017 |
| Urea | 4,53±1,43 | 10,4±1,47 | 4,31±1,07 | 0,066 |
| Kreatinin | 69,58±15,16 | 127±19,01 | 67,27±7,84 | 0,059 |
| MK | 247,55±67,989 | 417±68,83 | 237,46±66,51 | 0,076 |
| Glukoza | 5,14±0,78 | 7,1±0,72 | 5,10±0,63 | 0,094 |
| Bil. ukupni | 8,04±4,4 | 9,21±8,24 | 9,04±5,69 | 0,518 |
| AST | 20,03±7,64 | 19,17±8,42 | 17,54±5,69 | 0,255 |
| ALT | 20,39±14,16 | 17,07±7,48 | 18,95±8,14 | 0,358 |
| Proteini | 71,97±4,51 | 87±8,7 | 72,14±5,72 | 0,129 |

MK – mokraćna kiselina; AST – aspartat aminotransferaza; ALT – alanin aminotransferaza;

Nađena je statistički značajna razlika u broju trombocita između bolesnika sa AFS i kontrolne grupe ($p=0,031$) dok između ostalih analiziranih parametara nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike.

Analiza lipidnih parametara je prikazana u Tabeli 6.

Tabela 6: Razlika prosečnih vrednosti parametara lipidnog statusa ispitivanih grupa

| obeležje | PAFS N=90 | SAFS N=50 | kontrolna grupa N=40 | p vrednost |
|-----------------|--------------|--------------|-------------------------|------------|
| trigliceridi | 1,28±1,1 | 2,47±0,55 | 1,26±0,58 | 0,963 |
| holesterol | 5,29±1,1 | 7,50±1 | 5,45±0,92 | 0,690 |
| HDL | 1,48±0,44 | 2,10±0,36 | 1,51±0,41 | 0,848 |
| LDL | 3,24±1,02 | 5,40±0,88 | 8,82±32,44 | 0,174 |
| Faktor rizika | 3,79±1,3 | 3,73±1,15 | 3,78±1,42 | 0,954 |
| Indeks aterosl. | 2,36±1,05 | 2,3±0,95 | 2,38±1,12 | 0,925 |

Nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike među posmatranim grupama u pogledu lipidnog statusa.

4.3.2. ANALIZA POZITIVNOSTI aFL

Analiza pozitivnosti različitih vrsta aFL kod pacijenata sa PAFS i SAFS prikazana je u Tabeli 7.

Tabela 7: Razlika u procentu zastupljenosti pozitivnog titra antifosfolipidnih antitela (aFL) kod pacijenata sa primarnim (PAFS) i sekundarnim (SAFS) antifosfolipidnim sindromom

| Obeležje | PAFS N (%) | SAFS (N (%)) | p vrednost |
|-----------|------------|--------------|--------------|
| aKL IgM | 41 (45,6%) | 34(68%) | 0,011 |
| aKL IgG | 41 (45,6%) | 32 (64%) | 0,036 |
| β2GPI IgM | 34 (37,8%) | 25 (50%) | 0,161 |
| β2GPI IgG | 33 (36,7%) | 28 (56%) | 0,027 |
| LA | 44 (48,9%) | 25 (50%) | 0,900 |

Analizom prisustva pojedinih vrsta aFL dobijena je statistički značajna razlika u prisustvu aKL IgM, aKL IgG i β2GPI IgG antitela, tj nalaz pozitivnog titra bio je učestaliji kod pacijenata sa SAFS.

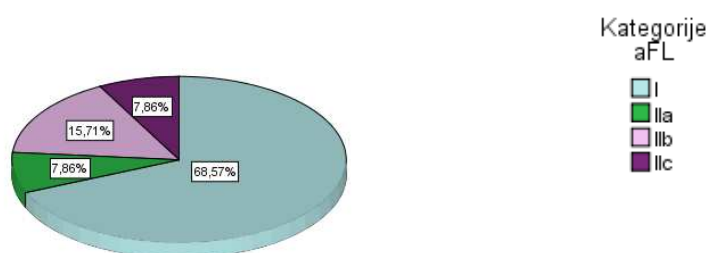
Analiza titra različitih vrsta aFL kod pacijenata sa PAFS i SAFS prikazana je u Tabeli 8.

Tabela 8: Razlika prosečnih vrednosti titra antifosfolipidnih antitela (aFL) kod bolesnika sa primarnim (PAFS) i sekundarnim (SAFS) antifosfolipidnim sindromom

| Obeležje | grupa | N | Prosečna vrednost | SD | max | P vrednost |
|------------------------|--------|-----|-------------------|--------|-------|--------------|
| Titar aKL IgM | PAFS | 90 | 19,63 | 24,44 | 137,1 | 0,020 |
| | SAFS | 50 | 49,61 | 117,02 | 770,2 | |
| | ukupno | 140 | 30,34 | 73,6 | 770,2 | |
| Titar aKL IgG | PAFS | 90 | 27,39 | 51,93 | 338,5 | 0,092 |
| | SAFS | 50 | 45,14 | 70,61 | 317 | |
| | ukupno | 140 | 33,73 | 59,64 | 338,5 | |
| Titar β 2GPI IgM | PAFS | 90 | 27,74 | 66,87 | 527,2 | 0,066 |
| | SAFS | 50 | 61,97 | 150,69 | 860,6 | |
| | ukupno | 140 | 39,96 | 105,54 | 860,6 | |
| Titar β 2GPI IgG | PAFS | 90 | 25,76 | 58,62 | 369,2 | 0,010 |
| | SAFS | 50 | 65,67 | 121,57 | 534,6 | |
| | ukupno | 140 | 40,01 | 88,19 | 524,6 | |

Analizom titrova pojedinih vrsta aFL dobijena je statistički značajna razlika između pacijenata sa PAFS i SAFS, tj titrovi aKL IgM i β 2GPI IgG antitela su bila viša kod pacijenata sa SAFS.

Analiza kategorija aFL je prikazana na Grafikonu 8.



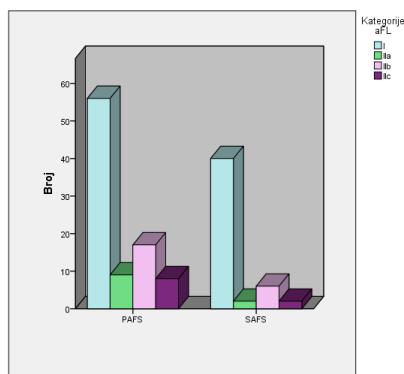
Grafikon 8: Zastupljenost pojedinačnih kategorija antifisfolipidnih antitela (aFL) prema grupama bolesnika sa primarnim (PAFS) i sekundarnim (SAFS) antifisfolipidnim sindromom

Analiza zastupljenosti kategorija aFL je pokazala najveću zastupljenost bolesnika u klasi I, tj. sa više od jednim aFL pozitivnim (68,7%).

Analizirana je učestalost kategorija aFL u grupi pacijenata sa PAFS i SAFS. Grupe su se statistički razlikovale po zastupljenosti kategorije I ($p=0,030$) što je prikazano u Tabeli 9 i Grafikonu 9. Iako u izvornoj kategorizaciji postoje kategorije I, IIa, IIb, IIc prikazana je i zastupljenost trostruke pozitivnosti.

Tabela 9: Razlika zastupljenosti kategorija antifisfolipidnih antitela (aFL) prema grupama bolesnika sa primarnim (PAFS) i sekundarnim (SAFS) antifisfolipidnim sindromom

| Obeležje | PAFS N(%) | SAFS N (%) | p vrednost |
|-----------------------|------------|------------|--------------|
| IIa | 9 (10,1%) | 2 (4,0%) | 0,206 |
| IIb | 16 (17,8%) | 6 (12%) | 0,368 |
| IIc | 9 (10%) | 3 (6%) | 0,418 |
| I | 56 (62,2%) | 40 (80%) | 0,030 |
| Trostruka pozitivnost | 23 (25,6%) | 19 (38%) | 0,124 |



Grafikon 9: Zastupljenost kategorija antifolipidnih antitela (aFL) prema grupama bolesnika sa primarnim (PAFS) i sekundarnim (SAFS) antifolipidnim sindromom (p=0,164)

4.3.3. ANALIZA MARKERA ZAPALJENJA

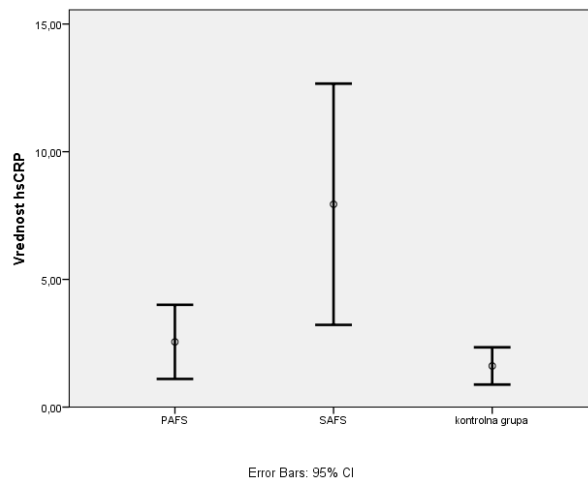
Analiza markera zapaljenja uključila je sledeće parametre: hsCRP i neutrofilno/limfocitni odnos (NLR).

U Tabeli 10 i Grafikonu 10 prikazane su vrednosti ovih parametara.

Tabela 10: Razlika prosečnih vrednosti koncentracije hs C reaktivnog proteina (CRP) u ispitivanim grupama

| hsCRP mg/L | N | medijana | Srednja vrednost | SD | min | max | p |
|--------------------|----|----------|---------------------|-------|------|-------|--------------|
| PAFS | 78 | 0,99 | 2,55 | 6,44 | 0,05 | 53,95 | |
| SAFS | 42 | 2,34 | 7,94 | 15,16 | 0,16 | 62,66 | 0,001 |
| Kontrolna grupa | 38 | 0,77 | 1,61 | 2,22 | 0,05 | 9,44 | |

Ispitivane grupe su se statistički značajno razlikovale prema vrednosti CRP (p=0,001).



Grafikon 10: Prosečne vrednosti koncentracije hsCRP kod ispitivanih pacijenata

Statistička značajnost razlika (p) vrednosti hsCRP između pojedinačnih grupa je prikazana u Tabeli 11.

Tabela 11: Prikaz statističke značajnosti razlika prosečne koncentracije hs CRP između grupa (p vrednost)

| PAFS/SAFS | AFS/kontrolna gr | PAFS/kontrolna gr | SAFS/kontrolna gr |
|--------------|------------------|-------------------|-------------------|
| 0,002 | 0,031 | 0,265 | 0,001 |

Utvrđeno je postojanje statistički značajne razlike u vrednostima hsCRP između pacijenata PAFS i SAFS ($p=0,002$), AFS i kontrolne grupe ($p=0,031$), kao i u vrednostima hsCRP između SAFS i kontrolne grupe ($p=0,001$).

Prema riziku koji nosi hsCRP grupe su se značajno statistički razlikovale (Tabela 12).

Tabela 12: Zastupljenost pojedinih grupa rizika prema vrednostima hsCRP u ispitivanim grupama

| hsCRP | PAFS N(%) | SAFS N(%) | Kontrolna grupa N(%) | p |
|----------------------------|--------------|--------------|-------------------------|--------------|
| Nizak rizik <1mg/L | 48 (61,5) | 14 (33,3) | 26 (68,4) | |
| Prosečan rizik 1-3 mg/L | 18 (23,1) | 14 (33,3) | 8 (21,1) | 0,010 |
| Visok rizik >3mg/L | 12 (15,4) | 14 (33,3) | 4 (10,5) | |

Analiziran je broj leukocita, limfocita i neutrofilno limfocitni odnos (NLR) kod ispitivanih pacijenata (Tabela 13).

Tabela 13: Razlike prosečnog broja neutrofila (neu), limfocita (ly) i vrednosti neutrofilno limfocitnog odnosa (NLR) u ispitivanim grupama

| | | N | med | Prosečna vrednost | SD | min | max | P vrednost |
|-----|--------|----|------|----------------------|------|------|------|---------------|
| neu | PAFS | 90 | 3,40 | 3,61 | 1,32 | 0,8 | 7,5 | 0,106 |
| | SAFS | 50 | 3,58 | 5,37 | 7,43 | 1,5 | 5,1 | |
| | zdravi | 40 | 3,00 | 3,26 | 1,12 | 1,5 | 6,8 | |
| ly | PAFS | 90 | 1,70 | 1,7 | 0,5 | 0,6 | 3,1 | 0,137 |
| | SAFS | 50 | 1,50 | 2,35 | 5,29 | 0,4 | 3,6 | |
| | zdravi | 40 | 1,60 | 1,91 | 0,66 | 1,2 | 4,5 | |
| NLR | PAFS | 90 | 2,00 | 2,23 | 0,99 | 0,83 | 6,56 | 0,003 |
| | SAFS | 50 | 2,50 | 3,55 | 3,04 | 0,71 | 14 | |
| | zdravi | 40 | 1,71 | 1,8 | 0,63 | 0,92 | 3,96 | |

Nije bilo statistički značajne razlike u broju neutrofila i limfocita među ispitivanim grupama. Utvrđeno je postojanje statistički značajne razlike NLR između tri ispitivane grupe ($p=0,003$).

Značajnost razlika vrednosti NLR između ispitivanih grupa prikazane su u Tabeli 14.

Tabela 14: Prikaz statističke značajnosti razlika neutrofilno limfocitnog odnosa (NLR) između grupa

| | | | |
|-----------|------------------|-------------------|-------------------|
| PAFS/SAFS | AFS/kontrolna gr | PAFS/kontrolna gr | SAFS/kontrolna gr |
| 0,068 | 0,003 | 0,019 | 0,002 |

Nije bilo statistički značajne razlike NLR između bolesnika sa PAFS i SAFS ($p=0,68$), ali je ova razlika bila značajna u korist viših vrednosti indeksa bolesnika sa AFS (Tabela 14).

Vrednosti hsCRP i NLR pokazuju značajnu statističku korelaciju (ρ 0,239; $p=0,003$).

U Tabeli 15 su prikazane korelacije hsCRP i NLR sa drugim parametrima (faktorima rizika i pozitivnošću/titrom aFL).

Tabela 15: Korelacije hsCRP i neutrofilno limfocitnog odnosa (NLR) prema drugim parametrima

| | hsCRP | | NLR | |
|---------------------------|----------------------|--------------|----------------------|--------------|
| | Spearman koeficijent | p | Spearman koeficijent | p |
| starost | 0,238 | 0,003 | 0,248 | 0,020 |
| trajanje bolesti | NS | | NS | |
| gojaznost | 0,190 | 0,015 | NS | |
| hipertenzija | -0,155 | 0,051 | NS | |
| dijabetes | NS | | -0,216 | 0,007 |
| pušenje | -0,193 | 0,016 | NS | |
| holesterol | 0,246 | 0,002 | NS | |
| trigliceridi | 0,402 | 0,001 | 0,203 | 0,012 |
| HDL | -0,360 | 0,001 | NS | |
| LDL | 0,277 | 0,001 | NS | |
| aKL IgM | NS | | 0,263 | 0,004 |
| β 2 IgG | 0,204 | 0,026 | NS | |
| trostruka aFL pozitivnost | 0,222 | 0,015 | NS | |

Zajednička osobina ova dva markera zapaljenja su više vrednosti kod ispitanika sa AFS u odnosu na kontrolnu grupu. hsCRP se izdvaja kao osetljiviji pokazatelj prisustva i drugih faktora rizika kao što su gojaznost, hipertenzija i hiperlipidemija. Za razliku od hsCRP koji korelira sa pozitivnošću/titrom β 2 IgG ($p=0,026$), NLR pokazuje pozitivnu korelaciju sa pozitivnošću/titrom aKL IgM ($p=0,004$).

4.3.4 ANALIZA PARAMETARA OKSIDATIVNOG STRESA

Analizirani su sledeći parametri oksidativnog stresa: LOOP, AOPP, PON1 i SH. Za svako pojedinačno obeležje prikazane su medijana, srednja vrednost, SD, minimalna i maksimalna vrednost po ispitivanim grupama. Postoji statistički značajna razlika u vrednostima parametara AOPP, PON1 i SH između ispitivanih grupa (Tabela 16,17,18,19).

Tabela 16: Razlika prosečnih vrednosti koncentracija lipidnih hidroperoksida (LOOH) u ispitivanim grupama

| LOOH μmol/L | N | medijana | Srednja vrednost | SD | min | max | p |
|--------------------|----|----------|---------------------|------|------|-------|-------|
| PAFS | 90 | 94,55 | 95,99 | 5,1 | 82,8 | 116,5 | |
| SAFS | 50 | 94,85 | 100,8 | 13,2 | 88 | 131,9 | 0,269 |
| Kontrolna grupa | 40 | 96,85 | 97,41 | 7,96 | 80 | 121 | |

Tabela 17: Razlika prosečnih vrednosti koncentracije produkata uznapredovale oksidacije proteina (AOPP) u ispitivanim grupama

| AOPP μmol/L | N | medijana | Srednja vrednost | SD | min | max | p |
|--------------------|----|----------|---------------------|-------|-----|------|--------------|
| PAFS | 90 | 9,2 | 12,84 | 10,34 | 6,1 | 54 | |
| SAFS | 50 | 12,9 | 15,07 | 8,41 | 7,1 | 46 | 0,001 |
| Kontrolna grupa | 40 | 9,95 | 10,86 | 4,32 | 4,8 | 24,3 | |

Tabela 18: Razlika prosečne aktivnosti paraoksonaze (PON1) u ispitivanim grupama

| PON1 IU/L | N | medijana | Srednja vrednost | SD | min | max | p |
|--------------------|----|----------|---------------------|--------|-----|-----|--------------|
| PAFS | 90 | 76,5 | 134,43 | 105,19 | 39 | 554 | |
| SAFS | 50 | 58 | 86,1 | 65,03 | 23 | 365 | 0,001 |
| Kontrolna grupa | 40 | 83,5 | 153,67 | 120,48 | 30 | 497 | |

Tabela 19: Razlika prosečne vrednosti koncentracije sulfidrilnih grupa (SH) u ispitivanim grupama

| SH $\mu\text{mol/L}$ | N | medijana | Srednja vrednost | SD | min | max | p |
|-------------------------|----|----------|---------------------|------|-------|-------|--------------|
| PAFS | 90 | 0,53 | 0,542 | 0,08 | 0,364 | 0,983 | |
| SAFS | 50 | 0,426 | 0,433 | 0,07 | 0,285 | 0,57 | 0,001 |
| Kontrolna grupa | 40 | 0,504 | 0,507 | 0,07 | 0,407 | 0,675 | |

Uporedna analiza statističke značajnosti razlike koncentracija parametara oksidativnog stresa je prikazana u Tabeli 20.

Tabela 20: Prikaz statističke značajnosti razlika koncentracija parametara oksidativnog stresa između ispitivanih grupa (p vrednost)

| Varijabla | PAFS/SAFS | SAFS/kontrola | PAFS/kontrola | SAFS/kontrola |
|-----------|--------------|---------------|---------------|---------------|
| LOOH | NS | NS | NS | NS |
| AOPP | 0,004 | 0,007 | NS | 0,001 |
| PON1 | 0,001 | NS | NS | 0,001 |
| SH | 0,001 | NS | NS | 0,001 |

NS - nema statističke značajnosti

Ako se posmatraju međusobne korelacije parametara oksidativnog stresa može se uočiti da postoji pozitivna korelacija parametara LOOH i AOPP ($p=0,001$), kao i SH i PON1 ($p=0,004$) dok je značajna negativna korelacija prisutna između LOOH i SH ($p=0,047$), AOPP i SH ($p=0,019$).

Korelacije parametara oksidativnog stresa sa ostalim faktorima su prikazane u Tabeli 21.

Tabela 21: Korelacija markera oksidativnog stresa prema drugim parametrima

| varijabla | LOOH | | AOPP | | PON1 | | SH | |
|------------------|-------------|--------------|-------------|--------------|-------------|--------------|-------------|--------------|
| | Koef ρ | p | Koef ρ | p | Koef ρ | p | Koef ρ | p |
| starost | | | | | | | 0,332 | 0,001 |
| gojaznost | NS | | 0,228 | 0,002 | NS | | -0,179 | 0,034 |
| hipertenzija | | | -0,158 | 0,009 | | | | |
| holesterol | 0,199 | 0,013 | 0,300 | 0,001 | | | | |
| trigliceridi | 0,372 | 0,001 | 0,609 | 0,001 | NS | | NS | |
| HDL | -0,227 | 0,004 | -0,303 | 0,001 | | | | |
| LDL | 0,171 | 0,033 | 0,297 | 0,001 | | | | |
| hsCRP | NS | | 0,358 | 0,001 | NS | | -0,220 | 0,006 |
| aKL IgM | | | | | | | -0,214 | 0,011 |
| β 2GPI IgG | | | NS | | -0,177 | 0,037 | -0,180 | 0,033 |
| LA | 0,173 | 0,041 | | | | | | |

NS - nema statističke značajnosti

Navika pušenja nije pokazala statistički značajne korelacije sa parametrima oksidativnog stresa. Starost, gojaznost i hipertenzija značajno statistički koreliraju sa koncentracijom AOPP, a u multivarijantnoj analizi su potvrdili da su nezavisni prediktori povećane AOPP koncentracije (za starost: $p = 0.008$, 95%CI 1.243–8.140; gojaznost: $p= 0.012$, 95 % CI 1.068–8.657).

Koncentracije LOOH i AOPP pokazuju značajne statističke korelacije prema lipidnim frakcijama za razliku od SH i PON1. Multivarijantnom analizom, trigliceridi su bili nezavisni prediktor koncentracije LOOH ($p = 0.004$; 95%CI 0.774–3.990); dok su

nezavisni prediktori koncentracije AOPP bili holesterol ($p = 0.012$, 95 % CI 0.589–3.223) i HDL ($p = 0.002$, 95 % CI 1.841–8.453).

AOPP je osetljiviji oksidativni marker pošto korelira i sa markerom zapaljenja (hsCRP).

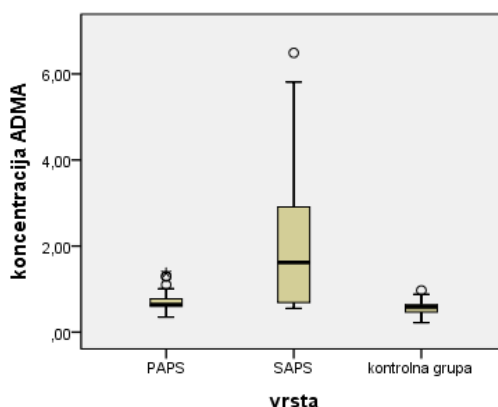
4.3.5. ANALIZA PRISUSTVA ASIMETRIČNOG DIMETILARGININA (ADMA)

Koncentracije ADMA po grupama su prikazane u tabeli (Tabela 22, Grafikon 11).

Tabela 22: Razlika prosečnih vrednosti koncentracija asimetričnog dimetilarginina (ADMA) u ispitivanim grupama

| ADMA μmol/L | N | medijana | Srednja vrednost | SD | min | max | p |
|--------------------|----|----------|---------------------|------|------|------|-------------------|
| PAPS | 59 | 0,64 | 0,71 | 0,03 | 0,35 | 1,38 | |
| SAFS | 46 | 1,62 | 2,1 | 0,25 | 0,55 | 6,49 | p<0,001 |
| Kontrolna grupa | 40 | 0,59 | 0,56 | 0,25 | 0,22 | 0,97 | |

Ispitivane grupe su se statistički značajno razlikovale u koncentraciji ADMA.



Grafikon 11: Prosečne koncentracije asimetričnog dimetilarginina (ADMA) u ispitivanim grupama

Uporedna analiza statističke značajnosti razlika prosečne koncentracije ADMA u ispitivanim grupama su prikazane u Tabela 23.

Tabela 23: Prikaz statističke značajnosti razlika prosečnih vrednosti asimetričnog dimetilarginina (ADMA) između ispitivanih grupa

| PAFS/SAFS | AFS/kontrolna gr | PAFS/kontrolna gr | SAFS/kontrolna gr |
|--------------|------------------|-------------------|-------------------|
| 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 |

Nije utvrđeno postojanje statistički značajnih korelacije ADMA sa starošću ispitanika (ρ -0,027; $p=0,750$), hipertenzijom (ρ -0,131; $p=0,120$), hiperholesterolemijom (ρ -0,099; $p=0,251$), dok postoji značajna korelacija sa hsCRP (ρ 0,190; $p=0,025$).

Utvrđeno je postojanje statistički značajne korelacije ADMA sa pozitivnim vrednostima aKL IgG (ρ 0,208; $p=0,033$) kao i visokim titrom β 2IgG (ρ 0,193; $p=0,049$).

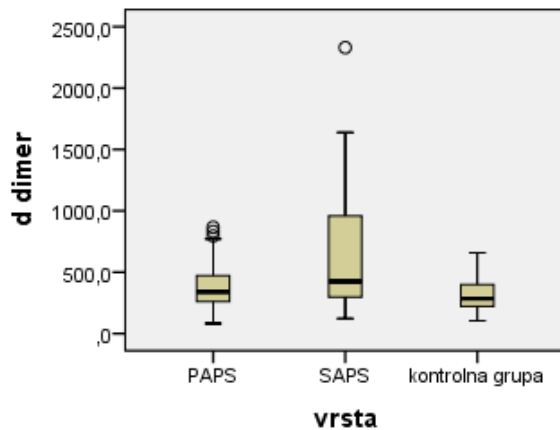
4.3.6. ANALIZA AKTIVNOSTI HEMOSTATSKOG SISTEMA (d dimer i ETP)

Koncentracija d dimera po grupama je prikazana u Tabeli 24 i Grafikonu 12.

Tabela 24: Razlika prosečnih koncentracija d dimera u ispitivanim grupama

| D dimer $\mu\text{g/L}$ | N | medijana | Srednja vrednost | SD | min | max | p |
|----------------------------|----|----------|---------------------|-------|-------|--------|-------------------|
| PAFS | 78 | 339,95 | 388,15 | 20,61 | 82,1 | 865,5 | |
| SAFS | 42 | 425,4 | 648,48 | 76,74 | 121,7 | 2329,7 | p<0,001 |
| Kontrolna grupa | 38 | 284,4 | 309,41 | 20,67 | 103,4 | 657,7 | |

Dokazana je statistički značajna razlika u prosečnim koncentracijama d dimera između ispitivanih grupa (Grafikon 12, Tabela 25).



Grafikon 12: Prosečne koncentracije d dimera u ispitivanim grupama

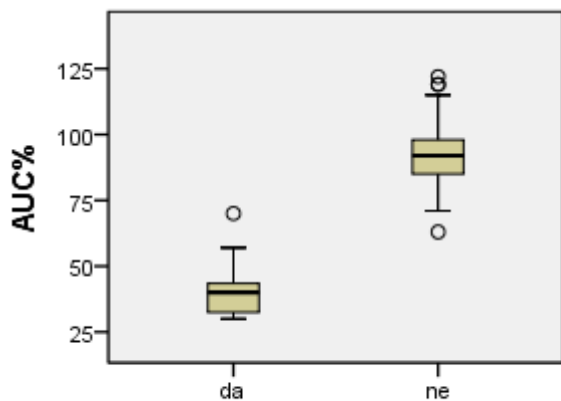
Tabela 25: Prikaz statističke značajnosti razlika prosečnih koncentracija d dimera između ispitivanih grupa

| PAFS/SAFS | AFS/kontrolna gr | PAFS/kontrolna gr | SAFS/kontrolna gr |
|--------------|------------------|-------------------|-------------------|
| 0,001 | 0,001 | 0,018 | 0,001 |

Vrednosti d dimera pokazuju značajnu statističku korelaciju sa starošću ispitanika (ρ 0,340; $p=0,001$), poremećenim lipidogramom i to povišenim vrednostima holesterola (ρ 0,205; $p=0,011$), triglicerida (ρ 0,264; $p=0,001$) i LDL (ρ 0,254; $p=0,001$), vrednostima hsCRP (ρ 0,422; $p=0,001$), kao i negativnu značajnu korelaciju sa hipertenzijom (ρ - 0,256; $p=0,001$).

Od posmatranih aFL, utvrđeno je postojanje pozitivne statistički značajne korelacije sa prisustvom i titrom aKL IgM (ρ 0,189; $p=0,039$).

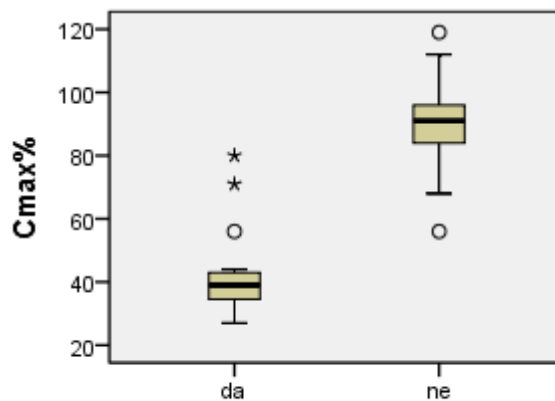
Ukupno je kod 158 ispitanika rađena analiza parametara ETP. Postojala je statistički značajna razlika u parametrima određivanja ETP (AUC, Cmax, tlag i tmax) između AFS ispitanika koji su bili na terapiji oralnim antikoagulansom i onih koji nisu što je prikazano na Grafikonima 13, 14, 15, 16.



na terapiji OAK

Grafikon 13: Razlika u vrednostima AUC% između ispitanika sa i bez oralne antikoagulantne terapije (OAK)

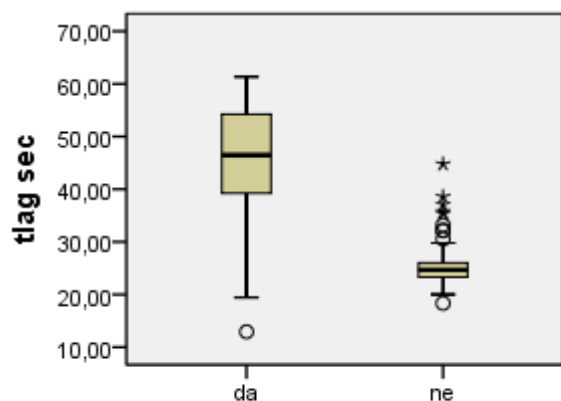
p < 0,001



na terapiji OAK

Grafikon 14: Razlika u vrednostima Cmax između ispitanika sa i bez oralne antikoagulantne terapije (OAK)

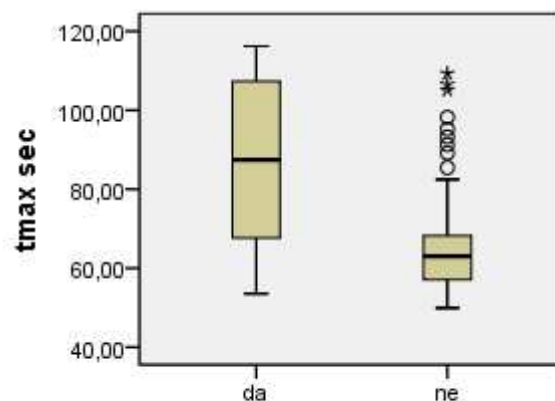
p < 0,001



na terapiji OAK

Grafikon 15: Razlika u vrednostima tlag između ispitanika sa i bez oralne antikoagulantne terapije (OAK)

p < 0,001



na terapiji OAK

Grafikon 16: Razlika u vrednostima tmax između ispitanika sa i bez oralne antikoagulantne terapije (OAK)

p < 0,001

U Tabeli 26 prikazani su deskriptivni podaci ETP parametara za celu grupu (u daljoj analizi podataka o ETP su izostavljeni ispitanici na OAK (njih 15) pošto ovi rezultati kao ekstremi ometaju dalju statističku obradu).

Tabela 26: Prosečne vrednosti parametara endogenog trombinskog potencijala (ETP) po grupama

| | | N | Xsr | SD | 95% Interval poverenja | min | max |
|-------|-----------------|----|-------|--------|------------------------|-------|--------|
| AUC% | PAFS | 68 | 93,69 | 10,708 | 91,10-96,28 | 74 | 122 |
| | SAFS | 37 | 88,35 | 10,182 | 84,96-91,75 | 63 | 110 |
| | Kontrolna grupa | 38 | 93,95 | 10,337 | 90,55-97,35 | 76 | 114 |
| Cmax% | PAFS | 68 | 93,12 | 9,394 | 90,84-95,39 | 72 | 119 |
| | SAFS | 37 | 85,92 | 9,931 | 82,61-89,23 | 56 | 106 |
| | Kontrolna grupa | 38 | 92,68 | 9,600 | 89,53-95,84 | 75 | 115 |
| tlag | PAFS | 68 | 25,27 | 3,24 | 24,48-26,06 | 20,00 | 38,57 |
| | SAFS | 37 | 25,58 | 4,90 | 23,94-27,22 | 18,34 | 44,77 |
| | Kontrolna grupa | 38 | 24,59 | 2,79 | 23,67-25,51 | 18,96 | 30,47 |
| tmax | PAFS | 68 | 62,57 | 10,29 | 60,08-65,06 | 49,9 | 106,5 |
| | SAFS | 37 | 69,72 | 14,77 | 64,79-74,64 | 50,92 | 109,30 |
| | Kontrolna grupa | 38 | 62,45 | 12,13 | 58,45-66,43 | 43,46 | 98,25 |

AUC% i Cmax pokazuju visoku statističku korelaciju (ρ 0,716; $p=0,001$). Vrednost tlag pokazuje visoku statističku korelaciju sa Cmax (ρ 0,262; $p=0,002$) i Tmax (ρ 0,214; $p=0,010$).

Statistička značajnost razlika parametara ETP između ispitivanih grupa je prikazana u Tabeli 27.

Tabela 27: Prikaz statističke značajnosti razlika parametara endogenog trombinskog potencijala (ETP) između ispitivanih grupa

| | PAFS/SAFS | SAFS/kontrolna gr | PAFS/kontrolna gr | SAFS/kontrolna gr |
|-------|--------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| AUC% | 0,041 | NS | NS | NS |
| Cmax% | 0,010 | NS | NS | 0,008 |
| tlag | NS | NS | NS | NS |
| tmax | 0,130 | NS | NS | NS |

Nije bilo statistički značajne razlike u brzini i količini stvaranja trombina između pacijenata sa AFS i kontrolne grupe merene ETP testom. Međutim, ta razlika je statistički značajna između grupe sa PAFS i SAFS (PAFS bolesnici naprave više trombina za kraće vreme), ali nije bilo razlike u vremenu početka stvaranja trombina ni između ovih grupa.

Statistički značajne korelacije su prikazane u Tabeli 28.

Tabela 28: Korelacije parametara endogenog trombinskog potencijala (ETP) sa ostalim varijablama

| | AUC% | | Cmax | | tlag | | tmax | |
|-------------|--------|--------------|--------|--------------|--------|--------------|--------|--------------|
| | ρ | p | ρ | p | ρ | p | ρ | p |
| starost | | NS | | NS | -0,196 | 0,019 | | NS |
| AOPP | | NS | 0,178 | 0,033 | | NS | 0,198 | 0,018 |
| hsCRP | 0,283 | 0,001 | | NS | | NS | 0,263 | 0,002 |
| NLR | | NS | | NS | | NS | 0,202 | 0,016 |
| Kat I aFL | -0,207 | 0,034 | -0,343 | 0,001 | -0,203 | 0,038 | | NS |
| Kat IIa aFL | | NS | 0,235 | 0,016 | 0,267 | 0,006 | | NS |
| Kat IIb aFL | | NS | 0,200 | 0,041 | | NS | | NS |

Postoji statistički značajna korelacija AUC% sa hsCRP i kategorijom I aFL; Cmax sa koncentracijom AOPP, i kategorijama I, IIa, IIb aFL; tlag sa starosti, kategorijom I i IIa aFL; i tmax sa koncentracijom AOPP, hsCRP i NLR. Nema korelacije parametara ETP sa vrednostima ADMA i d dimera.

4.4 KORELACIJE ENDOTELNE DISFUNKCIJE SA ISPITIVANIM PARAMETRIMA

4.4.1. KORELACIJE ENDOTELNE DISFUNKCIJE SA KLASIČNIM KARDIOVASKULARNIM FAKTORIMA RIZIKA

Analizirano je postojanje endotelne disfunkcije procenjene procentom endotel zavisne i endotel nezavisne dilatacije a. brachialis u odnosu na klasične kardiovaskularne faktore (starost, gojaznost, hipertenzija, dijabetes, pušenje, holesterol, trigliceridi, HDL, LDL) rizika u celoj ispitivanoj grupi (AFS i kontrolna grupa). Rezultati su prikazani u Tabeli 29.

Tabela 29: Korelacije procenta endotel zavisne dilatacije (FMD%) i procenta endotel nezavisne dilatacije (NMD%) sa faktorima rizika

| varijabla | FMD% (N=180) | | NMD% (N=180) | |
|--------------|----------------------|--------------|----------------------|--------------|
| | Spearman koeficijent | p | Spearman koeficijent | p |
| starost | -0,247 | 0,004 | -0,282 | 0,001 |
| gojaznost | -0,187 | 0,018 | -0,187 | 0,018 |
| hipertenzija | -0,255 | 0,004 | -0,251 | 0,004 |
| dijabetes | NS | | NS | |
| pušenje | NS | | NS | |
| holesterol | -0,180 | 0,032 | 0,206 | 0,014 |
| trigliceridi | -0,212 | 0,012 | NS | |
| HDL | NS | | NS | |
| LDL | NS | | -0,169 | 0,046 |

NS – nema statističke značajnosti

Starost, gojaznost, hipertenzija i povišeni holesterol i trigliceridi pokazuju negativnu statistički značajnu korelaciju sa FMD%, ali i NMD%. Primenom logističke regresije

jedino starost ima statističku značajnost u uticaju na FMD% (B 0,073; SE 0,023, p=0,002; Exp(B) 1,076; 95%IP 1,028-1,126).

U Tabeli 30 su prikazane korelacije standardnih kardiovaskularnih faktora rizika po grupama ispitanika za FMD%.

Tabela 30: Korelacije procenta endotel zavisne dilatacije (FMD%) sa faktorima rizika po grupama ispitanika

| Spearman koeficijent ρ | AFS (N=140) | PAFS (N=90) | SAFS (N=50) | Kontrolna grupa (N=40) |
|-----------------------------|-------------|-------------|-------------|------------------------|
| starost | 0,193* | NS | 0,363** | NS |
| hipertenzija | NS | -0,234* | NS | NS |
| holesterol | NS | NS | NS | 0,445** |
| trigliceridi | -0,210** | NS | 0,458** | 0,375* |
| HDL | NS | NS | NS | -0,344* |
| LDL | NS | NS | NS | 0,391* |

NS – nema statističkog značaja

Spearman koeficijent ρ : *p<0,005; **p<0,001

U regresionoj analizi po grupama, u grupi zdravih nije bilo statistički značajnih faktora dok su ostali prikazani u Tabeli 31.

Tabela 31: Rezultati bivarijantne regresione analize za prisustvo endotel zavisne disfunkcije po grupama ispitanika

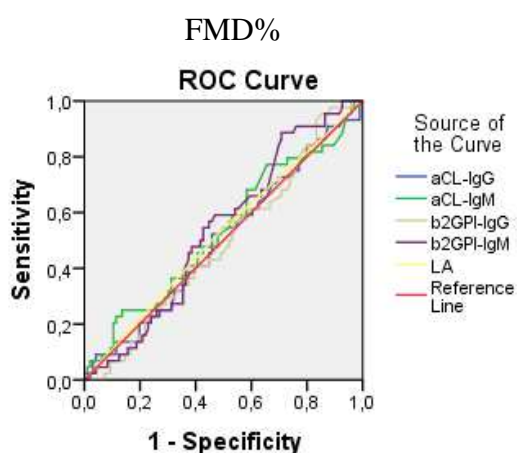
| | B | SE | Wald | p | Exp(B) |
|--------------|-------|-------|--------|--------------|--------|
| AFS | | | | | |
| Starost | 0,076 | 0,022 | 11,506 | 0,001 | 1,079 |
| SAFS | | | | | |
| Starost | 0,077 | 0,037 | 4,291 | 0,038 | 1,080 |
| Trigliceridi | 2,251 | 0,864 | 6,792 | 0,009 | 9,494 |

Regresionom analizom je potvrđeno da je starost nezavisni faktor rizika za nastanak endotel zavisne disfunkcije kod ispitanika sa antifosfolipinim sindromom.

4.4.2. KORELACIJE ENDOTELNE DISFUNKCIJE SA aFL

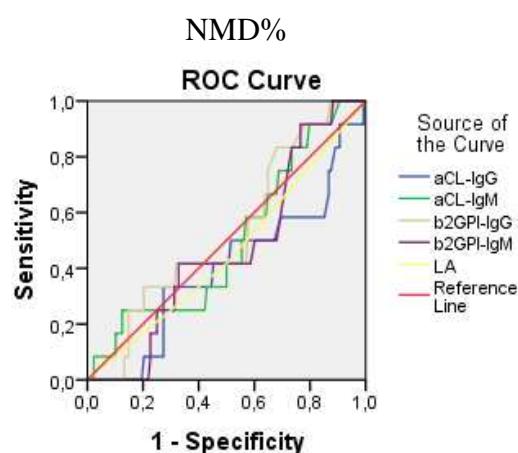
Analizom AFS grupe kao i pojedinačnih podgrupa PAFS i SAFS, nije potvrđeno postojanje statistički značajne korelacije endotelne disfunkcije procenjene procentom endotel zavisne i endotel nezavisne dilatacije a. brachialis sa pozitivnošću ili titrom bilo kog tipa ili kategorije aFL.

Analizom ROC krive se takođe potvrđuje da nijedan tip aFL nema direktnog udela u nastanku FMD ili NMD (Grafikon 17,18).



Diagonal segments are produced by ties.

Grafikon 17: ROC kriva za procenat endotel zavisne dilatacije (FMD%) i vrstu aFL (aKL IgG p=0,991; aKL IgM p=0,548; β 2GPI IgG p=0,870; β 2GPI IgM p=0,478; LA p=0,680)



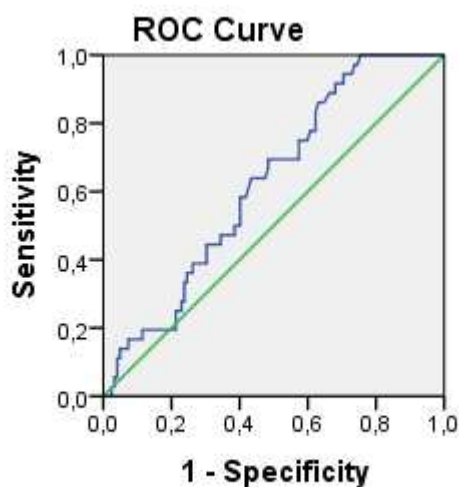
Diagonal segments are produced by ties.

Grafikon 18: ROC kriva za procenat endotel nezavisne dilatacije (NMD%) i vrstu aFL (aKL IgG p=0,264; aKL IgM p=0,967; β 2GPI IgG p=0,755; β 2GPI IgM p=0,699; LA p=0,634)

4.4.3. KORELACIJE ENDOTELNE DISFUNKCIJE SA MARKERIMA ZAPALJENJA

U grupi svih ispitanika (AFS i kontrolne grupe) postoji statistički značajna negativna korelacija FMD% i hsCRP (ρ -0,181; $p=0,023$) dok nema statistički značajnih korelacija FMD% sa NLR kao ni NMD% sa hsCRP i NLR.

Zavisnost FMD% i hsCRP je analizirana na ROC krivi (Grafikon 19).



Diagonal segments are produced by ties.

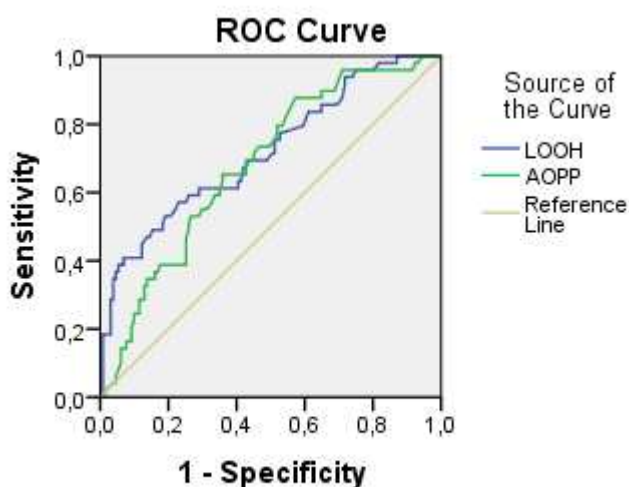
Grafikon 19: ROC kriva za procenat endotel zavisne dilatacije (FMD%) i hsCRP

Analizom ROC krive za hsCRP kod FMD% (AUC 0,624; $p=0,023$) dobija se *cut off* vrednost hsCRP od 0,97 sa senzitivnošću od 69,4% i specifičnošću od 50%. Sa ovom vrednosti hsCRP endotel zavisna disfunkcija je prisutna kod 67% ispitanika ($p=0,023$).

Analizom korelacija pojedinačnih podgrupa (AFS, PAFS, SAFS, kontrolna grupa) FMD% sa markerima zapaljenja nađena je statistički značajna korelacija FMD% sa NLR u grupi SAFS (ρ 0,339; $p=0,026$).

4.4.4 KORELACIJE ENDOTELNE DISFUNKCIJE SA PARAMETRIMA OKSIDATIVNOG STRESA

U grupi svih ispitanika (AFS i kontrolna grupa) postoji statistički značajna negativna korelacija FMD% i LOOH (ρ -0,251; $p=0,001$) kao i FMD% i AOPP (ρ -0,255; $p=0,010$) dok nema statistički značajnih korelacija FMD% sa SH i PON1 kao ni NMD% sa parametrima oksidativnog stresa. ROC krive za LOOH i AOPP kod FMD% su prikazane na Grafikonu 20 i osobine krive u Tabeli 32.



Diagonal segments are produced by ties.

Grafikon 20: ROC kriva koncentracija lipidnih hidroperoksida (LOOH) i produkata uznapredovale oksidacije proteina (AOPP) u odnosu na procenat endotel zavisne dilatacije

Tabela 32: Osobine ROC krivih koncentracija lipidnih hidroperoksida (LOOH) i produkata uznapredovale oksidacije proteina (AOPP) u odnosu na procenat endotel zavisne dilatacije

| Varijabla | AUC | SE | p | 95% Interval poverenja |
|-----------|-------|-------|--------------|------------------------|
| LOOH | 0,719 | 0,044 | 0,001 | 0,632 - 0,805 |
| AOPP | 0,681 | 0,043 | 0,001 | 0,597 - 0,764 |

Analizom ROC krive za LOOH dobija se *cut off* vrednost od 95,4 sa senzitivnošću od 67% i specifičnošću od 57%. Sa ovom vrednosti LOOH endotel zavisna disfunkcija je prisutna kod 69% ispitanika ($p=0,005$).

Analizom ROC krive za AOPP dobija se *cut off* vrednost od 10,2 sa senzitivnošću od 73,5% i specifičnošću od 53,4%. Sa ovom vrednosti AOPP endotel zavisna disfunkcija je prisutna kod 73,5% ispitanika ($p=0,001$).

Korelacije FMD% i parametara oksidativnog stresa po pojedinačnim grupama su date u Tabeli 33.

Tabela 33: Korelacije parametara oksidativnog stresa u pojedinačnim ispitivanim grupama

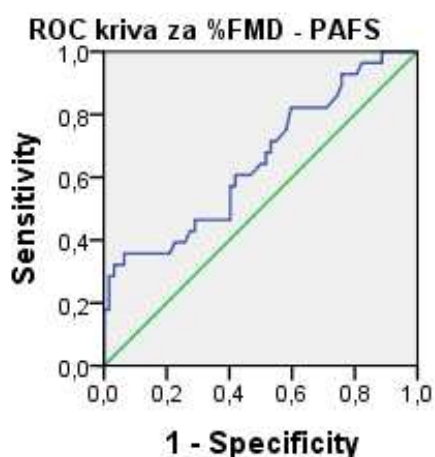
| Spearman koeficijent ρ | AFS (N=140) | PAFS (N=90) | SAFS (N=50) | Kontrolna grupa (N=40) |
|-----------------------------|-------------|-------------|-------------|------------------------|
| LOOH | 0,317* | 0,243* | 0,437** | 0,420** |
| AOPP | 0,262** | 0,240* | 0,293* | 0,320* |
| SH | NS | NS | NS | NS |
| PON1 | NS | NS | NS | NS |

NS – nema statističkog značaja

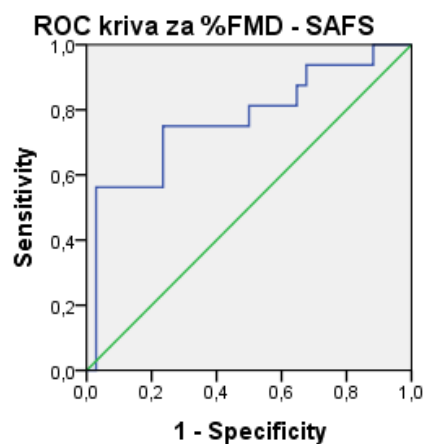
Spearman koeficijent ρ : * $p<0,005$; ** $p<0,001$

U binarnoj regresionoj analizi se u svakoj grupi izdvaja LOOH ($p<0,005$) kao statistički značajan parametar.

ROC krive za LOOH kod FMD% u grupi PAFS i SAFS su prikazane na grafikonu 21,22 i osobine krive u tabeli 34.



Grafikon 21: ROC kriva koncentracije lipidnih hidroperoksida (LOOH) u odnosu na procenat endotel zavisne dilatacije (FMD%) kod bolesnika sa primarnim antifosfolipidnim sindromom (PAFS)



Grafikon 22: ROC kriva koncentracije lipidnih hidroperoksida (LOOH) u odnosu na procenat endotel zavisne dilatacije (FMD%) kod bolesnika sa sekundarnim antifosfolipidnim sindromom (SAFS)

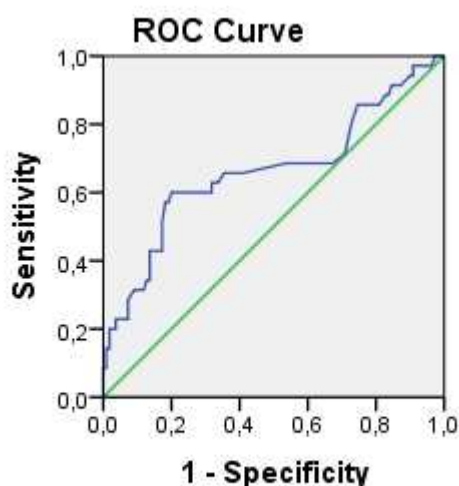
Tabela 34: Osobine ROC krivih za procenat endotel zavisne dilatacije (FMD%) i prosečnu koncentraciju lipidnih hidroperoksida (LOOH) u grupi ispitanika sa primarnim (PAFS) i grupi ispitanika sa sekundarnim AFS (SAFS)

| Varijabla | AUC | SE | p | 95% Interval poverenja |
|-----------|-------|-------|--------------|------------------------|
| LOOH/PAFS | 0,651 | 0,064 | 0,022 | 0,526 - 0,777 |
| LOOH/SAFS | 0,770 | 0,078 | 0,002 | 0,617 - 0,923 |

4.4.5. KORELACIJE ENDOTELNE DISFUNKCIJE SA ASIMETRIČNIM DIMETILARGININOM (ADMA)

Analizom svih ispitanika, utvrđeno je postojanje statistički značajne negativne korelacija FMD% sa ADMA (ρ -0,262; $p=0,002$).

ROC krive za ADMA kod FMD% su prikazane na Grafikonu 23 i osobine krive u Tabeli 35.



Diagonal segments are produced by ties.

Grafikon 23: ROC kriva koncentracije asimetričnog dimetilarginina (ADMA) u odnosu na procenat endotel zavisne dilatacije (FMD%)

Tabela 35: Osobine ROC krive koncentracije asimetričnog dimetilarginina (ADMA) u odnosu na procenat endotel zavisne dilatacije (FMD%)

| AUC | SE | p | 95% Interval poverenja |
|-------|-------|--------------|------------------------|
| 0,663 | 0,059 | 0,004 | 0,547 - 0,779 |

Cut off vrednost na ROC krivi za vrednost ADMA od 0,64 ima senzitivnost od 65,7% i specifičnost od 59,1%. Sa ovom vrednosti endotel zavisna disfunkcija je prisutna kod 71,4% ispitanika ($p=0,023$).

Statistički značajne korelacije ADMA sa endotel zavisnom disfunkcijom po podgrupama ispitanika su prikazane u Tabeli 36.

Tabela 36: Korelacija koncentracije asimetričnog dimetilarginina (ADMA) i procenta endotel zavisne dilatacije (FMD%) sa podgrupama ispitanika

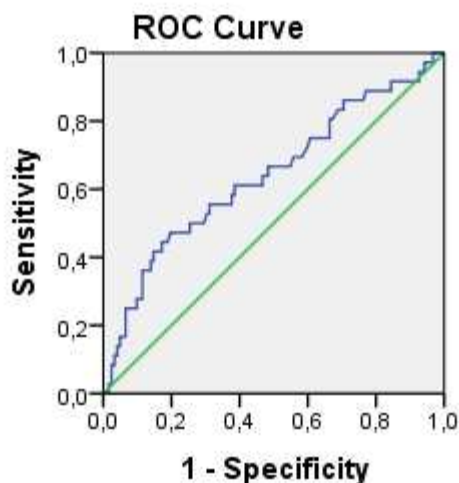
| Spearman koeficijent ρ | AFS (N=140) | PAFS (N=90) | SAFS (N=50) | Kontrolna grupa (N=40) |
|-----------------------------|-------------|-------------|-------------|------------------------|
| ADMA | 0,258** | 0,307* | 0,370** | NS |

NS – nema statističkog značaja

Spearman koeficijent ρ : * $p < 0,005$; ** $p < 0,001$

4.4.6. KORELACIJE ENDOTELNE DISFUNKCIJE SA AKTIVNOSTI HEMOSTATSKOG SISTEMA

U ispitivanoj grupi (AFS+kontrolna grupa) postoji statistički značajna negativna korelacija FMD% i d dimera ($\rho -0,182$; $p=0,023$) dok nema statistički značajnih korelacija FMD% sa parametrima ETP kao ni NMD% sa d dimerom i parametrima ETP. Odnos je analiziran preko ROC krive (Grafikon 24, Tabela 37).



Diagonal segments are produced by ties.

Grafikonu 24: ROC krive koncentracije d dimera u odnosu na procenat endotel zavisne dilatacije (FMD%)

Tabeli 37: Osobine ROC krive koncentracije d dimera u odnosu na procenat endotel zavisne dilatacije (FMD%)

| AUC | SE | p | 95% Interval poverenja |
|-------|-------|--------------|------------------------|
| 0,640 | 0,056 | 0,011 | 0,531 - 0,749 |

Cut off vrednost na ROC krivi za vrednost d dimera od 368,6 ima senzitivnost od 61,1% i specifičnost od 62,5%. Sa ovom vrednosti endotel zavisna disfunkcija je prisutna kod 61,1% ispitanika (p=0,016).

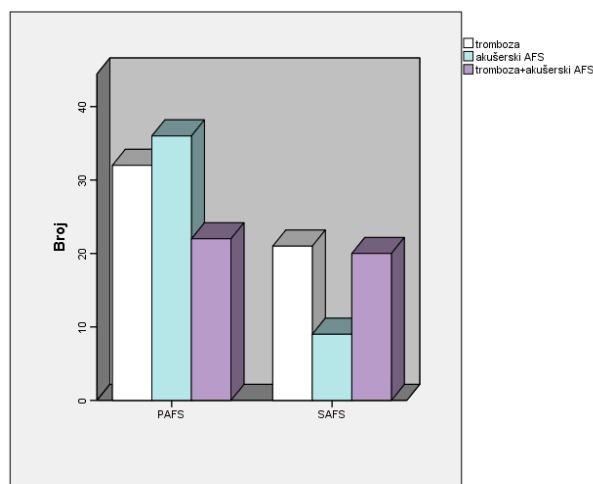
Parametri merenja ETP nemaju statistički značajnih korelacija sa FMD% i NMD% ni u jednoj od posmatranih grupa.

4.5. KLINIČKE MANIFESTACIJE AFS

Analizirane su kliničke manifestacije AFS kod pacijenata sa PAFS i SAFS. Postojala je statistički značajna razlika (p=0,02) u ukupnom ispoljavanju kliničkih manifestacija što je prikazano na Tabeli 38 i Grafikonu 25.

Tabela 38: Učestalost kliničkih manifestacija antifosfolipidnog sindroma (AFS) kod pacijenata sa primarnim (PAFS) i sekundarnim (SAFS) AFS

| Obeležje | PAFS - N (%) | SAFS - N (%) | Ukupno - N (%) |
|---------------------------------|--------------|--------------|----------------|
| Tromboza | 32 (35,6%) | 21 (42%) | 53 (37,9%) |
| Akušerski AFS | 36 (40%) | 9 (18%) | 45 (32,1%) |
| Tromboza + akušerski AFS | 22 (24,4%) | 20 (40%) | 42 (30%) |
| Ukupno | 90 (100%) | 50 (100%) | 140 (100%) |



Grafikon 25: Učestalost kliničkih manifestacija antifosfolipidnog sindroma (AFS)

Obzirom na AFS pacijente koji su imali i trombozu i akušerski AFS analizirana je distribucija pojedinačnih kliničkih manifestacija AFS pacijenata, prisutan trombotični događaj ili akušerska patologija AFS i prikazana u Tabeli 39.

Tabela 39: Razlika učestalosti pojedinačnih kliničkih manifestacija antifosfolipidnog sindroma (AFS) kod pacijenata sa primarnim (PAFS) i sekundarnim (SAFS) AFS

| Obeležje | PAFS - N (%) | SAFS - N (%) | P vrednost |
|----------------------|--------------|--------------|--------------|
| Tromboza | 53 (58,9%) | 40 (80%) | 0,011 |
| Arterijska | 28 (31,5%) | 28 (56%) | 0,005 |
| Venska | 38 (42,7%) | 23 (46%) | 0,706 |
| Akušerski AFS | 58 (75,3%) | 26 (60,5%) | 0,142 |

Analizirana je lokalizacija i prevalenca trombotičnog događaja kod pacijenata sa PAFS i SAFS. Najčešće mesto venske tromboze kod pacijenata sa PAFS bile su duboke i površinske vene donjih ekstremiteta (36%), kao i kod pacijenata sa SAFS (32%). Najčešće arterijske tromboze su dijagnostikovane u arterijskom moždanom koritu i to kod 37,1% pacijenata sa PAFS i 74% pacijenata sa SAFS (Tabela 40). Statistički značajna razlika između PAFS i SAFS pacijenata postojala je u prevalenci venske tromboze lokalizovane u gornjim ekstremitetima i emboliji pluća, a arterijskih tromboza u tranzitornom ishemijskom ataku (TIA).

Tabela 40: Razlika učestalosti lokalizacija tromboze kod ispitanika sa primarnim (PAFS) i sekundarnim antifosfolipidnim sindromom (SAFS)

| Obeležje | PAFS N (%) | SAFS N (%) | p vrednost |
|----------------------------|------------|------------|--------------|
| <i>VENSKE TROMBOZE</i> | | | |
| Gornji ekstremitet | 7 (7,9%) | 0 | 0,042 |
| Donji ekstremitet | 8 (9%) | 6 (12%) | 0,571 |
| duboka tromboza | | | |
| Donji ekstremitet | 24 (27%) | 10 (20%) | 0,359 |
| površna tromboza | | | |
| Embolija pluća | 22 (24,7%) | 5 (10%) | 0,035 |
| <i>ARTERIJSKE TROMBOZE</i> | | | |
| Gornji ekstremitet | 4 (4,5%) | 1 (2%) | 0,449 |
| Donji ekstremitet | 4 (4,5%) | 8 (16%) | 0,031 |
| Moždani udar | 17 (19,1%) | 15 (30%) | 0,752 |
| TIA | 16 (18%) | 22 (44%) | 0,001 |
| Infarkt miokarda | 3 (3,4%) | 1 (2%) | 0,643 |
| Retinalna arterija | 4 (4,4%) | 0 | 0,237 |
| Renalna arterija | 2 (2,2%) | 1 (2%) | 0,752 |

Od prisutnih urođenih trombofilija postoji značajna statistička korelacija tromboze sa nedostatkom proteina S (ρ 0,176, $p=0,049$) i mutacijom FII20210 (ρ 0,176, $p=0,035$). Međutim, sa prethodnom anamnezom gubitka ploda postoje značajne statističke korelacije sa rezistencijom na aktivirani protein C (ρ -0,204, $p=0,036$), mutacijom FII20210 (ρ -0,272, $p=0,005$) i mutacijom FV Leiden (ρ -0,222, $p=0,022$).

4.5.1. KORELACIJE TROMBOZE SA KLASIČNIM FAKTORIMA RIZIKA

Korelacije prethodnog trombotičnog događaja sa klasičnim faktorima rizika su prikazane u Tabeli 41. Navika pušenja, koncentracija triglicerida i HDL nemaju statistički značajnih korelacija.

Tabela 41: Korelacije trombotičnog događaja sa klasičnim faktorima rizika

| Spearman (ρ) | tromboza | arterijska | venska |
|---------------------|----------|------------|---------|
| starost | 0,496** | 0,345** | 0,310** |
| gojaznost | 0,318** | NS | 0,244** |
| hipertenzija | -0,291** | -0,239** | NS |
| dijabetes | -0,172* | NS | NS |
| holesterol | 0,208* | NS | 0,206* |
| LDL | NS | NS | 0,231* |

NS – nema statističkog značaja

Spearman koeficijent ρ : * $p < 0,005$; ** $p < 0,001$

Logističkom regresijom za pojedinačne parametre se izdvaja starost po svakoj kategoriji što je prikazano u Tabeli 42.

Tabela 42: Rezultat logističke regresije po događaju (tromboza/arterijska/venska)

| | B | SE | Wald | p | Exp(B) | 95% poverenja | Interval |
|------------|--------|-------|-------|--------------|--------|------------------|----------|
| Tromboza | | | | | | | |
| Starost | -0,075 | 0,037 | 4,155 | 0,042 | 0,928 | 0,863 | 0,997 |
| Arterijska | | | | | | | |
| Satrost | 0,072 | 0,029 | 6,188 | 0,013 | 1,075 | 1,015 | 1,137 |
| Venska | | | | | | | |
| Starost | -0,106 | 0,035 | 9,103 | 0,003 | 0,900 | 0,840 | 0,964 |

4.5.2. KORELACIJE TROMBOZE SA VRSTOM I TITROM aFL

U grupi pacijenata sa AFS zabeleženo je 93 (66,4%) trombotičnih događaja.

Analizirana je učestalost tromboza (vrste i lokalizacija) sa vrstom aFL (Tabela 43). U grupi venskih tromboza, postoji statistički značajna razlika za LA pozitivnost za celu grupu venskih tromboza ($p=0,021$) kao i u grupi površnih tromboflebitisa donjih ekstremiteta ($p=0,005$). U grupi arterijskih lokalizacija, aKL IgG ($p=0,037$) i β 2GPI IgM su značajni za arterijsku trombozu donjeg ekstremiteta; β 2GPI IgG za TIA ($p=0,032$) i aKL IgG za infarkt miokarda ($p=0,050$).

Tabela 43: Prikaz statističke značajnosti prema vrsti antifosfolipidnog antitela (aFL) i trombozi (vrsta i lokalizacija)

| Obeležje | aKL IgM | aKL IgG | β 2GPI IgM | β 2GPI IgG | LA |
|------------------------------|---------|--------------|---------------------|---------------------|--------------|
| Tromboza | 0,513 | 0,369 | 0,309 | 0,371 | 0,257 |
| Venska | 0,187 | 0,402 | 0,830 | 0,380 | 0,021 |
| Gornji ekstremitet | 0,167 | 0,286 | 0,950 | 0,987 | 0,684 |
| Donji ekstremitet duboka | 0,414 | 0,673 | 0,104 | 0,586 | 0,554 |
| Donji ekstremitet površna | 0,353 | 0,346 | 0,381 | 0,355 | 0,005 |
| Embolija pluća | 0,125 | 0,387 | 0,324 | 0,148 | 0,798 |
| Arterijska | 0,768 | 0,084 | 0,203 | 0,523 | 0,944 |
| Gornji ekstremitet | 0,524 | 0,591 | 0,399 | 0,439 | 0,167 |
| Donji ekstremitet | 0,817 | 0,037 | 0,049 | 0,061 | 0,983 |
| Moždani udar | 0,914 | 0,816 | 0,171 | 0,089 | 0,963 |
| TIA | 0,568 | 0,616 | 0,110 | 0,032 | 0,478 |
| Infarkt miokarda | 0,872 | 0,049 | 0,086 | 0,779 | 0,303 |
| Retinalna arterija | 0,388 | 0,348 | 0,197 | 0,395 | 0,613 |
| Renalna arterija | 0,430 | 0,511 | 0,059 | 0,369 | 0,129 |

Analizirana je učestalost tromboza (arterijskih i venskih) u odnosu na kategoriju aFL i nije zabeležena statistička značajnost (Tabela 44).

Tabela 44: Razlika učestalosti vrste trombotičnog događaja u odnosu na kategoriju antifosfolipidnog antitela (aFL)

| Obeležje | I | IIa | IIb | IIc | p vrednost |
|------------|-------|-------|-------|-------|------------|
| Tromboza | 67 | 6 | 12 | 8 | 0,428 |
| (N/%) | 69,8% | 54,5% | 54,5% | 72,7% | |
| Arterijska | 41 | 3 | 9 | 3 | 0,598 |
| (N/%) | 43,2% | 27,3% | 40,9% | 27,3% | |
| Venska | 44 | 4 | 6 | 5 | 0,413 |
| (N/%) | 46,3% | 36,4% | 27,3% | 45,5% | |

Međutim, kod pacijenata sa trojno pozitivnim aFL postoji statistički značajna razlika u ukupnom broju tromboza ($p=0,006$) kao i prethodnoj venskoj trombozi ($p=0,002$).

Titrovi različitih vrsta antitela uglavnom nisu korelirali sa prevalencom tromboza, tj. nije bilo statistički značajne razlike u prevalenci tromboza kod pacijenata sa niskim ($<11-40\text{mg/ml}$), srednjim ($41-99\text{mg/ml}$) i visokim titrom aFL ($>100\text{mg/ml}$) što je prikazano u Tabeli 45.

Analiza titra pojedinačnih vrsta antitela u odnosu na lokalizaciju tromboze pokazala je statistički značajnu razliku u pojavi površnog tromboflebitisa sa višim titrom aKL IgM ($p=0,045$) i venske tromboze gornjeg ekstremiteta sa srednjim titrom aKL IgG ($p=0,032$). Visok titar $\beta 2\text{GPI IgG}$ se statistički značajno češće nalazi kod pacijenata sa površnim tromboflebitisom ($p=0,021$) i arterijskom trombozom donjeg ekstremiteta ($p=0,032$).

Tabela 45: Prikaz statističke značajnosti razlika titra antifosfolipidnih antitela (aFL) i trombotičnog događaja (arterijska/venska tromboza) kod pacijenata sa AFS

| Titar | Nizak | Srednji | Visok | p vrednost | Nizak | Srednji | Visok | p vrednost | |
|------------|---------------|---------------|--------------|---------------|---------------|--------------|---------------|---------------|--|
| aKL IgM | | | | | aKL IgG | | | | |
| Tromboza | 36 (72%) | 9 (18%) | 5 (10%) | 0,118 | 30 (58,8) | 13 (25,5) | 8 (15,7) | 0,472 | |
| Arterijska | 25 (73,5%) | 5 (14,7%) | 4 (11,8) | 0,139 | 19 (55,9%) | 8 (23,5%) | 7 (20,6%) | 0,357 | |
| Venska | 21 (70%) | 6 (20%) | 3 (10%) | 0,663 | 19 (57,6%) | 8 (24,2%) | 6 (18,2%) | 0,590 | |
| β2GP IgM | | | | | β2GP IgG | | | | |
| Tromboza | 23 (53,5%) | 11 (25,6%) | 9 (20,9%) | 0,501 | 26 (60,5%) | 6 (14%) | 11 (25,6%) | 0,611 | |
| Arterijska | 13 (48,1%) | 7 (25,9%) | 7 (25,9%) | 0,390 | 13 (50%) | 3 (11,5%) | 10 (38,5%) | 0,044 | |
| Venska | 14 (56%) | 6 (24%) | 5 (20%) | 0,952 | 16 (57,1%) | 5 (17,9%) | 7 (25%) | 0,875 | |

4.5.3. KORELACIJE TROMBOZE SA OSTALIM LABORATORIJSKIM PARAMETRIMA

Korelacije prethodnog trombotičnog događaja sa ostalim laboratorijskim parametrima su prikazane u Tabeli 46. Nije utvrđena statistički značajna korelacija hsCRP, ADMA i PON1 sa prethodnom trombozom kod AFS bolesnika.

Tabela 46: Korelacija trombotičnog događaja sa ostalim laboratorijskim parametrima

| Spearman (ρ) | tromboza | arterijska | venska |
|---------------------|----------|------------|--------|
| trombocitopenija | 0,188* | NS | NS |
| NLR | 0,213* | NS | NS |
| LOOH | 0,239** | NS | NS |
| AOPP | 0,246** | NS | 0,168* |
| SH | -0,171* | NS | NS |
| D dimer | 0,191* | NS | NS |
| AUC | NS | NS | 0,234* |
| Cmax | NS | NS | NS |
| t _{lag} | NS | NS | NS |
| t _{max} | NS | NS | 0,221* |

NS – nema statističkog značaja

Spearman koeficijent ρ : * $p < 0,005$; ** $p < 0,001$

Logističkom regresijom za pojedinačne parametre (tromboza, venska, arterijska) nisu dobijene statističke značajnosti.

4.6. ENDOTELNA DISFUNKCIJA I TROMBOTIČNI DOGAĐAJ

Statističke korelacije FMD% ili NMD% sa prethodnom kliničkom manifestacijom AFS (gubitak ploda ili tromboza) su prikazane u Tabeli 47.

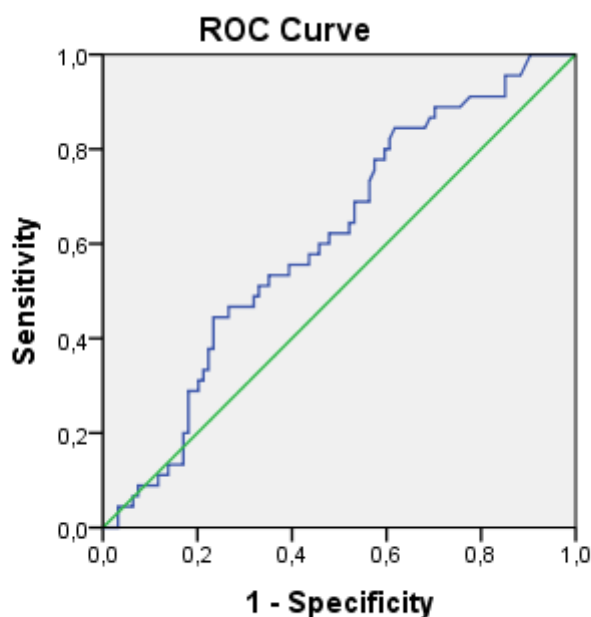
Tabela 47: Korelacije procenta endotel zavisne dilatacije (FMD%) i procenta endotel nezavisne dilatacije (NMD%) sa mestom prethodnog trombotičnog događaja

| | FMD% | | NMD% | |
|--------------------------|----------------------|--------------|----------------------|--------------|
| | Spearman koeficijent | p | Spearman koeficijent | p |
| Gubitak ploda | NS | | NS | |
| Tromboza | -0,176 | 0,038 | NS | |
| VENSKA tromboza | NS | | NS | |
| Gornji ekstremitet | -0,222 | 0,009 | -0,216 | 0,011 |
| Donji duboka ekstremitet | NS | | NS | |
| površna ekstremitet | NS | | NS | |
| Embolija pluća | NS | | -0,190 | 0,026 |
| ARTERIJSKA tromboza | NS | | NS | |
| Gornji ekstremitet | 0,201 | 0,018 | NS | |
| Donji ekstremitet | NS | | NS | |
| Moždani udar | -0,199 | 0,019 | -0,172 | 0,044 |
| TIA | NS | | NS | |
| Infarkt miokarda | NS | | NS | |

NS – nema statističke značajnosti

Može se zaključiti da kod pacijenata sa AFS endotel zavisna dilatacija korelira sa nastankom tromboze uopšte.

Na ROC krivi je prikazana zavisnost FMD% i prethodnog prisustva tromboza kao kliničke manifestacije AFS (Grafikon 26, Tabela 48). Najbolja *cut off* vrednost od 6,85% za FMD% ima senzitivnost od 73% i specifičnost od 45%.



Diagonal segments are produced by ties.

Grafikon 26: ROC kriva procenta endotel zavisne dilatacije (FMD%) i prethodne tromboze

Tabela 48: Osobine ROC krive procenta endotel zavisne dilatacije (FMD%) i prethodne tromboze

| AUC | SE | p | 95% Interval poverenja |
|-------|-------|-------|------------------------|
| 0,609 | 0,049 | 0,038 | 0,512-0,705 |

Iz gore navedenog se može zaključiti i da je manje od 10% promene protoka kod endotel zavisne dilatacije (koja je u ovom ispitivanju bila granica za utvrđivanje prisustva endotel zavisne disfunkcije) dovoljna kao okidač nastanka tromboze.

Iz prethodnih poglavlja se utvrđuje da su starost, povišena koncentracija LOOH, AOPP i ADMA glavni faktori rizika za nastanak endotel zavisne disfunkcije. U regresionom modelu izdvajaju se dva: starost i LOOH (Tabela 49).

Tabela 49: Rezultat regresione analize za endotel zavisnu disfunkciju

| | B | SE | Wald | p | Exp(B) | 95% poverenja | Interval |
|---------|--------|-------|-------|--------------|--------|------------------|----------|
| Starost | 0,69 | 0,023 | 9,238 | 0,002 | 1,072 | 1,025 | 1,121 |
| LOOH | 0,058 | 0,026 | 4,827 | 0,028 | 1,060 | 1,006 | 1,116 |
| AOPP | -0,027 | 0,034 | 0,616 | 0,433 | 0,975 | 0,911 | 1,041 |
| ADMA | 0,393 | 0,208 | 3,569 | 0,059 | 1,481 | 0,985 | 2,226 |

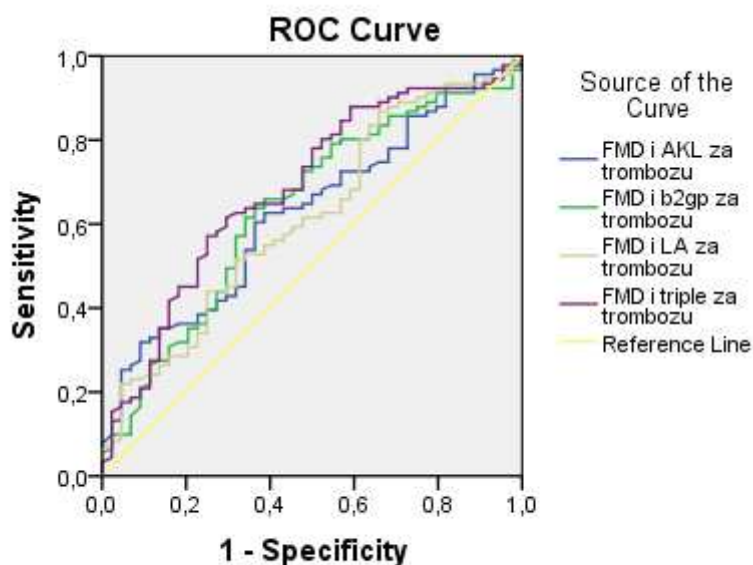
Od mnogih faktora koji koreliraju sa nastankom tromboze, logističkom regresijom se izdvaja starost kao nezavisni prediktor, dok ostale varijable nemaju nezavisnog značaja. Obzirom da je endotel zavisna disfunkcija prethodnik tromboze, u regresionom modelu su posmatrane FMD% i starost kao varijable u nastanku tromboze, ali nijedna se nije izdvojila kao prediktor ovog događaja (Tabela 50).

Tabela 50: Rezultat regresione analize za nastanak tromboze

| | B | SE | Wald | p | Exp(B) | 95% Interval poverenja |
|---------|-------|-------|-------|-------|--------|---------------------------|
| Starost | 0,033 | 0,020 | 2,730 | 0,098 | 1,034 | 0,994 1,076 |
| FMD% | 0,032 | 0,503 | 0,004 | 0,950 | 1,032 | 0,385 2,764 |

Ono što izdvaja ispitanike sa AFS jeste prisustvo aFL. U ovoj studiji, aFL nisu pokazala direktan efekat na nastanak endotelne disfunkcije, ali su pokazane korelacije aKL (IgM i IgG) i β 2GPI (IgG) sa hsCRP, ADMA, d dimerom i AOPP što znači da je njihov uticaj na endotel značajan. Takođe, direktan uticaj na vensku trombozu ima LA, ali gore navedena aKL i β 2GPI antitela imaju uticaj u nastanku arterijskih tromboza.

U nastavku je prikazan model ROC analize za nastanak tromboze kada se posmatra zajednički efekat FMD% i pojedinačne pozitivne vrste antitela kao i trostruka pozitivnost aFL (Grafikon 27 i osobine krive u Tabeli 51).



Diagonal segments are produced by ties.

Grafikon 27: ROC kriva za nastanak tromboze zavisno od zajedničkog efekta procenta endotel zavisne dilatacije (FMD%) i pojedinačne vrste antifosfolipidnog antitela (aFL)

Tabela 51: Osobine ROC krivih iz grafikona 26

| | AUC | SE | p | 95% Interval poverenja |
|---------------------------------|-------|-------|--------------|------------------------|
| FMD i aKL | 0,626 | 0,049 | 0,018 | 0,530-0,723 |
| FMD i β 2GPI | 0,638 | 0,051 | 0,010 | 0,538-0,738 |
| FMD i LA | 0,615 | 0,051 | 0,031 | 0,514-0,715 |
| FMD i trostruka pozitivnost aFL | 0,685 | 0,049 | 0,001 | 0,589-0,781 |

Iako nema direktnog uticaja aFL na FMD ovim se dokazuje njihov sinergistički efekat na endotel u pravcu nastanka tromboze kod ispitanika sa AFS ali i da je trojna aFL pozitivnost sa prisutnom endotel zavisnom disfunkcijom najjači faktor u nastanku tromboze.

V DISKUSIJA

Konsenzus za dijagnozu AFS (Hughesov sindrom) je jedna ili više epizoda tromboze arterija, vena ili malih krvnih sudova i/ili komplikacije trudnoće, uz laboratorijski kriterijumi (manje od 5 godina od kliničke manifestacije) pozitivnosti aFL dva ili više puta u razmaku od najmanje 12 nedelja^{19,20}. AFS može biti primarni (PAFS) kada se ispoljava samostalno, zatim u okviru nekog drugog patološkog stanja ili bolesti, prvenstveno sistemskog eritemskog lupusa (SAFS) i kao težak oblik katastrofičnog AFS²⁸⁻³¹ koji po kriterijumima predstavlja istovremenu zahvaćenost najmanje tri organa ili tkiva. Preporuka je da se ne pravi razlika između primarnog i sekundarnog AFS zato što nije poznato da li su AFS i SEL dve bolesti koje koindiciiraju kod jedne osobe, ili je postojeći SEL osnova za razvoj AFS, ili su AFS i SEL dva elementa istog procesa. Sekundarni i primarni AFS se ne mogu uvek razlikovati pošto imaju zajedničke kliničke i serološke manifestacije²⁷.

Ova studija obuhvatila je ukupno 180 ispitanika. Od toga je bilo 90 ispitanika sa PAFS i 50 ispitanika sa AFS u sklopu sistemskog eritemskog lupusa (SEL) kao i 40 zdravih ispitanika (bez pozitivne anamneze na trombozu, gubitak ploda i bez pozitivnosti na aFL). U ispitivanju su učestvovala prevažno osobe ženskog pola bez značajne razlike u odnosu na starost među grupama.

U dosadašnjim istraživanjima o AFS nije dobijen odgovor na pitanje da li je tromboza primarno problem endotela, da li je ona stalno prisutan ili povremeni rizik ili postoje drugi faktori tipa inflamacije, urođenih stanja koji imaju uticaja na „snagu“ različitih aFL. Zbog toga je cilj ovog istraživanja bio bolji uvid u etiopatogenezu AFS kvantifikacijom rizika putem kombinacije laboratorijskih nalaza i kliničke slike. Analiziran je odnos endotelne funkcije i prethodne tromboze prema klasičnim kardiovaskularnim faktorima rizika (gojaznosti, hipertenzije, pušenja, dijabetesa i hiperlipoproteinemije), prisustvu urođenih trombofilija (nedostatak proteina C, proteina S, rezistencije na aktivirani protein C, mutacije FII20210, mutacije MTHFR (C677T),

mutacije FV Leiden), prisustvu vrste i titra aFL, parametrima zapaljenja, parametrima oksidativnog stresa, koncentraciji ADMA i aktivnosti hemostatskog sistema (prema vrednostima d dimera i parametrima ETP) kao i direktan odnos između nađene endotelne disfunkcije i tromboze kod ispitanika sa AFS.

Uporednom analizom ispitivanih grupa, nije utvrđeno postojanje značajne razlike kada je reč o klasičnim kardiovaskularnim faktorima rizika, osnovnim demografskim karakteristikama niti vrednostima lipidnih frakcija, što ukazuje na odsustvo negativnog uticaja imunomodulirajuće terapije (uključujući i kortikosteroidnu), na lipidni status bolesnika sa SAFS. Takođe, nije bilo razlike u laboratorijskim pokazateljima funkcije jetre i bubrega među grupama.

Posebnu pažnju u našem istraživanju privlači uporedna analiza kontrolne grupe (i PAFS) sa grupom SAFS. Koncept ateroskleroze kao inflamatorne i autoimune bolesti doprineo je razumevanju ubrzane ateroskleroze kod bolesnika sa autoimunim oboljenjima, pre svega kod bolesnika sa reumatskim autoimunim oboljenjima kod kojih niska prevalenca Framingamskih klasičnih faktora rizika istu nije mogla u potpunosti da objasni^{177,178,179}. Ovaj koncept u potpunosti je prihvaćen i kada je reč od AFS-u. Kao što se zna, bolesnici sa SEL imaju ubranu aterosklerozu u sklopu osnovne bolesti, kao i povećan rizik za aterosklerozu zbog neophodnog terapijskog tretmana kortikosteroidima. Terapija kortikosteroidima pospešuje aterosklerotski proces iz više razloga: loše utiče na lipidni status (povećavaju nivo ukupnog holesterola, ApoB triglicerida, naročito kada se koriste u većim dozama), ima hipertenzivno dejstvo i pogoršava glikoregulaciju. Međutim, rezultati nekih studija pokazali su da bolesnici lečeni malim dozama kortikosteroida imaju nižu prevalencu plakova na karotidnim arterijama što se pripisuje činjenici da je kombinacijom sa drugim imunomodulirajućim lekovima moguće postići bolju kontrolu bolesti malim dozama kortikosteroida¹⁸⁰. Pojedine podgrupe antifosfolipidnih antitela, kao što su aKL, pokazuju afinitet prema oksidativno modulisanim LDL partikulama. Imajući u vidu jednu od centralnih uloga LDL partikula, posebno modifikovanih LDL partikula (oksidativno modulisanih, glikozilovanih itd.) u patogenezi aterogeneze, postoji mogućnost da antifosfolipidna antitela imaju ulogu i u ovom procesu (povećavaju influks modifikovanih LDL

partikula u subendotelni prostor)^{181,182}. Hronična inflamacija u AFS-u i prisustvo aFL dovode do aktivacije endotelne ćelije i povećavaju ekspresiju adhezivnih molekula na njima i sekreciju citokina. Time ova antitela povećavaju adheziju leukocita za endotelne ćelije i aktiviraju degranulaciju neutrofilnih leukocita što prouzrokuje nastanak endotelne disfunkcije u prisustvu aFL. Endotelna disfunkcija je inicijalni događaj u procesu aterogeneze koja može biti uvod u nastanak tromboze. Takođe, u objavljenoj publikaciji Perez-Sanchez i sar. ukazuje se na postojanje genetske predispozicije za pojavu kardiovaskularnih manifestacija kod bolesnika sa AFS-om te da je prisustvo aKL IgG antitela nezavisan prediktor razvoja ateroskleroze i tromboze kod SLE bolesnika sa AFS-om¹⁸³. U našoj grupi pacijenata sa SAFS nije bilo razlike u prisustvu klasičnih kardiovaskularnih faktora rizika. Veća učestalost tromboze u ovoj grupi se može tumačiti time da se bolesnici sa SEL kod kojih dođe do tromboze obavezno (ako do tada nisu) testiraju na prisustvo aFL. Sa druge strane, postavljanje dijagnoze PAFS se vrši na znatno široj populaciji (tj. vrlo često se testiraju žene sa spontanim gubicima ploda) što može objasniti zašto u našoj grupi PAFS ima znatno više regrutovanih pacijenata sa akušerskom patologijom. Međutim, mišljenja smo da adekvatan terapijski tretman, koji uključuje kombinaciju minimalnih doza kortikosteroida uz antimalarik značajno doprinosi da u grupi pacijenata sa SAFS nema recidiva tromboze.

Postojala je razlika u učestalosti nižeg broja trombocita u grupi ispitanika sa AFS, što se može objasniti činjenicom da je trombocitopenija jedan on “*non criterial*” manifestacija AFS²³. Učestalost naslednih trombofilija kod ispitanika sa AFS je odgovaralo prevalenci ovih urođenih trombofilija u literaturi¹³²⁻¹³⁵.

Kategorizacija AFS pacijenata prema broju i vrsti prisutnih aFL ustanovljena je radi utvrđivanja mogućnosti postojanja povezanosti vrste aFL sa određenim kliničkim manifestacijama a samim tim i bolje detekcije pacijenata sa povećanim rizikom od nastanka istih. Prihvaćena je klasifikacija aFL prema kategorijama: a) kategorija I, kada je prisutno više od jedne vrste antitela, b) kategorija IIa, dokazano prisustvo samo LA; c) kategorija IIb, prisutna samo aKL; d) kategorija IIc, prisutna samo anti β 2GPI³³. U našoj kohorti u obe grupe ispitivanih bolesnika najveća je bila zastupljenost bolesnika u

kategoriji I, tj. sa više od jednim aFL pozitivnim (68,7%). Iskustva su pokazala potrebu za definisanjem trostruke pozitivnosti aFL kategorije kako bi se označili AFS bolesnici sa povećanim rizikom za razvoj kliničkih manifestacija ovog sindroma³⁸⁻⁴⁰. U ovoj grupi AFS ispitanika bilo je prisutno 30% sa trostruko pozitivnim aFL bez razlike između PAFS i SAFS grupe. Prema literaturnim podacima, učestalosti pozitivnosti vrsta aFL u PAFS i SAFS su raznolike što se opravdava njihovom fluktuacijom tokom vremena kao i laboratorijskim metodama određivanja koje nisu apsolutno standardizovane^{23,54,55,184}. U ovoj grupi ispitanika sa AFS utvrđena je statistički značajna razlika prisustva visokorizičnog profila aFL, tj. češćeg i višeg titra aKL IgM i β2GPI IgG kod ispitanika sa SAFS.

Mera hsCRP ukazuje na “tinjajuće” zapaljensko stanje. Relativno visoke vrednosti kod inače zdravih ljudi su prediktor za povišen rizik od infarkta miokarda, moždanog udara, iznenadne srčane smrti i/ili periferne arterijske bolesti, dok je u kombinaciji sa povišenim LDL holesterolom razlog za uvođenje statina^{185,186}. Određivanje hsCRP se koristi u proceni aktivnosti brojnih reumatoloških oboljenja uključujući i AFS (u smislu definicije da je to “low grade” zapaljenska bolest) kao i kod SEL. Pokazane su više vrednosti hsCRP kod SAFS u odnosu na PAFS što može da se koristi u njihovom razlikovanju¹⁸⁷. Međutim, njegova primenjivost kod pacijenta sa SEL nije do kraja razjašnjena, pošto su vrednosti hsCRP kod SEL više u odnosu na zdrave, sa dvosmernom korelacijom prema aktivnosti bolesti i uvek pozitivnom korelacijom sa kardiovaskularnim faktorima rizika^{188, 189,190}. U ispitivanoj kohorti 2/3 ispitanika sa PAFS i kontrolne grupe su bili u grupi sa niskim rizikom (hsCRP<1mg/L) dok je 2/3 ispitanika sa SAFS bilo u grupi srednjeg i visokog rizika tj nije bilo razlike u vrednostima hsCRP između PAFS i kontrolne grupe, dok je ta razlika bila značajna između PAFS i SAFS ispitanika kao i SAFS i kontrolne grupe što je u skladu sa literaturnim podacima. Posebno je analiziran neutrofilno limfocitni odnos (NLR) kao faktor rizika kod AFS ispitanika u odnosu na kontrolnu grupu zbog toga što u literaturi nema podataka o ovom odnosu. U našoj grupi ispitanika nije bilo statistički značajne razlike NLR između bolesnika sa PAFS i SAFS, ali je ova razlika bila značajna u korist viših vrednosti NLR kod bolesnika sa AFS u odnosu na kontrolnu grupu. Vrednosti hsCRP i NLR pokazuju značajnu međusobnu statističku korelaciju. Zajednička osobina

ova dva markera zapaljenja su više vrednosti kod ispitanika sa AFS u odnosu na kontrolnu grupu. Međutim, hsCRP se izdvaja kao osetljiviji pokazatelj i drugih faktora rizika kao što su gojaznost, hipertenzija i hiperlipidemija. Za razliku od hsCRP koji korelira sa pozitivnošću/titrom β 2GPI IgG, NLR pokazuje pozitivnu korelaciju sa pozitivnošću/titrom aKL IgM što se ne može diskutovati zbog oskudnih podataka u literaturi.

Saglasno podacima iz literature^{62-72,76,80}, u našoj ispitivanoj grupi AFS pokazano je postojanje oksidativnog poremećaja u odnosu na kontrolnu grupu i to mereno preko oksidacije proteina (AOPP) i sniženja antioksidativnih mehanizmama (PON1 i SH) pri čemu su iste relacije prisutne i u odnosu SAFS prema PAFS grupi ispitanika. Pri tome, lipidna peroksidacija je prisutna u istoj meri kako kod AFS tako i kod ispitanika kontrolne grupe. Tradicionalni faktori rizika kao starost, gojaznost, hipertenzija, navika pušenja i dijabetes u manjoj meri utiču na oksidativni stres u odnosu na lipidne frakcije. Pozitivne korelacije triglicerida, holesterola, LDL i negativna korelacija sa HDL pomeraju balans ka oksidativnim procesima tako što povećavaju koncentracije LOOH i AOPP. Zanimljivo je da antioksidativni mehanizmi ne koreliraju sa lipidnim frakcijama. Nasuprot podacima iz literature gde aKL i β 2GPI imaju udela u poremećaju oksidativnih procesa^{68,71-73}, u našem istraživanju ova antitela remete antioksidativne mehanizme dok značajan doprinos procesima oksidacije u smislu lipidne peroksidacije daje pozitivnost LA kod AFS ispitanika. De Groot i sar su pokazali da je izvorna uloga β 2GPI u organizmu uloga "čistača" pošto skuplja mikropartikle, NO, slobodne radikale, apoptozne ćelije¹⁸. Kod ispitivane AFS kohorte dokazano je da inverzno korelira sa antioksidativnim mehanizmima (PON1 i SH).

Ames i sar^{61,107} su u nekoliko studija dokazali potencijalnu vezu AFS i bioraspoloživosti NO kod ljudi. Ova grupa autora je pokazala da koncentracija aFL inverzno korelira sa urinarnom ekskrecijom NO metabolita kao i da AFS pacijenti imaju niže nivoe plazma nitrita u odnosu na kontrolne ispitanike. U ovoj studiji smo indirektno procenjivali bioraspoloživot NO preko koncentracije ADMA. Kako je ADMA inhibitor sinteze eNOS, više koncentracije ADMA znače da je manja raspoloživost NO. Pretraživanjem literature nisu nađeni podaci o ispitivanju ADMA

kod pacijenta sa AFS, osim u radu Mayer-Pickel i sar¹⁹¹ koji su pratili koncentraciju ADMA u trudnoći žena sa prethodnom dijagnozom AFS. Ova grupa autora je pokazala da je koncentracija ADMA značajno viša u trudnoćama žena sa AFS u odnosu na zdrave trudnice, kod trudnica koje su imale emboliju pluća kao i da ADMA ne pokazuje tendenciju rasta koncentracije tokom trudnoće. Saglasno ovoj studiji, u našoj kohorti pacijenata sa AFS, koncentracija ADMA je bila značajno viša kod AFS u odnosu na kontrolnu grupu kao i kod SAFS u odnosu na PAFS. Nismo dokazali da postoji značajna korelacija ADMA sa starenjem, hipertenzijom ili hiperholesterolemijom, ali je potvrđena pozitivna korelacija sa hsCRP. U našoj studiji smo pokazali da su više koncentracije ADMA kod ispitanika sa prisutnim aKL IgG i visokim titrom β 2IgG što ne možemo da komentarišemo pošto takvih podataka nema u literaturi.

Iako nije bilo ispitanika sa dokazanim trombotičnim događajem u vreme uzorkovanja krvi za analize, vrednosti d dimera su se značajno razlikovale između ispitivanih grupa i to kako AFS i kontrolne grupa tako i PAFS prema SAFS grupi. Na vrednosti d dimera je uticala starost, hiperlipoproteinemija i hcCRP, što je bilo očekvano. U ispitivanoj grupi pacijenata sa AFS utvrđeno je postojanje pozitivne statističke značajne korelacije d dimera sa pozitivnošću aKL IgM.

Prema podacima iz literature ETP može da bude pokazatelj kako hiper tako i hipokoagulabilnog stanja¹³⁷⁻¹⁴⁵. U ispitivanoj grupi je postojala značajna razlika u parametrima ETP (AUC, Cmax, tlag i tmax) između AFS ispitanika koji su bili na terapiji oralnim antikoagulansom (OAK) i onih koji nisu. Nameće se zaključak da je ETP u praksi jako dobar pokazatelj efikasnosti OAK terapije kod pacijenata sa AFS, obzirom da nije bilo zabeleženih retromboza u ispitivanoj grupi. Svim ispitanicima koji su u terapiji imali varfarin, stepen antikoagulisanosti je izražavan u jedinicama INR. Kako LA aktivnosti može da utiče na INR, to bi neki od parametara ETP-a mogao da bude nova metoda u praćenju pacijenata na OAK (u našoj grupi deo uzorak ispitanika na OAK je bio statistički mali da bi mogao da se izvede određeni zaključak). Takođe, određivanje parametara ETP bi moglo imati velikog značaja kod pacijenata na NOAK obzirom da za nijedan od ovih novih lekova (koji imaju sve veći značaj u terapiji AFS) nema direktnih pokazatelja mere postignute antikoagulacije kod pacijenta.

Što se tiče kliničke upotrebe ETP-a ona je još u začetku. Saglasno podacima u literaturi¹⁹², u ispitivanoj grupi AUC% i Cmax su pokazali da mogu inverzno da se koriste u predstavljanju količine nastalog trombina. Takođe, korelacije tlag sa Cmax i Tmax pokazuju da što brže počne sinteza trombina to će ga se više i stvoriti. U našoj grupi ispitanika nije bilo statistički značajne razlike u brzini i količini stvaranja trombina između pacijenata sa AFS i kontrolne grupe merene ETP testom. Međutim, ta razlika je statistički značajna između grupe sa PAFS i SAFS (PAFS naprave više trombina za kraće vreme), ali nije bilo razlike u vremenu početka stvaranja trombina ni između ovih grupa. Ovo ukazuje da su parametri ETP dobri pokazatelji hiperkoagulabilnog stanja.

Zanimljivo je da nismo dokazali korelacije ETP parametara sa vrednostima ADMA kao i d dimera. Podaci u literaturi o uticaju aFL su kontraverzna¹⁴⁴⁻¹⁴⁷. U našoj studiji, pokazano je da kategorije aFL značajno utiču na količinu stvorenog trombina tj. da je u prisustvu aFL stalno aktivan proces koagulacije i postoji stalna sinteza malih količina trombina (što može biti stalni faktor rizika za trombozu). Nisu nađene korelacije parametara ETP sa rezistencijom na aktivirani protein C i mutacijom FV Leiden, što je moguće zbog malog broja ispitanika sa ovim trombofilijama.

Postojanje disfunkcije endotela ispitanika u ovoj kohorti izvršena je kliničkom procenom, tj. merenjem procenta dilatacije brahijalne arterije Doppler UZ pregledom. U ispitivanoj kohorti, nije bilo statistički značajne razlike u početnim vrednostima dijametra brahijalne arterije između ispitivanih grupa.

Prema podacima iz literature, nedvosmisleno je dokazano postojanje endotelne disfunkcije kako kod pacijenata sa PAFS tako i SAFS^{102,106-111,193}. U ispitivanoj kohorti, postojala je statistički značajna razlika u procentu endotel zavisne dilatacije (FMD%) između pacijenata sa AFS i kontrolne grupe kao i u procentu ispitanika sa disfunkcijom endotela (procenjenom kao manje od 10% promene dijametra a. brachialis) AFS pacijenata i kontrolne grupe. Poređenje procenta endotel zavisne i

endotel nezavisne dilatacije brahijalne arterije između grupa PAFS i SAFS nije pokazalo statističku značajnost.

Uzimajući u obzir urođene trombofilije nije bilo statistički značajnih korelacija sa FMD, dok postoji statistički značajna korelacija NMD sa mutacijom FV Leiden i mutacijom MTHFR. Ograničenje ove studije je u broju ispitanika obzirom na učestalost urođenih trombofilija, ali su i podaci u literaturi o ovm pitanju oskudni.

U opštoj populaciji, endotelnoj disfunkciji doprinose svi kardiovaskularni faktori rizika (hipertenzija, dislipidemija, dijabetes, starost i gojaznost). Kod ispitanika kohorte u ovoj studiji, na procenat FMD i NMD, od klasičnih faktora rizika, utiču starost, gojaznost, hipertenzija i povišeni holesterol i trigliceridi ali se kao nezavisni prediktor ističe samo starost. Analizom uticaja standardnih faktora rizika na pojedinačne grupe ispitanika (PAFS, SAFS, kontrolna grupa) zanimljivo je da hiperlipoproteinemija ima najviše uticaja na kontrolnu grupu (ali ne i kao nezavisni prediktori) dok se u grupi AFS ističe starost kao nezavisni prediktor FMD%. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima Shevchuk i sar¹⁹⁴ koji su dokazali da hipertrigliceridemija i kod PAFS i kod SAFS bolesnika značajno korelirala sa veličinom FMD. Kao što je pokazano, standardni kardiovaskularni faktori rizika, imaju podjednak uticaj i na FMD i NMD, a pacijenti sa AFS imaju poremećen FMD, to znači da postoje drugi faktori osim kardiovaskularnih faktora rizika koji utiču na pojavu endotelne disfunkcije kod pacijenata sa AFS.

Podaci iz literature koji se odnose na povezanost tipa i visine titra aFL na procenat FMD i NMD brahijalne arterije su vrlo oskudni. Kod PAFS bolesnika, endotelna disfunkcija se dovodi u vezu sa aKL i β 2GPI^{107,195}. Pokazano je da su SAFS bolesnici sa prisutnim anti β 2GPI aFL imali značajno manji procenat FMD brahijalne arterije¹⁹⁶. U našoj studiji tip, kategorija aFL kao i visina titra aFL nisu bili u značajnoj korelaciji sa veličinom FMD niti veličinom NMD.

U literaturi je pokazano da hsCRP inhibira sintezu NO (i to na nivou posttranslacije mRNA za endotelnu NO sintetazu)¹¹². Stalc i sar¹⁹⁷ su dokazali da je

endotel zavisna disfunkcija prisutna kod (S)AFS ispitanika i da korelira sa visokim vrednostima markera zapaljenja u ovoj grupi. U ispitivanoj kohorti postoji statistički značajna negativna korelacija FMD% i hsCRP ali ova veza nije uočena sa NLR kao drugog posmatranog markera zapaljenja. Nisu uočene niti korelacije NMD% ni sa jednim od njih (hsCRP i NLR). Analizom ROC krive za hsCRP i FMD% dobija se vrednost od 0,97 (senzitivnost 69,4% i specifičnost 50%) kao *cut off* i na ovoj vrednosti endotel zavisna disfunkcija je prisutna kod čak 67% ispitanika. Ovo je od velikog značaja, ako se ima u vidu da je granica za hsCRP 1mg/L ta koja deli opštu populaciju na grupe sa malim i umerenim rizikom za kardiovaskularne bolesti. Tj. ova granica je očigledno niža za pacijente sa AFS u odnosu na opštu populaciju.

U literaturi su oskudni podaci o međusobnoj povezanosti parametara oksidativnog stresa i endotelne funkcije merene kliničkim tetstom procene dilatacije a. brahialis. U ovoj kohorti, je nađeno da kod svake od pojedinačno ispitivanih grupa (AFS, PAFS, SAFS, kontrolna grupa), procenat endotel zavisne dilatacije pokazuje korelaciju sa markerima oksidativnih procesa (LOOH i AOPP) i to sa jačim uticajem lipidne peroksidacije koji se izdvaja kao nezavisni prediktor FMD%. Nije uočena veza FMD% sa antioksidativnim mehanizmima (PON1 i SH) odbrane.

NO je ključna determinanta zdravog endotela. Koncentracija NO je značajno snižena kod stalnih nosilaca aFL (kod kojih nije zabeležena tromboza) kao i kod onih koji ispunjavaju kriterijum za AFS (koji su imali trombozu) i to više kod onih koji su imali nekoliko trombotičnih događaja¹⁰⁷. Primarno mesto sinteze i jeste vaskularni zid pod kontrolom eNOS. Do promene u količini bioraspoloživog NO mogu da dovedu: 1) skraćenje života NO; 2) smanjena senzitivnost na NO; 3) smanjena ekspresija NOS ili 4) smanjena aktivnost NOS^{195,198}. Na skraćenje života NO i smanjene senzitivnosti na NO utiče oksidativni stres¹⁹⁹. U ispitivanoj kohorti, pokazano je da je oksidativni stres značajno prisutan kod AFS grupe. Pri tome, nezavisni prediktor endotel zavisne disfunkcije je lipidna peroksidacija pa bismo mogli izvući zaključak da je sigurno jedan od mehanizama endotelne disfunkcije posredovan ovim uticajem oksidativnog stresa na NO. Na aktivnost NO sintetaze utiče i β 2GPI, tj konformacionom promenom kojom se otkriva domen I može do dođe do kompletne inhibicije eNOS⁹⁴.

ADMA je direktan endogeni kompetitivni inhibitor eNOS. Više koncentracije ADMA znače manje endogeno sintetisanog NO i manju vazodilataciju. U ispitivanoj kohorti je utvrđeno postojanje statistički značajne negativne korelacije FMD% sa ADMA. *Cut off* vrednost na ROC krivi ima vrednost ADMA od 0,64 (senzitivnost 65,7% i specifičnost od 59,1%) pri čemu treba imati na umu da je ovo inače medijana vrednosti u PAFS grupi ispitanika. Sa ovom vrednosti endotel zavisna disfunkcija je prisutna kod čak 71,4% ispitanika. Takođe, po pojedinačnim grupama (PAFS, SAFS, AFS) ADMA značajno korelira sa endotelnom disfunkcijom, što nameće zaključak da kod bolesnika sa AFS postoji inicijalno manja sinteza NO.

U ispitivanoj grupi (AFS+kontrolna grupa) postoji statistički značajna negativna korelacija FMD% i d dimera dok nema statistički značajnih korelacija FMD% sa parametrima ETP kao ni NMD% sa d dimerom i parametrima ETP. *Cut off* vrednost na ROC krivi endotelne disfunkcije i vrednosti d dimera je 368,6 (senzitivnost od 61,1% i specifičnost 62,5%) i treba imati u vidu da je ona blizu srednje vrednosti PAFS grupe ispitanika. Sa ovom vrednosti endotel zavisna disfunkcija je prisutna kod 61,1% ispitanika pa sama povišena vrednost d dimera može ukazati na endotelnu disfunkciju (koja može biti preteča višim vrednostima d dimera i trombozi). Parametri merenja ETP nemaju statistički značajnih korelacija sa FMD% i NMD% ni u jednoj od posmatranih grupa.

U zaključku, disfunkcija endotela postoji kod bolesnika sa AFS u odnosu na kontrolnu grupu. Klasični faktori rizika od kojih se izdvaja starost utiču na kompletan endotel (tj i endotel zavisnu i endotel nezavisnu funkciju) kako kod zdravih tako i kod AFS ispitanika. Ovo ukazuje da postoje dodatni činioci koji doprinose endotel zavisnoj disfunkciji kod AFS ispitanika. U ovoj AFS grupi ispitanika nije dokazano da su aFL ta koja imaju direktan uticaj na endotelnu disfunkciju. Ono što je dokazano rezultatima jeste da je endotel zavisna disfunkcija posredovana manjom sintezom NO i to na dva načina. Postoji veća aktivnost ADMA kod ispitanika sa AFS kao i uticaj inflamacije koji su uzrok manje aktivnosti endotelne NO sintetaze. Takođe, oksidativni stres, prevashodno u vidu lipidne peroksidacije utiče na manju aktivnost endotelne NO sintetaze (smanjujući njegovu sintetisanu količinu) ali i manjeg oslobađanja sintetisanog

NO (tj skraćanjem njegovog poluživota). Takođe, indirektan pokazatelj endotelne disfunkcije kod pacijenata sa AFS može da bude vrednost d dimera.

Tromboze predstavljaju dijagnostički kriterijum AFS. Mogu da se jave u bilo kom delu vaskularnog korita, a recidiv uglavnom pogađa isti krvni sud. U radu Cervere i sar²⁰⁰ od 1000 bolesnika sa AFS (53,1% PAFS, 47,9% SAFS), 37,1% je imalo samo vensku trombozu, 27% samo arterijsku, i arterijsku i vensku 15,2%, samo gubitak ploda 12,1% i 8,6% trombozu u mikrocirkulaciji. U radu Camps Garzia T i sar²⁰¹ u grupi od 112 AFS bolesnika nije bilo razlike u kliničkim manifestacijama AFS-a uključujući i tip tromboze mada je u ovoj studiji starosna dob SAFS bolesnika bila značajno niža.

U ispitivanoj grupi AFS ukupna prevalenca događaja je bila slična navedenim iz literature. Zapažena je nešto viša prevalenca tromboza u grupi SAFS u odnosu na PAFS. Arterijske tromboze značajno češće su bile prisutne kod SAFS bolesnika u odnosu na PAFS bolesnike dok razlike u prevalenci venskih tromboza nije bilo. Akušerska patologija je bila češće prisutna u bolesnika sa PAFS. Najčešće mesto venske tromboze kod pacijenata sa PAFS bile su duboke i površinske vene donjih ekstremiteta (36%), kao i kod pacijenata sa SAFS (32%). Najčešće arterijske tromboze su dijagnostikovane u arterijskom moždanom koritu i to kod 37,1% pacijenata sa PAFS i 74% pacijenata sa SAFS.

Prema podacima iz literature nije nađen veći značaj naslednih trombofilija sa AFS i kliničkom slikom tromboza²⁰², dok se kod akušerske prezentacije savetuje testiranje na trombofilije²⁰³. Kod ispitivane grupe, jedan ispitanik sa AFS je imao mutaciju PS i kod njega je kao klinička manifestacija zabeležena tromboza i kod dva ispitanika sa AFS zabeležena mutacija FII20210 i kod njih je zabeležena tromboza. Međutim, sa prethodnom anamnezom gubitka ploda postoje značajne statističke korelacije sa rezistencijom na aktivirani protein C, mutacijom FII20210 i mutacijom FV Leiden.

Najčešći kardiovaskularni faktori rizika kod AFS pacijenata su hipertrigliceridemija i nizak HDL²⁰⁴. Takođe, kod AFS pacijenata je opisano prisustvo antitela na HDL (IgG anti-HDL) koji mogu da smanje antioksidantni i antiinflamatorni

efekat HDL, i na taj način favorizuju “low grade” inflamaciju i pojačanu oksidaciju u trombotskom AFS²⁰⁵. Zanimljiva je studija Giron-Gonzalez i sar²⁰⁶ koji su našli da su u grupi AFS učestaliji hiperholesterolemija (27,4%) i arterijska hipertenzija (24,2%) kao faktori rizika za arterijsku trombozu i imobilizacija (14,2%) i prethodna operacija (17,9%) kao faktori rizika za vensku trombozu. Slično, u studiji Krnic-Barrie i sar²⁰⁷ hipertenzija i hiperlipidemija bili su značajni za nastanak arterijske tromboze.

U ispitivanoj AFS grupi sa pojavom tromboze koreliraju starost, gojaznost, hipertenzija, dijabetes i hiperholesterolemija dok navika pušenja, koncentracija triglicerida i HDL nemaju statistički značajnih korelacija. Međutim, kao nezavisni prediktor tromboze uopšte kao i za svaku pojedinačnu vrstu tromboze (arterijsku/vensku) izdvaja se samo starost.

Kada je reč o opštoj populaciji učestalost venskog tromboembolizma iznosi 1-3/1000 osoba godišnje²⁰⁸. Incidenca ovih događaja značajno zavisi od starosti tako da je ekstremno retka u detinjstvu (1/100000 godišnje) i raste skoro 1% godišnje kod starijih od 50 godina. Međutim, ako se uzme u obzir da je srednja starost AFS ispitanika 42 godine, a starost nezavisni prediktor tromboze može se zaključiti da je granica fiziološke starosti mnogo niža za AFS bolesnike u odnosu na opštu populaciju.

Povezanost aFL i tromboza u literaturi je puna kontradikcija, koje su posledica istorijskih studija kada se nisu ni testirala β 2GPI aFL, nestandardizacije protokola testiranja, neujednačene visine titra koja se smatra pozitivnom ali i prirodnom fluktuacijom titra kod AFS pacijenata. Zbog toga postoji potreba za definisanjem jasnih skorova i profila rizika aFL. Nedavno je definisan GAPSS skor (Global APS Score) radi procene rizika od nastanka tromboze u AFS bolesnika²⁰⁹. Ovaj model zasnovan je na šest kliničkih pokazatelja (postojanje aKL IgG/IgM anti- β 2-glycoprotein IgG/IgM, lupus antikoagulans (LA), antiprotrombin/fosfatidilserin kompleks (aPS/PT) IgG/IgM, hipertenzija i hiperlipidemija), a najveću vrednost upravo ima prisustvo različitih tipova aFL (koji će verovatno biti i okosnica daljih istraživanja).

U ispitivanoj AFS grupi za venske tromboze najznačajnija je LA pozitivnost, dok se za arterijske tromboze izdvajaju aKL IgG i β 2GPI (IgM, IgG). Analizirana je učestalost tromboza (arterijskih i venskih) u odnosu na kategoriju aFL i nije zabeležena statistička značajnost. Međutim, kod pacijenata sa trojno pozitivnim aFL (profil visokog rizika) postoji statistički značajna razlika u ukupnom broju tromboza i zabeležim venskim trombozama. Ako se analizira titar pojedinačnih vrsta antitela sa lokalizacijom tromboze postoji statistički značajna razlika u pojavi površnog tromboflebitisa sa višim titrom aKL IgM i venske tromboze gornjeg ekstremiteta sa srednjim titrom aKL IgG. Visok titar β 2GPI IgG se statistički značajno češće nalazi kod pacijenata sa površnim tromboflebitisom i arterijskom trombozom donjeg ekstremiteta. Iz navedenog se zaključuje da je svako aFL i svaki titar aFL bitan za nastanak tromboze.

U opštoj populaciji, pokazano je da hsCRP ima ograničenu vrednost u predikciji venskog tromboembolizma^{210,211} što je potvrđeno i u ovoj ispitivanoj AFS grupi. Zanimljivo je da i ADMA nije pokazala korelacije sa prethodnom trombozom kao kliničkom prezentacijom AFS. Takođe, kod pacijenata sa AFS i trombocitopenijom bilo je više tromboza, tj. paradoksalno trombocitopenija nije zaštita od trombotičnog događaja kod AFS pacijenata. Kod pacijenata sa AFS i prethodnom trombozom prisutan je oksidativni stres u vidu pozitivnih markera oksidacije (LOOH i AOPP). Međutim, statističkom analizom se nijedan od ovih parametara nije izdvojio kao nezavisni prediktor trombotičnog događaja.

U zaključku, u nastanku tromboze kod AFS ispitanika značajni su kardiovaskularni faktori rizika, ali se izdvaja starost sa mnogo nižom fiziološkom granicom kao faktor rizika tromboze nego što je zabeleženo u opštoj populaciji. Uvidom u naše rezultate ne možemo sa sigurnošću komentarisati ulogu naslednih trombofilija zbog malog broja pozitivnih ispitanika. Međutim, kako je reč o mlađim pacijentima sa dužom očekivanom starošću a pokazali smo da im je fiziološka granica starosti za trombozu niža, savetuje se testiranje ovih pacijenata na urođene trombofilije kako bi praćenje ovih rezultata u dužem vremenskom periodu moglo ukazati na opravdanost ovog testiranja. Dokazali smo da trombozi kod ispitanika sa AFS prethodi endotelna disfunkcija,

prisustvo inflamacije, oksidativni stres ali da nijedan od ovih faktora nije pojedinačni okidač tromboze. Međutim, značajno je da bilo koje aFL u bilo kom titru može da bude faktor rizika nastanka tromboze. U našoj studiji, pokazano je da kategorije aFL značajno utiču na količinu stvorenog trombina tj. da je u prisustvu aFL stalno aktivan proces koagulacije i postoji stalna sinteza malih količina trombina što opravdava činjenicu da prisustvo bilo kog aFL u bilo kom titru može biti stalni faktor rizika za nastanak tromboze.

U našoj ispitivanoj grupi AFS može se zaključiti da endotel zavisna disfunkcija korelira sa nastankom tromboze uopšte. Analizom ROC krive i *cut off* vrednosti za trombozu u odnosu na FMD% dobija se vrednost od 6,85% (senzitivnost 73%, specifičnost od 45%). Po preporukama iz literature^{174,175} koristi se arbitrarna granica od 10% promene FMD% da bi se zaključilo da postoji disfunkcija endotela koja je korišćena i u ovoj studiji. Međutim, kao što se vidi ta granica je znatno niža od 10% da bi bila faktor rizika za nastanak tromboze.

Kao glavni faktori za nastanak endotel zavisne disfunkcije endotela izdvajaju se starost, povišena koncentracija LOOH, AOPP i ADMA od kojih se kao nezavisni prediktori izdvajaju dva: starost i LOOH.

Od mnogih faktora koji koreliraju sa nastankom tromboze, kao nezavistan prediktor izdvaja se samo starost, ali kao što je pokazano sa granicom znatno nižom od granice starosti u opštoj populaciji koja je rizik za trombozu. Ako se predikcionom modelu za nastanak tromboze koriste endotel zavisna disfunkcija i starost nijedna se ne izdvaja kao nezavisan činilac tromboze.

Ono što razlikuje AFS ispitanike od opšte populacije jeste prisustvo aFL. U ovoj studiji, aFL nisu pokazala direktan efekat na nastanak endotelne disfunkcije, ali su pokazane korelacije aKL (IgM i IgG) i β_2 GPI (IgG) sa hsCRP, ADMA, d dimerom i AOPP što znači da je njihov uticaj na endotel značajan. Takođe, bilo koja vrsta aFL i u bilo kom titru su značajna za nastanak tromboze.

Zbog toga je postavljen predikcioni model za nastanak tromboze kada se posmatra sinergistički efekat FMD% i pojedinačne vrste aFL kao i njihova trostruka pozitivnost kojim se može zaključiti da iako nema direktnog uticaja aFL na FMD ovim se dokazuje njihov sinergistički efekat na endotel u pravcu nastanka tromboze kod ispitanika sa AFS ali i da je trojna aFL pozitivnost sa prisutnom endotel zavisnom disfunkcijom najjači faktor u nastanku tromboze.

VI ZAKLJUČCI

1. Bolesnici sa antifosfolipidnim sindromom značajno češće imaju prisutnu disfunkciju endotela procenjenu merenjem dilatacije brahijalne arterije u odnosu na kontrolnu grupu. Između ispitivanih grupa AFS bolesnika nije bilo razlike kada je reč o procentu endotel zavisne (FMD) i endotel nezavisne (NMD) dilatacije.

2. Pokazali smo da u našoj kohorti bolesnika sa AFS postoji visoko statistički značajna korelacija endotel zavisne funkcije sa starosnom dobi ispitanika, hipertenzijom i vrednostima triglicerida, dok je u kontrolnoj grupi postojala značajna korelacija sa hiperlipoproteinemijom.

3. Antifosfolipidna antitela nisu pokazala da imaju direktnog efekta u nastanku endotel zavisne disfunkcije.

4. U našoj studiji, značajan uticaj na endotel zavisnu disfunkciju kod bolesnika sa AFS imao je hsCRP kao marker zapaljenja, i to u vrednostima i manjim od 1mg/L (10mg/dL). Takođe, postojala je visoko statistički značajna korelacija endotel zavisne funkcije sa koncentracijom asimetričnog dimetilarginina.

5. Kod ispitanika ove studije, kako bolesnika sa AFS tako i kontrolne grupe, nađeno je da su lipidni hidroperoksidi imali nezavisan uticaj na nastanak endotelne zavisne disfunkcije.

6. Rezultati ove studije pokazali su da endotel zavisna disfunkcija prethodi nastanku tromboze kod ispitanika sa antifosfolipidnim sindromom. Statističkom analizom je pokazano da je za nastanak tromboze dovoljna i minimalna disfunkcija endotela, tj. i manje od usvojene granice od 10% za promenu dilatacije a. brahialis.

7. Naša studija je pokazala da endotel zavisna disfunkcija nije nezavistan prediktor u nastanku tromboze već efekat ostvaruje u prisustvu antifosfolipidnih antitela.

8. Kada je reč o kriterijumima dijagnoze, u našoj kohorti SAFS bolesnici su češće imali arterijske tromboze u odnosu na PAFS bolesnike dok razlike u prevalenci venskih tromboza nije bilo. Prosečne vrednosti titra aKL IgM i titra anti β 2GPI IgG su bile značajno veće u SAFS grupi. Bolesnici obe grupe (PAFS i SAFS) su najčešće imali veći broj antifosfolipidnih antitela od jednog, odnosno pripadali "Kategoriji I".

9. Prisustvo bilo koje vrste i titra antifosfolipidnih antitela u našoj studiji je bilo značajno povezano sa prethodnom trombozom.

10. Prethodni trombotični događaj je pokazao korelaciju sa klasičnim faktorima rizika (gojaznost, hipertenzija, dijabetes i poremećen lipidogram) tako da je potrebna stroga prevencija ovih faktora rizika.

11. U našoj studiji se kod AFS bolesnika starosna dob se izdvojila kao nezavisni prediktor tromboze. Obzirom da je srednja starost u ovoj grupi bila 42 godine, može se zaključiti da je granica fiziološke starosti kao rizika za nastanak tromboze znatno niža u odnosu na opštu populaciju. AFS bolesnici sa trombocitopenijom mogu da imaju trombozu kao kliničku manifestaciju.

12. Prosečne vrednosti markera zapaljenja praćenih u ovoj studiji kod bolesnika sa AFS, hsCRP i neutrofilno limfocitni odnos, su bili značajno viši u odnosu na kontrolnu grupu. Takođe, markeri zapaljenja su bili viši u SAFS u odnosu na PAFS grupu. Na održavanje pozitivnih markera zapaljenja kod bolesnika sa AFS u našoj studiji značajno utiču klasični kardiovaskularni faktori rizika pa je potrebno da se bolesnicima savetuje njihova striktna kontrola.

13. U našoj studiji je pokazano da je oksidativni stres bio prisutan kod bolesnika sa AFS i to izraženije u SAFS grupi. Od oksidativnih procesa više su bili zastupljeni procesi oksidacije lipida i proteina u odnosu na aktivnost antioksidativnih procesa. Balans oksidativnih procesa u pravcu veće oksidacije značajno pospešuje prisustvo

hiperlipoproteinemije. U našoj studiji prisustvo oksidativnog stresa nije pokazalo nezavistan učinak u prethodnom trombotičnom događaju.

14. Kod AFS bolesnika u našoj studiji utvrđeno je da su povišene koncentracije inhibitora endotelne sintetaze azot monoksida, asimetričnog dimetilarginina, u odnosu na kontrolnu grupu i to su više vrednosti beležene kod bolesnika sa SAFS. Utvrđeno je postojanje korelacije koncentracije asimetričnog dimetilarginina sa hsCRP kao i aKL IgG i β 2GPI IgG. U našoj studiji koncentracija asimetričnog dimetilarginina nije pokazala nezavistan učinak u prethodnom trombotičnom događaju.

15. Kod AFS bolesnika u našoj studiji pokazano je da praćenje d dimera i endogenog trombinskog potencijala može da pruži uvid u aktivnosti hemostatskog sistema.

16. Kod AFS bolesnika u našoj studiji zabeležene su više vrednosti d dimera u odnosu na kontrolnu grupu. Pošto nije bilo zabeleženih recidiva tromboze tokom praćenja bolesnika, d dimer se ne može samostalno koristiti kao pokazatelj prisustva tromboze. Koncentracija d dimera kod pacijenata sa AFS je korelirala sa starosnom dobi, hiperlipoproteinemijom, hsCRP i prisustvom i titrom aKL IgM.

17. Parametri endogenog trombinskog potencijala su se značajno razlikovali kod AFS bolesnika koji jesu i koji nisu bili na oralnoj antikoagulantnoj terapiji. U našoj studiji nije bilo razlike u parametrima endogenog trombinskog potencijala između AFS bolesnika koji ne uzimaju oralnu antikoagulantnu terapiju i kontrolne grupe.

18. Postojala je značajna razlika među parametrima endogenog trombinskog potencijala između grupe PAFS i SAFS, tj bolesnici sa PAFS naprave veću količinu trombina za kraće vreme ali bez razlike u vremenu početka njegove sinteze. Ovo bi moglo da ukaže na aktivnost procesa stvaranja trombina kod AFS bolesnika zbog čega imaju brži odgovor u nastanku tromboze. Na količinu stvorenog trombina utiču kategorije aFL.

19. Analogno, "two hit" hipotezi o nastanku tromboze u AFS može se zaključiti:

- prvi korak jesu promene na endotelu pod uticajem starenja i uticaj tinjajućeg zapaljenja u AFS (koja znatno dobija na značaju kod SAFS pošto je inflamacija jače izražena)

- dodatni faktori jesu standardni faktori rizika tipa hiperlipoproteinemije i komorbiditeta tipa gojaznosti i hipertenzije koje su podjednako značajne i za nastanak disfunkcije endotela i za nastanak tromboze. Takođe, pomereni balans oksidativnih procesa ka većoj oksidaciji i manjoj aktivnosti antioksidativnih procesa je aktivan činilac i u nastanku disfunkcije endotela i tromboze

- u nastanku tromboze standardni faktor rizika je starost, ali sa mnogo nižom granicom starenja nego u opštoj populaciji

- bilo koja vrsta i titar aFL ima udelu u nastanku tromboze, sa najjačim efektom trostruke pozitivnosti

20. Ovom studijom utvrdili smo da AFS bolesnici, koje predominantno čine žene prosečne starosti od 42 godina i niske prevalence klasičnih faktora rizika za aterosklerozu, zahtevaju sveobuhvatnu evaluaciju funkcije endotela, agresivnu redukciju postojećih faktora rizika i redovno praćenje radi sprečavanja recidiva tromboze koja je glavni uzrok mortaliteta bolesnika sa AFS.

VII LITERATURA

1. Wasserman A, Neisser A, Bruck C. Eine serodiagnostische reaktion bei syphilis. Deutsche Med Wochenschr 1906;32:745– 6.
2. Pangborn MC. A new serologically active phospholipid from beef heart. Proc Soc Exp Biol Med 1941;48:484–6.
3. Moore JE, Mohr CF. Biologically false-positive tests for syphilis. JAMA 1952;150:463–73.
4. Conley MR, Hartmann RC. A hemorrhagic disorder caused by circulating anticoagulant in patients with disseminated lupus erythematosus. J Lab Clin Invest 1952;31:621–2.
5. Bowie EJW, Thompson JH Jr, Pascuzzi CA, Owen CA Jr. Thrombosis in systemic lupus erythematosus despite circulating anticoagulants. J Lab Clin Med 1963;62:416 – 30.
6. Feinstein DI, Rapaport SI. Acquired inhibitors of blood coagulation. Prog Hemost Thromb 1972;1:75–95.
7. Harris EN, Gharavi AE, Boey ML, Patel BM, Mackworth-Young CG, Loizou S, et al. Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. Lancet 1983;2:1211–4.
8. Loizou S, McCrea JD, Rudge AC, Reynolds R, Boyle CC, Harris EN. Measurement of anticardiolipin antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): standardization and quantitation of results. Clin Exp Immunol 1985;62:738–45.
9. Hughes GRV. Thrombosis, abortion, cerebral disease, and the lupus anticoagulant. BMJ 1983;287:1088 –9.

10. McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krillis SA. Antiphospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid binding inhibitor of coagulation: β 2-glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:4120–4.
11. Galli M, Comfurius P, Maassen C, Hemker MC, de Baets MH, van Breda-Vriesman PJ, et al. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to serum protein cofactor. *Lancet* 1990; 335:1544–7.
12. Matsuura E, Igarashi Y, Fujimoto M, Ichikawa K, Koike T. Anticardiolipin cofactor(s) and differential diagnosis of autoimmune disease. *Lancet* 1990;336:177–8.
13. Oosting JD, Derksen RH, Entjes HT, Bouma BN, de Groot PG. Lupus anticoagulant activity is frequently dependent on the presence of beta 2-glycoprotein I. *Thromb Haemost* 1992;67:499–502.
14. Roubey RA, Pratt CW, Buyon JP, Winfield JB. Lupus anticoagulant activity of autoimmune antiphospholipid antibodies is dependent upon beta 2-glycoprotein I. *J Clin Invest* 1992;90:1100–4.
15. Galli M, Comfurius P, Barbui T, Zwaal RF, Bevers EM. Anticoagulant activity of beta-2-glycoprotein I is potentiated by a distinct subgroup of anticardiolipin antibodies. *Thromb Haemost* 1992;68:297–300.
16. Bevers EM, Galli M, Barbui T, Comfurius P, Zwaal RF. Lupus anticoagulant IgG's (LA) are not directed to phospholipids only, but to a complex of lipid-bound human prothrombin. *Thromb Haemost* 1991;66:629–32.
17. Permpikul P, Rao LV, Rapaport SI. Functional binding studies of the roles of prothrombin and beta 2-glycoprotein I in the expression of lupus anticoagulant activity. *Blood* 1994;83:2878–92.

18. De Groot, Meijers J, Urbanus T. Recent developments in our understanding of the antiphospholipid syndrome. *Int Jnl Lab Hem* 2012;34:223–31.
19. Myakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006;4:295-306.
20. Wilson WA, Gharavi AE, Kolike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette JC, et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definitive antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Reum* 1999;42:1309-11.
21. Cervera R, Serrano R, Pons-Estel GJ, Ceberio-Hualde L, Shoenfeld Y, de Ramón E, et al. Morbidity and mortality in the antiphospholipid syndrome during a 5-year period: a multicenter prospective study of 1,000 patients. *Ann Rheum Dis* 2015;74(6):1011-8.
22. Stojanovich L, Kontic M, Djokovic A, Marisavljevic D, Ilijevski N, Stanisavljevic N, Mikovic Z, Petkovic M, Kovcin V. Association between systemic non-criteria APS manifestations and antibody type and level: results from the Serbian national cohort study. *Clin Exp Rheumatol* 2013;31(2):234-42.
23. Uthmana I, Godeaub B, Taherc A, Khamashta M. The hematologic manifestations of the antiphospholipid syndrome. *Blood Rev* 2008;22:187–94.
24. Djokovic A, Stojanovich L, Kontic M, Stanisavljevic N, Radovanovic S, Marisavljevic D. Association between cardiac manifestations and antiphospholipid antibody type and level in a cohort of Serbian patients with primary and secondary antiphospholipid syndrome. *Isr Med Assoc J* 2014;16(3):162-7.
25. Blume JE, Miller CC. Antiphospholipid syndrome: a review and update for the dermatologist. *Cutis* 2006;78:409 –15.

26. Miesbach W. Neurological symptoms as a feature of the antiphospholipid syndrome. *Semin Thromb Hemost* 2008;34:286–9.
27. Tincani A, Andreoli L, Chighizola C, Meroni PL. The interplay between the antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* 2009;42:257–9.
28. Asherson RA. The catastrophic antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol* 1992;19:508e12.
29. Cervera R, Rodríguez-Pintó I, Colafrancesco S, Conti F, Valesini G, Rosário C, Agmon-Levin N, Shoenfeld Y, Ferrão C, Faria R, Vasconcelos C, Signorelli F, Espinosa G. 14th International Congress on Antiphospholipid Antibodies Task Force Report on Catastrophic Antiphospholipid Syndrome. *Autoimmun Rev* 2014 Jul;13(7):699-707.
30. Stojanovich L. The catastrophic antiphospholipid syndrome in Serbia: diagnostic and management problems. *Clin Rev Allergy Immunol* 2009;36(2-3):98-103.
31. Stojanovich L, Marisavljevic D, Rovensky J, Djokovich A, Kozáková D, Milinic N. Clinical and laboratory features of the catastrophic antiphospholipid syndrome. *Clin Rev Allergy Immunol* 2009;36(2-3):74-9.
32. Galli M, Luciani D, Bertolini G, Barbui T. Lupus anticoagulants are stronger risk factors for thrombosis than anticardiolipin antibodies in the antiphospholipid syndrome. A systematic review of the literature. *Blood* 2003;101:1827-32.
33. Pengo V, Biasolo A, Pegoraro C, Cucchini U, Noventa F, Iliceto S. Antibody profiles for the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 2005;93(6):1147-52.

34. Danowsky A, de Azevedo M, de Souza Papi J, Petri M. Determinants of risk for venous and arterial thrombosis in primary antiphospholipid syndrome and in antiphospholipid syndrome with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2009;36(6):1195-9.
35. Marai I, Levim Y, Godard G, Shoenfeld Y. Following 90 patients with antiphospholipid syndrome with antibody titers and correlations with clinical manifestations: symptoms of the disease, a new antibody and correlations with clinical manifestations in Israeli population. *Harefuah* 2001;140(6):495-500.
36. Neville C, Rauch J, Kassis J, Chang ER, Joseph L, Le Comte M, Fortin PR. Thromboembolic risk in patients with high titer anticardiolipin and multiple antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost* 2003;90(1):108-15.
37. De Laat HB, Derksen RH, Urbanus RT, de Groot PG. IgG antibodies that recognize epitope Gly40-Arg43 in domain I of beta2-glycoprotein I cause LAC, and their presence correlates strongly to thrombosis. *Blood* 2005;105:1540-5.
38. Pengo V, Ruffatti A, Legnani C, Gresele P, Barcellona D, Erba N, et al. Clinical course of high-risk patients diagnosed with antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost* 2010; 8: 237–42.
39. Erkan D, Yazici Y, Peterson MG, Sammaritano L, Lockshin MD. A cross-sectional study of clinical thrombotic risk factors and preventive treatments in antiphospholipid syndrome. *Rheumatology (Oxford)* 2002; 41:924–9.
40. Froom P, Saffuri-Elias E, Rozenberg O, Barak M. Triple positive antiphospholipid antibody profile in outpatients with tests for lupus anticoagulants. *Clin Chem Lab Med* 2015;53(1):53-6.
41. Mialdea M, Sangle S, Cruz D. Antiphospholipid (Hughes) syndrome: beyond pregnancy morbidity and thrombosis. *J Autoim Dis* 2009;6:3-6.

42. Cervera R, Conti F, Doria A, Iaccarino L, Valesini G. Does seronegative antiphospholipid syndrome really exist? *Autoim Rev* 2012;11:581-4.
43. Mahler M, Norman N, Meroni P, Khamashta M. Autoantibodies to domain 1 of beta 2 glycoprotein 1: A promising candidate biomarker for risk management in antiphospholipid syndrome. *Autoimmunity Reviews* 2012;12 313–7.
44. Bećarević M, Stojanović L, Ignjatović S, Dopsaj V. The IgM isotype of anti-annexin A5 antibodies and multiple positivity of conventional antiphospholipid antibodies: increasing the number of clinical manifestations of primary antiphospholipid syndrome. *Clin Rheumatol* 2016;35:1361-5.
45. Sciascia S, Khamashta MA, Bertolaccini ML. New tests to detect antiphospholipid antibodies: antiprothrombin (aPT) and anti-phosphatidylserine/prothrombin (aPS/PT) antibodies. *Curr Rheumatol Rep* 2014;16(5):415.
46. Brandt JT, Triplett DA, Alving B, Scharrer I. Criteria for diagnosis of lupus anticoagulants: an update. On behalf of the Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the ISTH. *Thromb Haemost* 1995;74:1185–90.
47. Pengo V, Tripodi A, Reber G, Rand JH, Ortel TL, Galli M, de Groot PG. Official communication of the Scientific and Standardization Committee on lupus anticoagulant/phospholipid-dependent antibodies: update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. *J Thromb Haemost* 2009;7:1737– 40.
48. Forasteiro R, Martinuzzo M, Pombo G, Puente D, Rossi A, Celebrin L, et al. A prospective study of antibodies to beta2-glycoprotein I and prothrombin, and risk of thrombosis. *J Thromb Haemost* 2005;3:1231– 8.
49. Shoenfeld Y, Twig G, Katz U, Sherer Y. Autoantibody explosion in antiphospholipid syndrome. *J Autoimmun* 2008;30:74–83.

50. Otomo K, Atsumi T, Amengual O, Fujieda Y, Kato M, Oku K, Horita T, Yasuda S, Koike T. Efficacy of the antiphospholipid score for the diagnosis of antiphospholipid syndrome and its predictive value for thrombotic events. *Arthritis Rheum* 2012;64(2):504-12.
51. Sciascia S, Bertolaccini ML. Thrombotic risk assessment in APS: the Global APS Score (GAPSS). *Lupus* 2014;23:1286-7.
52. Mehrania T, Petri M. Epidemiology of the antiphospholipid syndrome. Antiphospholipid syndrome in systemic autoimmune diseases. Ed. Cervera R, Reverter J, Khamasta M. Amsterdam: Elsevier; 2009:12-33.
53. Andreoli L, Chighizola CB, Banzato A, Pons-Estel GJ, de Jesus GR, Erkan D. The estimated frequency of antiphospholipid antibodies in patients with pregnancy morbidity, stroke, myocardial infarction, and deep vein thrombosis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2013;65(11):1869-7.
54. Devreese K. Antiphospholipid antibodies: evaluation of the thrombotic risk. *Thromb Res* 2012;130:S37-40.
55. De Groot PG, Lutters B, Derksen RH, Lisman T, Meijers JC, Rosendaal FR. Lupus anticoagulants and the risk of a first episode of deep vein thrombosis. *J Thromb Hemos* 2005;3:1993-7.
56. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997;40(9):1725.
57. Ravelli A, Martini A. Antiphospholipid antibody syndrome in pediatric patients. *Rheum Dis Clin North Am* 1997;23(3):657-76.

58. Hassan S, Gheita T, Kenawy S, Fahim A, El-Sorouglz I, Abdou M. Oxidative stress in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients: relationship to disease manifestations and activity. *Intern J Rheum Dis* 2011;14: 325–331.
59. Mansour RB, Lassoued S, Gargouri B, El Gai'd A, Attia H, Fakhfakh F. Increased levels of autoantibodies against catalase and superoxide dismutase associated with oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol* 2008;37:103–8.
60. Sciascia S, Roccatello R, Bertero M, et al. 8-Isoprostane, prostaglandin E2, C-reactive protein and serum amyloid A as markers of inflammation and oxidative stress in antiphospholipid syndrome: a pilot study. *Inflam Res* 2012;61: 809-16.
61. Ames PR, Tommasino C, Alves J, Morrow JD, Iannaccone L, Fossati G, Caruso S, Caccavo F, Brancaccio V. Antioxidant susceptibility of pathogenic pathways in subjects with antiphospholipid antibodies: a pilot study. *Lupus* 2000;9:688-95.
62. Nuttall SL, Heaton S, Piper MK, Martin U, Gordon C. Cardiovascular risk in systemic lupus erythematosus – evidence of increased oxidative stress and dyslipidaemia. *Rheumatology (Oxford)* 2003; 42: 758–62.
63. Kurien BT, Scofield RH. Free radical mediated peroxidative damage in systemic lupus erythematosus. *Life Sci* 2003;73:1655–66.
64. Frostegard J, Svenungsson E, Wu R, Gunnarsson I, Lundberg IE, Klareskog L, Hörkkö S, Witztum JL. Lipid peroxidation is enhanced in patients with systemic lupus erythematosus and is associated with arterial and renal disease manifestation. *Arthritis Rheum* 2005;52:192–200.
65. Abou-Raya A, Hallous D, Fayed H. 8-Isoprostaglandin F2 alpha: a potential index of lipid peroxidation in systemic lupus erythematosus. *Clin Invest Med* 2004;27:306–11.

66. Ames J, Alves J, Murat I, Isenberg D, Nourooz-Zadeh. Oxidative stress in Systemic Lupus Erythematosus and allied conditions with vascular involvement. *Rheumatology (Oxford)* 1999;38:529-34.
67. Walter MF, Jacob RF, Bjork RE, et al. Circulating lipid hydroperoxides predict cardiovascular events in patients with stable coronary artery disease: the PREVENT study. *J Am Coll Cardiol* 2008;51:1196-202.
68. Pratico D, Ferro D, Iuliano L, Rokach J, Conti F, Valesini G, FitzGerald GA, Violi F. Ongoing prothrombotic state in patients with antiphospholipid antibodies: a role for increased lipid peroxidation. *Blood* 1999;93:3401–3407.
69. Descamps-Latscha B, Witko-Sarsat V, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Gausson V, Mothu N, London GM, Jungers P. Advanced oxidation protein products as risk factors for atherosclerotic cardiovascular events in nondiabetic predialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2005;45:39–47.
70. Kalousova M, Skrha J, Zima T. Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus. *Physiol Res* 2002;51:597–604.
71. Lozovoy M, Sima A, Panis C, Rotter M, Reiche E, Morimoto H, Lavado E, Cecchini R, Dichi I. Oxidative stress is associated with liver damage, inflammatory status, and corticosteroid therapy in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2011;20, 1250–9.
72. Alves DJ, Ames PR, Donohue S, Stanyer L, Nourooz-Zadeh J, Ravirajan C, Isenberg DA. Antibodies to high-density lipoprotein and beta2-glycoprotein I are inversely correlated with paraoxonase activity in systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 2002;46:2686–94.

73. Alves D, Grima B. Oxidative Stress in Systemic Lupus Erythematosus and Antiphospholipid Syndrome: A Gateway to Atherosclerosis. *Curr Rheum Rep* 2003;5:383–90.
74. Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein and atherothrombosis. *Ital Heart J* 2001;2:196–9.
75. Vaarala O, Alftan G, Jauhianen M, Leirisalo-Repo M, Aho K, Palosuo T. Crossreaction between antibodies to oxidised low-density lipoprotein and to cardiolipin in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1993;341:923-5.
76. Hasunuma Y, Matsuura E, Makita Z, Katahira T, Nishi S, Koike T. Involvement of β_2 glycoprotein I and anticardiolipin antibodies in oxidatively modified low-density lipoprotein uptake by macrophages. *Clin Exp Immunol* 1997;107:569-3.
77. Saponjski J, Stojanovich L, Djokovic A, Petkovic M, Mrda D. Systemic Vascular Diseases in the Antiphospholipid Syndrome. What is the best diagnostic choice? *Autoimmun Rev* 2011;10:235-7.
78. Passam FH, Rahgozar S, Qi M, Raftery MJ, Wong J, Tanaka K, et al. β_2 glycoprotein I is a substrate of thiol oxidoreductases. *Blood* 2010;116:1995–7.
79. Ioannou Y, Zhang JY, Passam FH, Rahgozar S, Qi JC, Giannakopoulos B, et al. Naturally occurring free thiols within β_2 - glycoprotein I in vivo: nitrosylation, redox modification by endothelial cells and regulation of oxidative stress induced cell injury. *Blood* 2010;116:1961–70.
80. Ioannou Y, Zhang J, Qi M, Gao L, Cheng L, Yu D, et al. Novel assays of thrombogenic pathogenicity in the antiphospholipid syndrome based on the detection of molecular oxidative modification of the major autoantigen β_2 -Glycoprotein I. *Arth Rheum* 2011;63:2774–82.

81. Turpie AGG, Esmon C. Venous and arterial thrombosis- Pathogenesis and the rationale for anticoagulation. *Thromb Haemost* 2011;105:586-96.
82. Konkle BA, Simon D, Schafer A. Hemostasis, thrombosis, fibrinolysis and cardiovascular disease. In: Libby P, Bonow RO, Mann DL, Zipes D, Braunwald E. *Braunwald's Heart Disease*, 2008 Eight edition, Saunders Elsevier, Philadelphia; 2049-78.
83. Griendling KK, Harrison DG, Alexande RW. Biology of the Vessel Wall. In: Fuster V, Walch RA, O'Rurke R, Wilson PP. *Hurst's The Heart*. Twelfth Edition, McGraw Hill Medical, New York, 2008; 135-54.
84. Kanjuh V, Ostojić M, Bojić M, Djurić D, Gojković-Bukarica Lj, Tasić N, Kanjuh S. Ateroskleroza na pragu III milenijuma (Morfološko-klinička korelacija aterosklerotičnih lezija i relevantnih kliničkih sindroma). U: Nedeljković I.S, Kanjuh I V, Vukotić RM, *Kardiologija* 2000; III izdanje, D.P za izdavačko trgovinsku delatnost, Beograd, Beograd; 2393-23.
85. Badimon JJ, Fuster V. Coronary thrombosis: local and systemic factors. In: Fuster V, Walch RA, O'Rurke R, Wilson PP. *Hurst's The Heart*. Twelfth Edition, McGraw Hill Medical, New York, 2008; 1244-58.
86. Gresele P, Moni S, Migliacci R. Endothelium, venous thromboembolism and ischaemic cardiovascular events. *Thromb Haemost* 2010;103:56-61.
87. Cugno M, Borghi M, Lonati L, Ghiadoni L, Gerosa M, Grossi C, et al. Patients with antiphospholipid syndrome display endothelial perturbation. *J Autoimm* 2010;34:105-10.
88. Meroni P, Shoenfeld Y. Predictive, protective, orphan autoantibodies: the example of antiphospholipid antibodies. *Autoimmun Rev* 2008;7(8):585-7.

89. Vega-Ostertag M, Pierangeli S. Mechanisms of aPL-mediated thrombosis: effects of aPL on endothelium and platelets. *CurrRheum Rep* 2007;9:190-7.
90. Wanchu A, Khullar M, Sud K, Sakhuja V, Thennarasu K, Sud A, Bambery P. Serum and urine nitrite and citrulline levels among patients with systemic lupus erythematosus: a possible addition to activity parameters? *J Clin Rheum* 2001;7:10-5.
91. Gilkeson G, Cannon C, Oates J, Reilly C, Goldman D, Petri M. Correlation of serum measures of nitric oxide production with lupus disease activity. *J Rheumatol* 1999; 26: 318-324.
92. Mineo C, Shaul P. Novel insights into molecular basis of the antiphospholipid syndrome. *Drug Disc Today. Dis Mech* 2011;8:e47-e52.
93. Alves D, Mason L, Ames P, Chen P, Rauch J, Levine J, Subang R, Isenberg D. Antiphospholipid antibodies are associated with enhanced oxidative stress, decreased plasma nitric oxide and paraoxonase activity in an experimental mouse model. *Rheumatology* 2005;44:1238-44.
94. Ramesh S, Morrell C, Tarango C, Thomas GD, Yuhanna IS, Girardi G, et al. Antiphospholipid antibodies promote leukocyte-endothelial cell adhesion and thrombosis in mice by antagonizing eNOS via B2-GPI and apoEr2. *J Clin Invest* 2011;121:120-31.
95. Boger RH, Bode-Boger SM, Szuba A, et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): A novel risk factor for endothelial dysfunction - Its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 1998;98:1842-7.
96. Surdacki A, Nowicki M, Sandmann J, Tsikas D, Boeger RH, Bode-Boeger SM, et al. Reduced urinary excretion of nitric oxide metabolites and increased plasma levels of asymmetric dimethylarginine in men with essential hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999;33:652-8.

97. Shi B, Ni Z, Zhou W, et al. Circulating levels of asymmetric dimethylarginine are an independent risk factor for left ventricular hypertrophy and predict cardiovascular events in pre-dialysis patients with chronic kidney disease. *Eur J Intern Med* 2010;21(5):444-8.
98. Abedini S, Meinitzer A, Holme I, März W, Weihrauch G, Fellstrøm B, Jardine A, Holdaas H. Asymmetrical dimethylarginine is associated with renal and cardiovascular outcomes and all-cause mortality in renal transplant recipients. *Kidney Int* 2010;77(1):44-50.
99. Krzyzanowska K, Mittermayer F, Shnawa N, et al. Asymmetrical dimethylarginine is related to renal function, chronic inflammation and macroangiopathy in patients with type 2 diabetes and albuminuria. *Diabet Med* 2007;24:81-6.
100. Turiel M, Atzeni F, Tomasoni L, de Portu S, Delfino L, Bodini BD, et al. Non-invasive assessment of coronary flow reserve and ADMA levels: a case-control study of early rheumatoid arthritis patients. *Rheumatology* 2009;48:834-39.
101. Verma S, Buchanan MR, Anderson TJ. Endothelial function testing as a biomarker of vascular disease. *Circulation* 2003;108:2054-9.
102. Mercanoglu F, Erdogan D, Oflaz H, Kücükaya R, Selcukbiricik F, Gül A, Inanc M. Impaired brachial endothelial function in patients with primary anti-phospholipid syndrome. *Int J Clin Pract* 2004;58:1003-7.
103. Der H, Kerekes G, Veres K, Szodoray P, Toth J, Lakos G, et al. Impaired endothelial function and increased carotid intima-media thickness in association with elevated von Willebrand antigen level in primary antiphospholipid syndrome. *Lupus* 2007;16:497-503.

104. Kiss E, Soltesz P, Der H, Kocsis Z, Tarr T, Bhattoa H, et al. Reduced flow-mediated vasodilation as a marker for cardiovascular complications in lupus patients. *J Autoimmun.* 2006;27(4):211–7.
105. Lima DSN, Sato EJ, Lima VC, Miranda F, Hatta FH. Brachial endothelial function is impaired in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2002;29:292-7.
106. Stalc M, Poredos P, Peternel P, et al. Endothelial function is impaired in patients with primary antiphospholipid syndrome. *Thromb Res* 2006;118:455-61.
107. Ames PR, Batuca JR, Ciampa A, Iannaccone L, Delgado Alves J. Clinical relevance of nitric oxide metabolites and nitrative stress in thrombotic primary antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol* 2010;37:2523–30.
108. Marai I, Shechter M, Langevitz P, Gilburd B, Rubenstein A, Matssura E, Sherer Y, Shoenfeld Y. Anticardiolipin antibodies and endothelial function in patients with coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2008;101:1094-7.
109. Soltész P, Kerekes G, Dér H, Szücs G, Szántó S, Kiss E, et al. Comparative assessment of vascular function in autoimmune rheumatic diseases: consideration of prevention and treatment. *Autoimmun Rev* 2011;10:416-25.
110. Zardi EM, Afeltra A. Endothelial dysfunction and vascular stiffness in systemic lupus erythematosus: are they early markers of subclinical atherosclerosis? *Autoimmun Rev* 2010;9:684–6.
111. Bengtsson C, Andersson SE, Edvinsson L, Edvinsson ML, Sturfelt G, Nived O. Effect of medication on microvascular vasodilatation in patients with systemic lupus erythematosus. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2010;107(6):919-24.

112. Verma S, Wang CH, Li SH, Dumont AS, Fedak PW, Badiwala MV, et al. A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. *Circulation* 2002;106:913–9.
113. Qin B, Ma N, Tang Q, et al. Neutrophil to lymphocyte ratio (NLR) and platelet to lymphocyte ratio (PLR) were useful markers in assessment of inflammatory response and disease activity in SLE patients. *Mod Rheumatol* 2016;26(3):372-6.
114. Meroni PL, Riboldi P. Pathogenic mechanisms mediating antiphospholipid syndrome. *Curr Opin Rheumatol* 2001;13:377–82.
115. Ruiz-Irastorza G, Crowther M, Branch W, Khamashta M. Antiphospholipid syndrome. *Lancet* 2010; 376: 1498–509.
116. Pazzola G, Zuily S, Erkan D. The challenge of bleeding in antiphospholipid antibody-positive patients. *Curr Rheumatol Rep* 2015;17(2):7-16.
117. Simantov R, LaSala JM, Lo SK, Gharavi AE, Sammaritano LR, Salmon JE, Silverstein RL. Activation of cultured vascular endothelial cells by antiphospholipid antibodies. *J Clin Invest* 1995;96(5):2211-9.
118. Lockshin M. Antiphospholipid antibody syndrome. In: Kelley WR, Harris ED, Budd RC, Genovese MC, Firestein GS, Sargent JS, Sledge CB, Ruddy S, eds. *Kelley's Textbook of Rheumatology*. 7th. Philadelphia: WB Saunders; 1248-57.
119. Goldberg SN, Conti-Kelly AM, Greco TP. A family study of anticardiolipin antibodies and associated clinical conditions. *Am J Med* 1995;99(5):473-9.
120. Salmon JE, Girrardi G. The role of complement in the antiphospholipid syndrome. *Curr Dir Autoimmun* 2004;7:133-48.

121. Pierangeli SS, Harris EN. Probing antiphospholipid-mediated thrombosis: the interplay between anticardiolipin antibodies and endothelial cells. *Lupus* 2003;12(7):539-45.
122. López-Pedrerá Ch, Buendía P, Aguirre MA, Velasco F, Cuadrado MJ. Antiphospholipid syndrome and tissue factor: a thrombotic couple. *Lupus* 2006;15(3):161-6.
123. Harris EN. Antiphospholipid syndrome. In: Klippel JH, Dieppe PA, eds. *Rheumatology*. 2nd ed. London, UK: Mosby; 1998:7.35.1-7.35.6.
124. Devreese K, Hoylaerts M. Challenges in the Diagnosis of the Antiphospholipid Syndrome. *Clinical Chemistry* 2010; 56:6:930–40.
125. Gómez-Puerta J, Cervera R. Diagnosis and classification of the antiphospholipid syndrome. *J Autoimm* 2014;48:20e25.
126. Danowski A, de Azevedo MN, de Souza Papi JA, Petri MJ. Determinants of risk for venous and arterial thrombosis in primary antiphospholipid syndrome and in antiphospholipid syndrome with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol* 2009;36(6):1195-9.
127. Urbanus RT, Siegerink B, Roest M, Rosendaal FR, de Groot PG, Algra A. Antiphospholipid antibodies and risk of myocardial infarction and ischaemic stroke in young women in the RATIO study: a case-control study. *Lancet Neurol* 2009;8:998–1005.
128. Ruiz-Irastorza G, Cuadrado MJ, Ruiz-Arruza I, Brey R, Crowther M, Derksen R, et al. Evidence-based recommendations for the prevention and long-term management of thrombosis in antiphospholipid antibody-positive patients: report of a task force at the 13th International Congress on Antiphospholipid Antibodies. *Lupus* 2011;20:206–18.

129. Szekanecz Z, Koch AE. Vascular involvement in rheumatic diseases: 'vascular rheumatology'. *Arthritis Res Ther* 2008;10:224.
130. Popovic-Kuzmanovic D, Novakovic I, Stojanovich L, Aksentijevich I, Zogovic N, Tovilovic G, Trajkovic V. Increased activity of interleukin-23/interleukin-17 cytokine axis in primary antiphospholipid syndrome. *Immunobiology* 2013;218(2):186-91.
130. Meroni PL. Pathogenesis of the antiphospholipid syndrome: an additional example of the mosaic of autoimmunity. *J Autoimmun* 2008;30:99 –103.
131. Tripodi A, Mannacci PM. Laboratory investigation of thrombophilia. *Clin Chem* 2001;47(9):1597-606.
132. Segers O, Simioni P, Tormene D, Bulato C, Gavasso S, Rosing J, Castoldi E. Genetic modulation of the FV(Leiden)/normal FV ratio and risk of venous thrombosis in factor V Leiden heterozygotes. *J Thromb Haemost* 2012;10(1):73-80.
133. Dahlback B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90 1004-8.
134. Tripodi A, Mannacci PM. Laboratory investigation of thrombophilia. *Clin Chem* 2001;47(9):1597-606.
135. Kyrle PA. Venous thrombosis: who should be screened for thrombophilia in 2014? *Pol Arch Med Wewn* 2014;124(1-2):65-9.
136. Boisclair M, Ireland H, Lane D. Assessment of hypercoagulable states by measurement of activation fragments and peptides. *Blood Reviews* 1990;4, 25–40.
137. Mark van Geffen, Waander L. van Heerde. Global haemostasis assays, from bench to bedside. *Thrombosis Research* 2012;129: 681–7.

138. Berntorp E, Salvagno GL. Standardization and clinical utility of thrombin-generation assays. *Semin Thromb Hemost* 2008, 34:670–82.
139. Eichinger S, Hron G, Kollars M, Kyrle PA. Prediction of recurrent venous thromboembolism by endogenous thrombin potential and D-dimer. *Clin Chem* 2008, 54:2042–8.
140. Hron G, Kollars M, Binder BR, Eichinger S, Kyrle PA. Identification of patients at low risk for recurrent venous thromboembolism by measuring thrombin generation. *JAMA* 2006, 296:397–402.
141. van Hylckama Vlieg A, Christiansen S, Luddington R, Cannegieter S, Rosendaal F, Baglin T. Elevated endogenous thrombin potential is associated with an increased risk of a first deep venous thrombosis but not with the risk of recurrence. *Br J Haematol* 2007; 138, 769–74.
142. Hezard N, Bouaziz-Borgi L, Remy MG, Nguyen P. Utility of thrombin-generation assay in the screening of factor V G1691A (Leiden) and prothrombin G20210A mutations and protein S deficiency. *Clin Chem* 2006, 52:665–70.
143. Tans G, van Hylckama VA, Thomassen MC, Curvers J, Bertina RM, Rosing J, Rosendaal FR. Activated protein C resistance determined with a thrombin generation-based test predicts for venous thrombosis in men and women. *Br J Haematol* 2003, 122:465–70.
144. Devreese K, Peerlinck K, Arnout J, Hoylaerts MF. Laboratory detection of the antiphospholipid syndrome via calibrated automated thrombography. *Thromb Haemost* 2009; 101:185–96.
145. Sheng Y, Hanly JG, Reddel SW, Kouts S, Guerin J, Koike T, Ichikawa K, Sturgess A, Krilis SA. Detection of ‘antiphospholipid’ antibodies: a single chromogenic assay of thrombin generation sensitively detects lupus anticoagulants, anticardiolipin antibodies,

plus antibodies binding beta(2)-glycoprotein I and prothrombin. *Clin Exp Immunol* 2001, 124:502–8.

146. Hanly JG, Smith SA. Anti-beta2-glycoprotein I autoantibodies, in vitro thrombin generation, and the antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol* 2000, 27:2152–9.

147. Ninivaggi M, Kelchtermans H, Lindhout T, de Laat B. Conformation of beta2glycoprotein I and its effect on coagulation. *Thromb Res* 2012, 130(1):S33–36.

148. Regnault V, Beguin S, Wahl D, et al. Thrombinography shows acquired resistance to activated protein C in patients with lupus anticoagulants. *Thromb Haemost* 2003;89:208–12.

149. Liestol S, Sandset P, Mowinckel M, Wisloff F. Activated protein C resistance determined with a thrombin generation-based test is associated with thrombotic events in patients with lupus anticoagulants. *Throm Haem* 2007;5: 2204–10.

150. Mehta B, Kiani A, Chen C, Jani J, Kickler T, Petri M. Endogenous thrombin potential in the assessment of hypercoagulability in systemic lupus erythematosus. *Am J Hematol* 2010;85: 83–5.

151. Zuily S, Aissa1 K, Membre A, Regnault V, Lecompte T, Wahl D. Thrombin generation in antiphospholipid syndrome. *Lupus* 2012;21, 758–60.

152. Wells P, Anderson D, Rodger M., Forgie M, Kearon C, Dreyer R, Kovacs G, Mitchell M., Lewandowski B, Kovacs M: Evaluation of Ddimer in the diagnosis of suspected deep-vein thrombosis. *NEJM* 2003;349:1227-35.

153. Cosmi B, Palareti G. The new role of D-dimer as a predictor of recurrent venous thromboembolism. *J Lab Med* 2005;29:398-402.

154. Bates SM, Greer IA, Middeldorp S, Veenstra DL, Prabulos AM, Vandvik PO. VTE, thrombophilia, antithrombotic therapy, and pregnancy: antithrombotic therapy and prevention of thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest* 2012; 141:e691Se736.
155. Simioni P, Prandoni P, Zanon E i sur. Deep venous thrombosis and lupus anticoagulant. A case-control study. *Thromb Haemost* 1996;76:187–9.
156. Erkan D, Harrison MJ, Levy R, et al. Aspirin for primary thrombosis prevention in the antiphospholipid syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in asymptomatic antiphospholipid antibody-positive individuals. *Arthritis Rheum* 2007;56: 2382e91.
157. Khamashta MA, Cuadrado MJ, Mujic F i sur. The management of thrombosis in the antiphospholipid antibody syndrome. *N Engl J Med* 1995;332:993–7.
158. Ageno W, Dentali F, Donadini MP, Squizzato A. Optimal treatment duration of venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 2013; 11(suppl1): 151e60.
159. Wallace D. Does hydroxychloroquine sulphate prevent clot formation in systemic lupus erythematosus? *Arthrit Rheum* 1987;30:1435-6.
160. Erkan D, Yazici Y, Peterson M, Sammaritano L, Lockshin M. A cross-sectional study of clinical thrombotic risk factors and preventive treatments in antiphospholipid syndrome. *Rheumatology* 2002;41:924-9.
161. Edwards M, Pierangeli S, Liu X, et al. hydroxychloroquine reverses thrombogenic properties of antiphospholipid antibodies in mice. *Circulation* 1997;96:4280-4.
162. Espinola R, Pierangeli S, Gharavi A, Harris E. Hydroxychloroquine reverses platelet activation induced by human IgG antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost* 2002;87:518-22.

163. Erkan D, Aguiar C, Andrade D, et al. 14th International Congress on Antiphospholipid Antibodies Task Force. Report on Antiphospholipid Syndrome Treatment Trends. *Autoim Rev* 2014;13:685-96.
164. Ferrara D, Swerlick R, Casper K, Meroni P, et al. Fluvastatin inhibits up-regulation of tissue factor expression by antiphospholipid antibodies on endothelial cells. *J Thromb Haemost* 2004;2:1558-63.
165. Meroni P, Raschi E, Testoni C, et al. Statins prevent endothelial cell activation induced by antiphospholipid (anti beta2 glycoprotein I) antibodies: effect on the proadhesive and proinflammatory phenotype. *Arthritis Rheum* 2001;44: 2870-8.
166. Erre G, Pardini S, Faedda R, Passiu G. Effect of rituximab on clinical and laboratory features of antiphospholipid syndrome: a case report and review of literature. *Lupus* 2008;17:50-55.
167. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982;25:1271-7.
168. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, et al. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum* 1992;35:630-40.
169. Catapano AL, Reiner Z, De Backer G, et al. European Society of Cardiology (ESC); European Atherosclerosis Society (EAS) ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias. The Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS) *Atherosclerosis* 2011;217(1):3-46.
170. Gay C, Collins J, Gebicki JM. Hydroperoxide assay with the ferric-xylenol orange complex. *Anal Biochem* 1999;273:149-155.

171. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillere-Blandin C. et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney International* 1996;49:1304-13.
172. Ellman E. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959;82:70–7.
173. Furlong C, Richter RJ, Seidel SL, et al. Spectrophotometric assays for the enzymatic hydrolysis of the active metabolites of chlorpyrifos and parathion by plasma paraoxonase/arylesterase. *Anal Biochem* 1989;180:242–7.
174. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:257–65.
175. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 1992;340:1111-5.
176. Alberti KGMM, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1, diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 1998;15:539–553.
177. Zinger H, Sherer Y, Shoenfeld Y. Atherosclerosis in Autoimmune Rheumatic Diseases—Mechanisms and Clinical Findings. *Clinic Rev Allerg Immunol* 2009;37:20–28
178. Jara LJ, Medina G, Vera-Lastra O, Amigo MC. Accelerated atherosclerosis, immune response and autoimmune rheumatic diseases. *Autoimmun Rev* 2006;5(3):195-201.

179. Montecucco F, Mach F. Common inflammatory mediators orchestrate pathophysiological processes in rheumatoid arthritis and atherosclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2009;48(1):11-22.
180. Roman MJ, Shanker BA, Davis A, et al. Prevalence and correlates of accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2003;349:2399-406.
181. Badimon L, Storey RF, Vilahur G. Update on lipids, inflammation and atherothrombosis. *Thromb Haemost* 2011;105 Suppl 1:S34-42.56-61.
182. Tuttolomondo A, Di Raimondo D, Pecoraro R, Arnao V, Pinto A, Licata G. Atherosclerosis as an inflammatory disease. *Curr Pharm Des* 2012;18(28):4266-88.
183. Perez-Sanchez C, Barbarroja N, Messineo S, et al. Gene profiling reveals specific molecular pathways in the pathogenesis of atherosclerosis and cardiovascular disease in antiphospholipid syndrome, systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome with lupus. *Ann Rheum Dis* 2015;74(7):1441-9.
184. Stojanovich L, Markovic O, Marisavljevic D, et al. Influence of antiphospholipid antibody levels and type on thrombotic manifestations: results from the Serbian National Cohort Study. *Lupus* 2012; 21: 338–45.
185. Goff DC, Lloyd-Jones DM, Bennett G, et al. 2013 ACC/AHA Guideline on the Assessment of Cardiovascular Risk. *Circulation* 2014;129:S49-S73.
186. Jacobson TA, Ito MK, Maki KC, et al. National Lipid Association recommendations for patient-centered management of dyslipidemia: part 1 - executive summary. *J Clin Lipidol* 2014;8:473-88.
187. Bećarević M, Majkić-Singh N. High-sensitivity C-reactive protein: discriminator between patients with primary and secondary antiphospholipid syndrome. *Clin Biochem* 2008;41(18):1449-53.

188. Mok C, Birmingham D, Ho L, Hebert L, Rovin B. High sensitivity C-reactive protein, disease activity and cardiovascular risk factors in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2013; 65: 441–7.
189. Barnes EV, Narain S, Naranjo A, Shuster J, Segal MS, Sobel ES, et al. High sensitivity C-reactive protein in systemic lupus erythematosus: relation to disease activity, clinical presentation and implications for cardiovascular risk. *Lupus* 2005;14(8):576–82.
190. Rezaieyazdi Z, Sahebari M, Hatef MR, Abbasi B, Rafatpanah H, Afshari JT, et al. Is there any correlation between high sensitive CRP and disease activity in systemic lupus erythematosus? *Lupus* 2011;20(14):1494–500.
191. Mayer-Pickela K, Kolovetsiou-Kreiner V, Mörtla MG, et al. Endothelin 1, ADMA and SDMA in pregnancies with obstetric and thrombotic antiphospholipid syndrome. *J Reprod Immun* 2016;116:86–92
192. Castoldi E, Rosing J. Thrombin generation tests. *Throm Res* 2011;3:S21-S25.
193. Mikołajczyk T, Osmendał G, Batko B, et al. Heterogeneity of peripheral blood monocytes, endothelial dysfunction and subclinical atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2016;25:18–27.
194. Shevchuk SV, Sehedá IuS, Kuvikova IP. Dyslipidemia in patients with antiphospholipid syndrome and its association with endothelial dysfunction and atherosclerotic changes in the carotid arteries. *Lik Sprava* 2013;(2):38-47.
195. Mineo C. Inhibition of nitric oxide and antiphospholipid antibody-mediated thrombosis. *Curr Rheumatol Res* 2013;15:324-35.

196. Shevchuk SV. Particularities of endothelial function disorders, atherosclerotic vascular impairment and morphofunctional myocardium condition in SLE patients with antiphospholipid syndrome. *Lik Sprava* 2007;(7):22-8.
197. Stalc M, Tomsic M, Jezovnik MK, Poredos P. Endothelium-dependent and independent dilation capability of peripheral arteries in patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 2011;29:616-23.
198. Cooke J. ADMA: its role in vascular disease. *Vasc Med* 2005;10:S11-S17.
199. Beckman J, Koppenol W. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol* 196;271:C1424-37.
200. Cervera R, Piette J, Font J et al. Clinical and Immunologic Manifestations and Patterns of Disease Expression in a Cohort of 1,000 Patients. *Arthr Rheum* 2002;46:1019–27.
201. Camps García MT, Fernández Nebro A, Díaz Cobos C, Haro Liger M, Barón Ramos MA, de Ramón Garrido E. Clinical and immunological features in 112 patients with antiphospholipid syndrome. *Med Clin (Barc)* 2004;123(12):466-70.
202. Berman H, Ugarte-Gil MF, Espinosa G, Tàssies D, Monteagudo J, Reverter JC, Cervera R. Can inherited thrombophilia modulate the clinical phenotype of patients with antiphospholipid syndrome? *Clin Exp Rheumatol* 2013;31:926-32.
203. Simcox L, Ormesher L, Tower C, Greer I. Thrombophilia and Pregnancy Complications. *Int J Mol Sci* 2015;16:28418–8.
204. Medina G, Gutierrez-Moreno AL, Vera-Lastra A, Saavedra MA, Jara JL. Prevalence of metabolic syndrome in primary antiphospholipid syndrome patients. *Autoimmune Rev* 2011;10:214–7.

205. Ames PR, Matsuura E, Batuca JR, Ciampa A, Lopez LL, Ferrara F, et al. Highdensity lipoprotein inversely relates to its specific autoantibody favoring oxidation in thrombotic primary antiphospholipid syndrome. *Lupus* 2010;19:711–6.
206. Giron-Gonzales J, Garcia del Rio E, Rodriguez C, Rodriguez J, Serrano A. Antiphospholipid syndrome and asymptomatic carriers of antiphospholipid antibody: prospective analysis of 404 individuals. *J Rheumatol* 2004;31:1560-7.
207. Krnic-Barrie S, O'Connor C, Looney S, Pierangeli S, Garis E. A retrospective review of 61 patients with antiphospholipid syndrome: analysis of factors influencing recurrent thrombosis. *Arch Intern Med* 1997;157:2101-8.
208. Naess IA, Christiansen SC, Romundstad P, Cannegieter SC, Rosendaal FR, Hammerstrøm J. Incidence and mortality of venous thrombosis: a population-based study. *J Thromb Haemost* 2007; 5:692–9.
209. Sciascia S, Bertolaccini ML. Thrombotic risk assessment in APS: the Global APS Score (GAPSS). *Lupus*. 2014;23:1286-7.
210. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med* 1997;336:973-9.
211. Tsai AW, Cushman M, Rosamond WD, et al. Coagulation factors, inflammation markers, and venous thromboembolism: the Longitudinal Investigation of Thromboembolism Etiology (LITE). *Am J Med* 2002;113:636-42.

SKRAĆENICE

AFS – antifosfolipidni sindrom

aFL – antifosfolipidna antitela

aKL – antikardiolipinska antitela

β 2gpI – β 2glikoprotein I

LA – lupus antikoagulans

SEL – sistemski eritemski lupus

PAFS – primarni antifosfolipidni sindrom

SAFS – sekundarni antifosfolipidni sindrom

DVT – duboka venska tromboza

TIA – tranzitorni ishemijski atak

ASA- acetilsalicilna kiselina

ADMA – asimetrični dimetil arginin

NO – azot monoksid

eNOS – endotelna sintetaza NO

LOOH - ukupni lipidni hidroperoksidi

AOPP („advanced oxidation protein products”) – produkti uznapredovale oksidacije proteina

PON - paraoksonaza

SH – sulfhidrilne grupe

hsCRP- *high sensitive* C reaktivni protein

HDL - *high density* lipoprotein

LDL – *low density* lipoprotein

OAK – oralni antikoagulans

NOAK- novi oralni antikoagulansi

INR- internacionalni normalizovani odnos (*international normalized ratio*)

ETP – endogeni trombinski potencijal

MTHFR – metiltetrahidrafolat reduktaza

PAI- plazminogen aktivator inhibitor

VTE – venski tromboembolizam

FMD – vazodilatacija uzrokovana protokom (*flow mediated dilatation*)

NMD- nitroglicerinom uzrokovana dilatacija (*nitroglycerine mediated dilatation*)

HTA- hipertenzija

ROC- *receiver operating characteristic curve*

BIOGRAFIJA

Dr Nataša (Slobodan) Stanisavljević, devojčako Petrović, rođena je 19.06.1971. godine u Beogradu.

Na Medicinskom fakultetu u Beogradu diplomirala je februara 1997. godine sa prosečnom ocenom 9.58.

Specijalizaciju iz Interne medicine završila je 2002. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu sa odličnom ocenom.

Od 2002. godine zaposlena kao specijalista interne medicine na odeljenju hematologije KBC "Bežanijska kosa".

Decembra 2009. godine odbranila je magistarsku tezu pod naslovom: "Procena promene telesnog sastava i odgovor na terapiju kod bolesnika sa novootkrivenim non-Hodgkin limfomom lečenih (R)CHOP protokolom" na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, mentor Prof. dr Dragomir Marisavljević.

Usmeni subspecijalistički ispit položila je aprila 2010. godine sa ocenom 10, a rad uže specijalizacije iz Hematologije: "Kliničke, citološko-morfološke osobine i ishod lečenja akutnih mijeloidnih leukemija kod starih bolesnika" odbranila juna 2010.g na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, mentor Prof. dr Dragomir Marisavljević.

Od 2012. godine obavlja funkciju šefa Odseka kliničke hematologije.

Autor je i koautor 9 poglavlja u knjigama i 15 radova objavljenih in extenso u časopisima sa JCR liste.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a **Stanisavljević Nataša**

broj upisa _____

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

POREMEĆAJ FUNKCIJE ENDOTELA KAO UZROK NASTANKA TROMBOZE KOD BOLESNIKA SA ANTIFOSFOLIPIDNIM SINDROMOM

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 02.10.2017.

Stanisavljević Nataša

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora **Stanisavljević Nataša**

Broj upisa _____

Studijski program _____

Naslov rada **POREMEĆAJ FUNKCIJE ENDOTELA KAO UZROK NASTANKA
TROMBOZE KOD BOLESNIKA SA ANTIFOSFOLIPIDNIM SINDROMOM**

Mentor **Prof. dr Dragomir Marisavljević**

Komentor **Naučni savetnik Dr sci.med. Ljudmila Stojanović**

Potpisani _____

Stanisavljević Nataša

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 02.10.2017.

Stanisavljević Nataša

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

POREMEĆAJ FUNKCIJE ENDOTELA KAO UZROK NASTANKA TROMBOZE KOD BOLESNIKA SA ANTIFOSFOLIPIDNIM SINDROMOM

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 2.10.2017.

Stanišević Natasa